

# RESULTADOS

---

## **DNA ANTIGUO**

### Extracciones realizadas

#### **Muestras arqueológicas**

En total, se analizaron 102 individuos procedentes de 12 colecciones arqueológicas. De estos individuos se utilizaron un total de 175 muestras, de las cuales 139 procedían de piezas dentales, 32 de tejido óseo y 4 de cabello. De cada muestra se obtuvo un extracto. En la Tabla R-1 se observan los individuos y las muestras analizadas de cada colección.

Colecciones	Individuos	Muestras			Total
		Diente	Hueso	Pelo	
Calle de la Era (CE)	1	1	-	-	1
Iglesia de la Concepción (C)	5	-	6	4	10
Can Bosch de Basea (CBB)	6	7	-	-	7
Ermita de la Soledad (ELS)	1	-	1	-	1
s'Illot des Porros (IP)	14	21	-	-	21
Mas Rimbau (MR)	3	4	-	-	4
Monte Albán (MA)	3	3	2	-	5
Can Solà del Racó I (MCS)	2	2	-	-	2
Can Solà del Racó II (MCS)	1	-	2	-	2
Puerto de Mazarrón (PM)	3	3	-	-	3
Paja Sola (PS)	7	7	-	-	7
Plaça Vella (PV)	52	83	21	-	104
Son Real (SR)	4	8	-	-	8
<b>TOTAL</b>	<b>102</b>	<b>139</b>	<b>32</b>	<b>4</b>	<b>175</b>

**Tabla R-1** Número de individuos y número de muestras analizadas de cada población.

---

Estas muestras fueron tratadas en un total de 44 grupos de extracción, utilizando distintos protocolos, según se muestra en la Tabla R-2.

Protocolo utilizado	Grupos de extracción	Muestras tratadas
UAB-1	3	11
CINVESTAV/C-PK/C-UAB	3	11
UAB-2	27	120
Mini-extracción	6	20
Persson	1	2
EDH	2	6
Formamida	1	2
Pääbo	1	3
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>175</b>

**Tabla R-2** Número de muestras analizadas con cada protocolo utilizado.

El protocolo UAB-2 fue el más utilizado. Esto se debe a que inicialmente fue con el que se obtuvieron los mejores resultados, así que fue con el que principalmente se realizó la extracción de la mayoría de muestras. El análisis de la contaminación y de la eficiencia, que se muestra más abajo, justifican esta elección.

### **Muestras no arqueológicas**

Mediante el protocolo basado en Formamida también se intentó recuperar DNA a partir de 4 muestras de piel, 5 muestras de tejido muscular y una muestra de hueso de un individuo momificado encontrado en el cementerio de la ciudad de Vic (provincia de Barcelona), de aproximadamente 100 años de antigüedad. Asimismo, utilizando también este protocolo, se intentó la recuperación de DNA a partir de pulpa dentaria de un molar de extracción reciente y de 4 bulbos capilares frescos.

---

## Amplificación de fragmentos de la región de control

### Muestras arqueológicas

De los 175 extractos obtenidos de las muestras de las colecciones arqueológicas, 167 fueron utilizados para intentar la amplificación de fragmentos de la región de control del mtDNA. Estos extractos fueron obtenidos en 42 de los 44 grupos de extracción realizados (Tabla R-3).

Grupos de	Número de grupos	
	Región de control	Regiones codificantes
Extracción	42	25
Amplificación	81	48
Reamplificación	15	8

**Tabla R-3** Grupos de extracción, amplificación y reamplificación realizados para la obtención de los fragmentos del D-loop y de las regiones codificantes. Los grupos de extracción comprendían en promedio 5 muestras más un blanco de extracción. Para el D-loop, los grupos de amplificación consistían de 5 muestras, el blanco de extracción y el blanco de amplificación. Para las regiones codificantes los grupos de amplificación consistían, en promedio, de 10 muestras, los respectivos blancos de extracción y uno o dos blancos de PCR (ver Material y Métodos).

De los 167 extractos, se utilizaron 351 alícuotas para la amplificación, de las cuales 16 fueron empleadas para la amplificación del segmento de 446pb, 29 para el segmento de 300pb, 304 para el segmento de 231pb y 2 para el segmento de 85pb. Del total de las muestras sujetas a PCR, 54 fueron sometidas a reamplificación, 38 purificadas en gel de agarosa y sometidas a la reacción de secuenciación. Estos datos pueden apreciarse en la Tabla R-4.

Tabla R-4

Individuos	No. de Extractos	Región de control				Regiones codificantes			
		Muestras sometidas a			Secuencias Obtenidas	Muestras sometidas a			
		Amplif.	Reamplif.	Secuenc.		Ind.	Ext.	Amplif.	Reamplif.
C F-129	2	6							
C F-132 A	3	9							
C F-132 B	1	3							
C F-137	2	3							
C F-2 L-1	2	4							
CBB Sep 1	1	1							
CBB Sep 10-A	1	2	1	1	1	»	1	9	
CBB Sep 3	2	3	1						
CBB Sep 3B	1	1	1	1					
CBB Sep 7	1	3							
CBB Sep 8	1	2							
CE T-5-2	1	3							
ELS 738	1	2	1	1					
IP A 1961	1	2							
IP B-1	2	7	1						
IP B-25	1	2							
IP B-31	3	6	1	1					
IP B-33	1	2	1	1	1	»	1	9	1
IP BC-16	1	2							
IP BC-49	1	2							
IP C1AA	2	7	2	1	1	»	2	18	6
IP C-24B	1	2							
IP C-50	1	2							
IP CN-14	2	3	1						
IP N-7	1	2							
IP SW-97-3	1	2							
IP SW-97-9	1	6							
MA 91 T-12 E-54	2	2							
MA S-C	2	4							
MA S-R	1	2							
MCS3 244	2	2		1	1				
MCS3 299	1	6							
MCS3 311	1	6							
MR 3004	1	2							
MR 3015	1	3							
MR 5777	2	4	1	1					
PM 7-2-1-0-015047	1	1	1						
PM CST-36-38	1	1							
PM T-16	1	2							
PS A3(2)-A4(1) N-II	1	1	1						
PS A3(2-4) A4-3	1	2							
PS A3(2-4) L-N-II	1	2							
PS A3-1/B3-3 N-II	1	3							
PS C16-17	1	2							
PS H-510	1	4	1	1	1	»	1	12	5
PS N-46	1	5	1						
PV AJ-20	6	6							
PV AJ-25	4	11	4	2	1	»	2	23	10
PV C-1	2	3		1	1	»	2	18	2
PV C-12	2	2							
PV C-13	4	8	2	1	1	»	4	34	3
PV C-15	1	1							
PV C-16	3	8		1	1	»	3	26	
PV C-25	3	7	1						

Individuos	Región de control					Regiones codificantes				
	No. de Extractos	Muestras sometidas a			Secuencias Obtenidas	Ind.	Ext.	Muestras sometidas a		
		Amplif.	Reamplif.	Secuenc.				Amplif.	Reamplif.	
PV C-26	1	2								
PV C-29	1	3	1	1	1	»	1	6		
PV C-35	2	6	2							
PV C-45	2	6	2	1	1	»	2	19		
PV C-56	3	6	2	1	1	»	3	16		
PV C-48	4	7		1	1	»	1	9		
PV C-58b	2	10	3	2	2	»	3	12		
PV C-6	2	2	1	1	1	»	2	19	7	
PV C-62	2	5								
PV C-64	2	6	1	1	1	»	2	19	7	
PV C-68	1	1		1	1	»	1	11		
PV C-72	2	5		1	1	»	2	19	6	
PV C-93b	2	6	2							
PV CE-38	2	2								
PV CE-39	2	2		1	1	»	2	20	1	
PV E-1	3	5		1	1	»	2	18		
PV E-10	2	6	2	1	1	»	2	10		
PV E-11	1	2								
PV E-21	1	1								
PV E-25	1	6	2							
PV E-30	2	2	1	1	1	»	2	19		
PV E-34	1	3	1	1	1	»	1	15	7	
PV E-35	2	6	2	1	1	»	2	19		
PV E-40	1	1		1	1	»	1	9		
PV E-41-I	1	3								
PV E-41-II	1	3	1	1	1	»	1	9		
PV E-42	1	3								
PV E-45	1	1	1							
PV E-47	1	2	1	1	1	»	2	18		
PV E-56	3	5								
PV E-56b	2	2	2	1	1	»	2	20	6	
PV E-62	2	2								
PV E-65	2	3								
PV E-69	1	2								
PV E-77	3	3	1							
PV E-80	1	1		1	1	»	1	9		
PV E-85	2	6	2	1	1	»	2	15	1	
PV E-98	1	2		1	1	»	1	9		
PV FCN-8	4	4								
PV HJE-45	1	1								
PV I-6	1	2								
PV I-7	1	1								
PV Sin referencia	2	4								
PV T-26	1	2	1	1	1	»	1	12	7	
SR Sep 66	1	2								
SR Sep 68	1	2								
SR Sep 72	1	2								
SR Sep 74	2	3	1							
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>167</b>	<b>351</b>	<b>54</b>	<b>38</b>	<b>33</b>	<b>31</b>	<b>55</b>	<b>481</b>	<b>69</b>

**Tabla R-4** Número total de individuos y extractos analizados para el segmento de la región de control y los segmentos de las regiones codificantes. También se muestra el número de intentos de amplificación, reamplificación y secuenciación; así como el número de secuencias obtenidas.

---

## **Contaminación detectada en los blancos**

### **Blancos de extracción**

Para detectar la presencia de DNA contaminante en los blancos de extracción, se sometió una alícuota de cada blanco a la misma reacción de amplificación a la que fueron sometidas las muestras con las que fueron extraídos los blancos. Asimismo, los productos de la amplificación de estos blancos, fueron sometidos a reamplificación, cuando fueron reamplificadas las correspondientes muestras. La presencia de producto amplificado en alguna de estas reacciones, indica que la contaminación se produjo durante la extracción, siempre y cuando en el blanco de reactivos de PCR no se detecte contaminación alguna.

En los 42 grupos de extracción analizados para los segmentos de la región de control, se incluyeron 45 blancos de extracción (tres grupos incluían dos blancos). De estos 45 blancos, 96 alícuotas fueron sometidas a PCR; y de estas 96 alícuotas, 18 fueron reamplificadas (blancos de reamplificación del extracto). De las 96 alícuotas amplificadas se detectaron 10 contaminadas (10.4%), provenientes de 6 blancos, en tanto que de las 18 alícuotas reamplificadas, fueron 2 (11.11%), procedentes del mismo blanco, las que mostraron contaminación. Así, de los 45 blancos analizados, 7 mostraron contaminación, lo que representa un 15.55% del total de los blancos. En la Tabla R-5 se muestra el porcentaje de contaminación detectada en las alícuotas de los blancos de cada uno de los protocolos utilizados.

Protocolo utilizado	Alícuotas analizadas	Alícuotas contaminadas	%
UAB-1	9	2	22.22
CINVESTAV/C-PK/C-UAB	7	-	-
UAB-2	56	2	3.57
Mini-extracción	8	4	50.0
Persson	6	-	-
EDH	6	2	33.33
Formamida	1	-	-
Pääbo	3	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>96</b>	<b>10</b>	<b>10.41</b>

**Tabla R-5** Alícuotas contaminadas según el protocolo de extracción utilizado.

El análisis estadístico de estos resultados se ve complicado por el hecho de que para algunos protocolos fueron muy pocos los grupos de extracción realizados y por la baja incidencia de blancos contaminados. Esta última característica ocasiona que al analizar una tabla de contingencia, algunas frecuencias esperadas sean menores que 5, violando las condiciones óptimas para una prueba de ji-cuadrado. A pesar de estas limitaciones se ha aplicado la prueba de ji-cuadrado utilizando únicamente los protocolos de los que se cuenta con más datos.

Así, se ha encontrado que existe diferencia significativa entre los protocolos UAB-1, UAB-2, MINI y EDH ( $x^2=17.34$ ; g.l.=3;  $P= 0.00060$ ). Por otra parte, no se ha encontrado diferencia significativa entre los protocolos UAB-1, MINI y EDH ( $x^2=1.448$ , g.l.=2;  $P=0.48477$ ), lo que es de esperar debido al bajo número de blancos analizados. Este resultado indica que la principal diferencia está entre el protocolo UAB-2 y el resto. Si se compara el protocolo UAB-2 con la agrupación del resto de protocolos que presentaron contaminación (UAB-1, MINI, EDH), es posible aplicar la prueba exacta de Fisher, que no está limitada por la baja frecuencia esperada (Tabla R-6). El resultado indica que las diferencias entre el protocolo UAB-2 y los restantes, es significativa (prueba exacta de Fisher bilateral  $P=0.0043$ ).

Protocolo	Alícuotas		
	Total	Contaminadas	%
UAB-2	56	2	3.57
Resto	21	6	28.57

**Tabla R-6** Comparación de UAB-2 con los datos agrupados de los protocolos UAB-1, MINI y EDH (Resto).



Resulta bastante complicado intentar relacionar el porcentaje de contaminación con las características de los protocolos utilizados, ya que son muchas las variables que pueden influir en este porcentaje. No obstante, conviene apuntar algunas observaciones. En el protocolo de mini-extracción, pudo haber influido el hecho de que la incubación para la digestión se realizó en microtubos que no tienen un tapón de rosca y que por lo tanto no garantizan el cierre hermético. El protocolo de extracción de la hidroxiapatita (EDH), incluye demasiados pasos, especialmente en lo referente a la concentración, lo que puede incrementar el riesgo de contaminar no sólo las muestras sino incluso los reactivos. Lo mismo puede decirse del protocolo UAB-1, en el que el total de pasos se incrementa debido a los pasos previos a la digestión. El protocolo UAB-2 presenta un porcentaje de contaminación bastante bajo, sobretodo si se tiene en cuenta que fueron muchos los grupos de extracción realizados. Este protocolo precisa de un número de pasos menor y puede influir también el hecho de que el DNA no sea precipitado con etanol, un proceso particularmente delicado, ya que el etanol no es autoclavable y sólo puede ser esterilizado con exposición a luz UV.

Dos terceras partes de las 96 alícuotas sujetas a PCR, fueron sometidas al paso previo de “almacenamiento frío” (A.F.), junto con las respectivas muestras extraídas en el mismo proceso de extracción. La influencia de este paso en la eventual contaminación, se presenta la Tabla R-7.

Alícuotas	Total	Contaminadas	%
Con “almacenamiento frío”	64	8	12.5
Sin “almacenamiento frío”	32	2	6.25
TOTAL	96	10	10.4

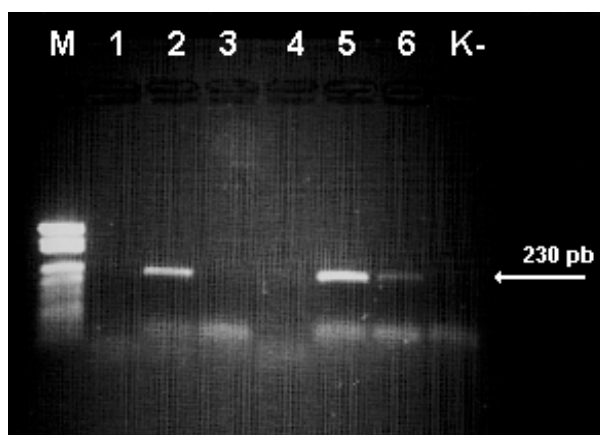
**Tabla R-7** Contaminación durante el “almacenamiento frío”.

Aunque puede parecer que hay un aumento en el porcentaje de contaminación con el paso del “almacenamiento frío”, en realidad esta diferencia no es estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher bilateral  $P=0.4878$ ).

---

En conjunto, todos estos datos indican que la contaminación durante el proceso de extracción está más relacionada con el protocolo que con el paso del “almacenamiento frío”; así por ejemplo, 4 de las alícuotas sujetas a A.F. que mostraron contaminación, proceden del protocolo de Mini-extracción, el protocolo que mostró el porcentaje más alto de contaminación. Por lo tanto, la contaminación en estas alícuotas es razonablemente atribuible al protocolo, más que al paso del “almacenamiento frío”.

Para dilucidar el origen del DNA contaminante, fueron secuenciadas dos muestras amplificadas de un grupo de extracción cuyo blanco resultó contaminado (Fig. R-1) y también la amplificación procedente del blanco.



**Figura R-1** Amplificación de un grupo de extracción cuyo blanco mostró contener DNA contaminante. M= pUC18 digerido con Msp I (Sigma); 1= IP C24B; 2= IP B-25; 3= SR Sep 66; 4= SR Sep 68; 5= SR Sep 74; 6= blanco de extracción (KE); K-, blanco de PCR.

Las tres secuencias obtenidas resultaron ser diferentes (Tabla R-8), situación que ha sido encontrada por otros investigadores cuando han secuenciado las amplificaciones de los blancos (Ivanov et al. 1996).

---



De hecho, una de las características del “Jumping PCR” es la inserción de Timinas o Adeninas ilegítimas y esto podría explicar porqué uno de los dos nucleótidos presentes en la posición 16350 de KE, sea una Timina, ya que si se tratara de una sustitución natural, implicaría una transversión A-T, una sustitución que en esta posición, no la presenta ninguno de los 3295 individuos de la base de datos compilada por Handt y colaboradores (1998), una base compuesta por individuos de 5 continentes.

La secuencia de IP B-25 no presenta sitios con doble nucleótido, indicando que originalmente había un número relativamente elevado de moléculas de la misma identidad. El hecho de que esta secuencia sea completamente diferente de la secuencia encontrada en el blanco, sugiere que proviene del individuo analizado. No obstante bajo estas circunstancias no es posible admitirla como secuencia válida.

#### Blancos de PCR

Las 351 alícuotas sujetas a PCR, fueron tratadas en un total de 81 grupos de amplificación (ver Tabla R-3), en los que se detectaron, de acuerdo con los respectivos blancos, 13 grupos contaminados, lo que representa un 16.04%. En la Tabla R-9 se muestra el porcentaje de contaminación respecto al tipo de polimerasa utilizada.

Polimerasa	Grupos de amplificación		
	Total	Contaminados	%
Promega <i>Taq</i>	12	3	25.0
Promega <i>Tth</i>	2	-	0.0
Pharmacia <i>Taq</i>	22	4	18.18
Finnzymes DyNAzyme	3	2	66.7
Bioline <i>Taq</i>	5	-	0.0
Boehringer <i>Taq</i>	35	4	11.42
Roche Expand H-F	2	-	0.0
TOTAL	81	14	17.28

**Tabla R-9** Grupos de amplificación realizados con cada polimerasa utilizada. Se muestra también el porcentaje de grupos que resultaron contaminados.

---

Los datos de la Tabla R-9 deben considerarse con precaución, debido a que para algunas polimerasas fueron muy pocos los grupos de amplificación realizados. En cuanto al número de grupos de amplificación, 3 polimerasas podrían ser comparables, la *Taq* de Promega, la *Taq* de Pharmacia y la *Taq* de Boehringer, no obstante, al igual que en el caso del análisis del porcentaje de contaminación en los protocolos, estos datos no cumplen las condiciones idóneas para una prueba de ji-cuadrado. A pesar de esto se ha realizado el análisis estadístico para obtener un resultado orientativo y se ha encontrado que no existe diferencia significativa entre estas tres polimerasas en cuanto a la contaminación se refiere ( $\chi^2= 1.349$ ; g.l.= 2;  $P= 0.50937$ ).

En realidad, la diferencia que de verdad llama la atención es la que existe entre la *Taq* de Promega y la *Taq* de Boehringer, ya que esta última presenta un porcentaje de contaminación de menos de la mitad respecto a la primera, aún considerando que la *Taq* de Boehringer fue la que se utilizó en más grupos de amplificación. Sin embargo, la diferencia de los resultados que presentan estas dos polimerasas tampoco es significativa (prueba exacta de Fisher bilateral;  $P=0.3496$ ). En cualquier caso, sería un error considerar estas diferencias como producto de contaminación existente originalmente en las polimerasas, ya que hay otros factores que también pueden influir en este resultado, como por ejemplo, que tengan o que no tengan tapón de rosca los tubos en los que viene el enzima y su respectivo tampón de reacción. También puede ser que existan diferencias en la capacidad de detección de DNA. Podría ser que en presencia de muy pocas moléculas contaminantes alguna enzima no amplifique y otra sí y en este caso el porcentaje de contaminación estaría indicando la capacidad que tiene el enzima de amplificar en condiciones extremas.

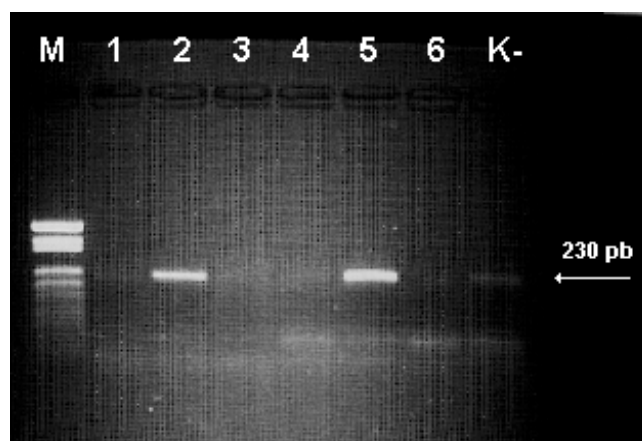
El caso del enzima DyNAzyme de Finnzymes llama particularmente la atención por presentar un porcentaje de contaminación tan elevado, sin embargo no se puede considerar de validez estadística, ya que sólo se realizaron 3 grupos de amplificación. El caso del enzima de Bioline, es notable, pues de los 5 grupos ninguno resultó contaminado. Aunque estos resultados no son estadísticamente significativos, indican que sería interesante realizar una investigación más completa (p.ej. analizando el mismo

---

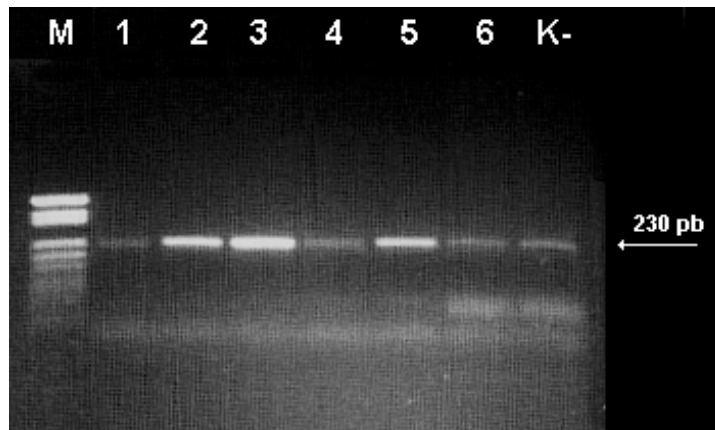
número de muestras con distintas polimerasas) para determinar la influencia que pueden tener distintas DNA polimerasas en la contaminación. De hecho, se han realizado estudios en los que se ha demostrado la presencia de DNA contaminante en enzimas (Meier et al. 1993) y en otras preparaciones comerciales (Goldenberger y Altwegg, 1995) para PCR. En estos casos el DNA es de origen bacterial, un problema bastante grave si el objeto de estudio está relacionado con DNA de bacterias.

Las muestras procedentes de dos de los grupos de amplificación que mostraron contaminación en sus respectivos blancos de PCR fueron sometidas a secuenciación, con el fin de indagar más sobre el origen del DNA que contaminó los reactivos. En estos dos grupos se había intentado la amplificación de diferentes alícuotas procedentes de los mismos extractos.

En uno de los grupos se obtuvo la amplificación de dos muestras (Fig. R-2), que fueron secuenciadas con éxito y del blanco de amplificación, del cual también fue posible obtener la secuencia. En el otro grupo fueron amplificadas las 5 muestras analizadas (Fig. R-3), pero sólo fue posible obtener la secuencia de 3 de ellas. Tanto el blanco de amplificación como el blanco de extracción de este grupo mostraron contaminación y de los dos fue posible obtener la secuencia.



**Figura R-2** Grupo de amplificación que mostró contaminación en el blanco de reactivos de PCR. M= pUC18 digerido con Msp I (Sigma); 1= IP B-1; 2= IPC1AA; 3= IP SW97-9; 4= MCS 3-299; 5= MCS 3-311; 6= blanco de extracción (KE); K- blanco de PCR.



**Figura R-3** Segunda amplificación del grupo cuyo blanco de PCR mostró contaminación. Las muestras de cada carril son las mismas que en la Figura R-2.

Las secuencias de todas estas muestras se presentan en la Tabla R-10. Hay dos cosas a destacar en estas secuencias, la primera es el hecho de que las secuencias de los blancos sean diferentes entre sí y diferentes a las demás muestras de sus correspondientes grupos, tal como ocurrió con el blanco de extracción presentado en la Tabla R-8. Por otra parte es destacable también la presencia de varios sitios con doble nucleótido, Timina y Citosina (representadas por la letra Y). En este caso es más difícil diferenciar si esto se debe únicamente a “Jumping PCR” o a la presencia de dos o más moléculas distintas. Lo que está claro, es que los dos fenómenos son favorecidos por un bajo número inicial de moléculas (ver Marco Teórico), y por este motivo llama la atención la secuencia del individuo IP SW-97-9, ya que no presenta ningún sitio ambiguo y tiene una secuencia completamente diferente a la que presentan los dos blancos analizados; lo que abre la posibilidad de que esta secuencia sea auténtica. No obstante, al igual que con la secuencia de IP B-25, la secuencia de IP SW-97-9 no puede ser aceptada como válida en estas circunstancias.





---

## Blancos de Reamplificación

Las 54 muestras sometidas a reamplificación fueron tratadas en un total de 15 grupos de reamplificación (ver Tabla R-3), en cuyos blancos no se detectó contaminación alguna.

## **Eficiencia en la amplificación**

De las 351 alícuotas sometidas a PCR, 55 han dado un resultado positivo según el análisis electroforético, sin contar las muestras pertenecientes a los grupos de extracción o de amplificación cuyos blancos mostraron contaminación. Estas alícuotas provenían de 22 (55.55%) de los 44 grupos de extracción realizados y fueron amplificadas en 22 (27.16%) de los 81 grupos de amplificación llevados a cabo. La Tabla R-11 muestra una visión general de la eficiencia en la amplificación para cada extracto obtenido.

A continuación se presenta el análisis de la influencia que tienen diferentes variables en la eficiencia, como el protocolo de extracción, el tipo de diente o tejido, el tamaño del segmento amplificado, la polimerasa utilizada, la población y el paso del “almacenamiento frío”.

**Tabla R-11**

Individuo	Extracto Analizado	Alícuotas sujetas a						
		PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6	Secuenc.
C F-129	45	3.30	3.37	3.44				
	46	3.31	3.38	3.45				
C F-132 A	47	3.32	3.39	3.46				
	49	3.34	3.41	3.48				
	51	3.61	3.66	3.72				
C F-132 B	48	3.33	3.40	3.47				
C F-137	53	3.63	3.68					
	57	3.78						
C F-2 L-1	52	3.62	3.67	3.73				
	58	3.79						
CBB Sep 1	3.1	7.59						
CBB Sep 10-A	75	4.71?	4.78+ <b>5.4+</b>					5.4+
CBB Sep 3	3.2	7.60						
	74	4.70?	4.77? <b>5.3</b>					
CBB Sep 3B	3.26	8.27+ <b>9.2+</b>						9.2ar
CBB Sep 7	2.73	7.33	7.40	7.49				
CBB Sep 8	2.26	6.28	7.9					
CE T-5-2	14	2.16	2.27	4.31				
ELS 738	10	71+ <b>2.4+</b>	2.11					2.4am
IP A 1961	3.35	8.38	9.33					
IP B-1	3.40	8.44	8.51	8.63	8.84	9.18	9.38	
	3.63	9.57? <b>9.81</b>						
IP B-25	3.47	8.59	9.46					
IP B-31	72	4.68	4.75? <b>5.1+</b>					5.1ar
	2.30	6.32	7.13					
	2.69	7.21	7.28					
IP B-33	73	4.69	4.76+ <b>5.2+</b>					5.2+
IP BC-16	3.52	8.72	9.51					
IP BC-49	2.31	6.33	7.14					
IP C1AA	3.41	8.45	8.52	8.64	8.85	9.19	9.39	
	3.62	9.56? <b>9.80+</b> <b>9.99</b>						9.80+
IP C-24B	3.46	8.58	9.45					
IP C-50	3.34	8.37	9.32					

**Tabla R-11** (continuación)

Individuo	Extracto Analizado	Alícuotas sujetas a						
		PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6	Secuenc.
IP CN-14	3.51	8.71	9.50					
	3.56	9.25?						
		<b>9.73</b>						
IP N-7	3.50	8.70	9.49					
IP SW-97-3	3.38	8.41	9.36					
IP SW-97-9	3.42	8.46	8.53	8.65	8.86	9.20	9.40	
MA 91 T-12 E-54	17	2.31						
	22	2.36						
MA S.C.	18	2.32						
	21	2.35	7.66	7.76				
MA S.R.	2.27	6.29	7.10					
MCS3 244	3.59	9.28+						
	3.60	9.29+						9.29+
MCS3 299	3.43	8.47	8.54	8.66	8.87	9.21	9.41	
MCS3 311	3.44	8.48	8.55	8.67	8.88	9.22	9.42	
MR 3004	3.54	8.74	9.53					
MR 3015	2.74	7.34	7.41	7.50				
MR 5777	2.75	7.35	7.42	7.51				
	3.8	8.6+						8.99ar
		<b>8.99+</b>						
PM 7-2-1-0-015047	2.18	5.77+						
		<b>9.9</b>						
PM CST-36-38	2.17	5.76						
PM T-16	2.21	5.88	5.93					
PS A3(2)-A4(1) N-II	2.19	5.78+						
		<b>9.10</b>						
PS A3(2-4) A4-3	2.51	6.67	6.72					
PS A3(2-4) L-N-II	2.22	5.89	5.94					
PS A3-1/B3-3 N-II	2.23	5.90	5.91	5.95				
PS C16-17	2.50	6.66	6.71					
PS H-510	2.1	5.18	5.25	5.32	5.39?			5.46+
					<b>5.46+</b>			
PS N-46	81	5.10	5.17	5.24	5.31	5.38+		
						<b>5.45</b>		
PV AJ-20	2.53	6.75						
	2.54	6.76						
	2.55	6.77						
	2.56	6.78						
	2.59	7.1						
	2.60	7.2						

**Tabla R-11** (continuación)

Individuo	Extracto Analizado	Alícuotas sujetas a						Secuenc.
		PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6	
PV AJ-25	1	1	4	7	10? <b>17</b> <b>16</b>	13	46	
	6	67+ <b>2.1+</b>	2.7					2.1+
	7	68+ <b>2.2+</b>	2.8					2.2am
	28	2.43						
PV C-1	3.4	8.2+						8.2+
	3.74	9.85	9.92					
PV C-12	2.29	6.31						
	2.35	6.47						
PV C-13	26	2.41+ <b>2.49</b>						
	27	2.42						
	79	5.15	5.22+	5.29	5.36+ <b>5.43+</b>	5.8		5.43+
	3.69	9.63+						
PV C-15	3.22	8.23						
PV C-16	16	2.30	7.63	7.73+				7.73+
	30	2.52	7.68	7.78				
	34	2.61	2.66					
PV C-25	40	2.73	2.78	3.3	3.8? <b>3.18</b>	3.13		
	2.77	7.54						
	2.78	7.55						
PV C-26	3.75	9.86	9.93					
PV C-29	2.65	7.17	7.24+ <b>9.12+</b>	7.45				9.12+
PV C-35	39	2.72	2.77	3.2	3.7+ <b>3.17</b> <b>3.28</b>	3.12		
	2.7	5.54?						
PV C-45	62	4.3						
	67	4.9	4.16+	4.23+	4.37? <b>4.63+</b> <b>4.55</b>	4.47		4.63+
PV C-48	42	3.21	3.23					
	43	3.22	3.24					
	76	4.72+	4.79+					4.79+
	3.65	9.59+						
PV C-56	56	3.77+ <b>4.60+</b>	4.34? <b>4.52</b>	4.44				4.60+
	2.25	6.27	7.8					
	3.71	9.65+						
PV C-58b	69	4.11	4.18+	4.25+ <b>4.64+</b>	4.38? <b>4.56</b>	4.48		4.64+
	80	5.9	5.16	5.23	5.30	5.37+ <b>5.44+</b>		5.44+
PV C-6	3.5	8.3? <b>8.98+</b>						8.98+
	3.68	9.62						
PV C-62	32	2.54	7.70	7.80				
	35	2.62	2.67					

**Tabla R-11** (continuación)

Individuo	Extracto Analizado	Alícuotas sujetas a						
		PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6	Secuenc.
PV C-64	13	2.15	2.26	4.30+	4.42			4.66+
	3.77	9.88	9.95	<b>4.66+</b>				
PV C-68	3.25	8.26+						8.26+
PV C-72	20	2.34	7.65	7.75+				7.75+
	3.78	9.89	9.96					
PV C-93b	38	2.71	2.76	3.1	3.11	3.6+		
	2.9	5.56				<b>3.27</b> <b>3.16</b>		
PV CE-38	24	2.39						
	25	2.40						
PV CE-39	3.6	8.4+						8.4+
	3.70	9.64+						
PV E-1	2.37	6.50						
	2.62	7.4+						7.4+
	2.71	7.31	7.38	7.47				
PV E-10	78	5.7	5.14	5.21?	5.28	5.35?		5.42+
	3.64	9.58+				<b>5.42+</b>		
		<b>9.82</b>						
PV E-11	36	2.63	2.68					
PV E-21	2.38	6.51						
PV E-25	3	3	6	9	12?	15	48	
					<b>18</b>			
					<b>19</b>			
PV E-30	55	3.76						
	60	4.1+						4.61+
		<b>4.61+</b>						
PV E-34	31	2.53	7.69	7.79+				9.15+
				<b>9.15+</b>				
PV E-35	61	4.2						
	66	4.8	4.15+	4.22+	4.36?	4.46		4.62+
				<b>4.62+</b>	<b>4.54</b>			
PV E-40	3.7	8.5+						8.5+
PV E-41-I	12	2.14	2.25	4.29				
PV E-41-II	2.66	7.18	7.25+	7.46				9.13+
			<b>9.13+</b>					
PV E-42	2.72	7.32	7.39	7.48				
PV E-45	3.58	9.27?						
		<b>9.75</b>						
PV E-47	3.76	9.87	9.94+					9.100+
			<b>9.100+</b>					
PV E-56	63	4.4						
	68	4.10	4.17	4.24				
	2.79	7.56						

**Tabla R-11** (continuación)

Individuo	Extracto Analizado	Alícuotas sujetas a						
		PCR-1	PCR-2	PCR-3	PCR-4	PCR-5	PCR-6	Secuenc.
PV E-56b	3.24	8.25+						9.1+
	3.66	<b>9.1+</b> 9.60? <b>9.77</b>						
PV E-62	2.8	5.55						
	2.80	7.57						
PV E-65	2.39	6.52						
	2.67	7.19	7.26					
PV E-69	2.68	7.20	7.27					
PV E-77	64	4.5						
	2.15	5.74+						
	2.81	<b>9.8</b> 7.58						
PV E-80	2.63	7.5+						7.5+
PV E-85	70	4.12	4.19+	4.26+	4.39?	4.49		4.65+
	2.16	5.75		<b>4.65+</b>	<b>4.57</b>			
PV E-98	2.49	6.65	6.70+					6.70+
PV FCN-8	2.4	5.50						
	2.5	5.51						
	2.33	6.45						
	2.34	6.46						
PV HJE-45	3.23	8.24						
PV I-6	9	70	2.10					
PV I-7	2.3	5.49						
PV Sin referencia	2.41	6.55	6.60					
	2.42	6.56	6.61					
PV T-26	8	69+ <b>2.3+</b>	2.9					2.3+
SR Sep 66	3.53	8.73	9.52					
SR Sep 68	3.48	8.60	9.47					
SR Sep 72	3.36	8.39	9.34					
SR Sep 74	3.37	8.40	9.35					
	3.57	9.26? <b>9.74</b>						

**Tabla R-11** Extractos analizados de cada individuo y alícuotas de cada extracto sujetas a PCR. Los números indican la “etiqueta” o nombre del extracto o alícuota. Los resultados positivos se indican con el signo “+”. Las reamplificaciones se muestran en **negrita** y debajo de las alícuotas reamplificadas. El signo “?” indica que el resultado era dudoso; Los casos en los que la secuencia resultó ser un artefacto, se indican con las letras “ar”; en tanto que los casos en los que la secuencia presentó más de dos sitios ambiguos, están indicados con las letras “am”.

---

## Tipo de tejido

El tipo de tejido a partir del cual se obtiene el DNA es una de las variables que en primer término podrían influir en los resultados. En las muestras de cabello no fue posible amplificar DNA, en tanto que las muestras de hueso presentaron el porcentaje de amplificación más bajo (Tabla R-12). Si se toman en cuenta todos los tipos de tejido, la diferencia es bastante significativa ( $\chi^2= 15.431$ ; g.l.= 5;  $P=0.009$ ). No obstante, quizá no sea correcto considerar las muestras de cabello, debido por un lado al bajo número de muestras y por otro, a que probablemente en este tipo de tejido no exista DNA (hasta el momento no se ha informado de extracción de DNA a partir de muestras de cabello antiguas).

Tejido	Alícuotas		
	Total	Positivas	%
Cabello	11	-	0.0
Canino	75	14	18.66
Incisivo	65	17	26.15
Molar	78	9	11.53
Premolar	68	13	19.11
Hueso	54	2	3.73

**Tabla R-12** Eficiencia en la amplificación según el tipo de muestra utilizada.

Por otra parte, los protocolos utilizados en este trabajo, han sido puestos a punto principalmente para tejido dental, así que el bajo rendimiento de las muestras de hueso puede deberse a que los protocolos no sean idóneos para este tipo de muestras. Lo más adecuado entonces, es analizar si son significativas las diferencias que presentan los diferentes tipos de piezas dentales utilizadas. Si se consideran los 4 tipos empleados, las diferencias no son significativas ( $\chi^2= 5.044$ ; g.l.= 3;  $P= 0.16858$ ). Por otra parte, aunque la diferencia entre las muestras de incisivos y molares es significativa ( $\chi^2=5.091$ ; g.l.= 1;

$P= 0.02405$ ), las diferencias entre caninos, premolares e incisivos no lo son ( $\chi^2= 1.421$ ; g.l.= 2;  $P= 0.49128$ ). Todo esto indica que existe una pequeña desventaja únicamente cuando se utilizan molares para la extracción y amplificación de DNA a partir de piezas dentales.

### Protocolo de extracción

Otro de los factores que puede influir en la eficiencia de la amplificación es el protocolo de extracción utilizado. En la Tabla R-13 se observa que únicamente cuatro protocolos dieron resultados positivos. La diferencia entre estos protocolos (UAB-1, CINVESTAV, UAB-2, MINI) no es significativa ( $\chi^2=1.974$ ; g.l.=3;  $P=0.57789$ ).

Protocolo	Alícuotas		
	Total	Positivas	%
Persson	12	-	0.0
UAB-1	25	2	8.0
CINVESTAV/PK/UAB	21	3	14.28
UAB-2	244	44	18.03
Mini-extracción	29	6	20.68
EDH	8	-	0.0
Formamida	4	-	0.0
Pääbo	8	-	0.0

**Tabla R-13** Eficiencia en la amplificación según el protocolo de extracción utilizado.

Como estos datos no cumplen las condiciones óptimas para la prueba de ji-cuadrado, se ha comparado la eficiencia del protocolo UAB-2 respecto a la agrupación de las eficiencias del resto de protocolos que dieron algún resultado positivo (UAB-1, CINVESTAV, MINI), pero las diferencias tampoco son significativas (prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.6012$ ). Por otra parte, la diferencia que existe entre el protocolo con menor eficiencia (UAB-1) y el de mejor rendimiento (MINI) tampoco es significativa



---

(prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.2621$ ). Esto indica que el protocolo no influye en la eficiencia de la amplificación, excepto, obviamente, cuando el protocolo no da ningún resultado positivo.

Hasta cierto punto es normal que el protocolo de Pääbo, no haya dado ningún resultado positivo, ya que fue utilizado exclusivamente con las muestras de pelo. Para el protocolo basado en Formamida, fueron muy pocas las muestras analizadas, por lo que estos resultados no pueden ser concluyentes. Lo mismo puede decirse para el protocolo de Persson, ya que aunque se han analizado 12 alícuotas, todas ellas proceden de tan sólo dos extractos. Los resultados del protocolo de extracción de la hidroxiapatita (EDH) merecen especial atención y serán discutidos en una sección posterior.

#### Tamaño del fragmento

Uno de los factores, en los que tradicionalmente se ha puesto más énfasis, es el tamaño del fragmento a amplificar, considerándose que mientras más pequeño es el fragmento más éxito se tendrá en la amplificación. En la Tabla R-14 se observa que no fue posible amplificar ningún fragmento de 400 pares de bases, sólo dos de 300pb y 53 de 231pb.

Tamaño	Alícuotas		
	Total	Positivas	%
400	16	-	0.0
300	29	2	6.89
231	304	53	17.43
85	2	-	0.0

**Tabla R-14** Eficiencia según el tamaño del segmento amplificado.

La diferencia entre los resultados de estos tres tamaños es casi significativa ( $\chi^2=5.351$ ; g.l.= 2;  $P= 0.06886$ ), aunque estos datos tampoco cumplen las condiciones para la prueba de ji-cuadrado.

La diferencia entre los resultados obtenidos cuando se intenta la amplificación del fragmento de 300 pb y cuando se intenta la de 231 pb no es significativa (prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.1927$ ). En cualquier caso, estos resultados indican que es más difícil obtener fragmentos de 300 pb que de 231 pb, por lo menos en el 80% de los casos. El hecho de que no se haya podido amplificar ningún fragmento de 85 pares de bases no debe considerarse, ya que las muestras analizadas procedían del protocolo basado en Formamida.

#### Polimerasa utilizada

El siguiente aspecto a valorar, es la influencia de la polimerasa empleada. Dado que las pequeñas diferencias encontradas en el porcentaje de contaminación entre las distintas polimerasas utilizadas podrían deberse a la diferencia en la eficiencia en la amplificación, resulta interesante comparar estas eficiencias. En la Tabla R-15 se presentan los resultados obtenidos con cada una de las polimerasas utilizadas.

Polimerasa	Alícuotas		
	Total	Positivas	%
Promega <i>Taq</i>	48	3	6.25
Promega <i>Tth</i>	6	0	0.0
Pharmacia <i>Taq</i>	101	18	17.8
DyNAzyme	10	0	0.0
Bioline <i>Taq</i>	32	8	25
Boehringer <i>Taq</i>	146	26	17.8
Expand H-F	8	0	0.0

**Tabla R-15** Eficiencia según la polimerasa utilizada en la amplificación.

---

Sólo con 4 de las 7 polimerasas se han obtenido resultados positivos, pero las diferencias entre ellas no son significativas ( $\chi^2= 5.538$ ; g.l.= 3;  $P=0.13639$ ). Sin embargo, la diferencia observada entre la *Taq* de Promega y la de Bioline si es significativa (prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.0228$ ). Este resultado es particularmente notable porque la *Taq* de Promega mostró un porcentaje alto de contaminación (25%) y la eficiencia más baja (6.25%) de entre las polimerasas que dieron resultados positivos, lo que indica que al menos en el caso de la *Taq* de Promega, el porcentaje de contaminación no está influido por la eficiencia del enzima.

Por otra parte, el hecho de que la *Taq* de Bioline muestre el más alto rendimiento y un porcentaje muy bajo de contaminación, indica que es una enzima fiable para estudios de DNA antiguo. Asimismo, es interesante notar que el tampón de reacción de la *Taq* de Bioline es el único que presenta diferencias substanciales respecto a la composición de los tampones de las demás enzimas (ver Material y Métodos).

#### Almacenamiento frío

Para evaluar la influencia del paso previo al PCR consistente en almacenar los tubos a 4°C durante al menos tres días (“almacenamiento frío”), en la Tabla R-16 se compara el resultado obtenido a partir de las muestras tratadas con relación al resultado que se obtuvo a partir de las muestras que no fueron sometidas a este paso.

Alícuotas	Total	Positivas	%
Con “almacenamiento frío”	241	50	20.74
Sin “almacenamiento frío”	110	5	4.54

**Tabla R-16** Eficiencia de la amplificación cuando se aplica el “almacenamiento frío”.

Como se puede observar, la diferencia en la eficiencia cuando se aplica el paso del “almacenamiento frío” respecto a la eficiencia cuando no se aplica, es substancial y

además bastante significativa estadísticamente ( $\chi^2= 15.00$ ; g.l.= 1;  $P= 0.00011$ ). Para valorar en mayor profundidad la asociación que existe entre este paso y la eficiencia en la amplificación, se realizó una prueba de regresión logística. El resultado indica que la aplicación del “almacenamiento frío” aumenta en un factor de 5.4 (con un intervalo de confianza del 95% de 2.12-14.15) la probabilidad de obtener una amplificación positiva respecto a la probabilidad de obtenerla cuando no se aplica ( $\chi^2$  de la razón de verosimilitud = 17.991; g.l= 1;  $P< 0.0001$ ). Además, otras medidas de asociación confirman estos resultados, como los coeficientes de contingencia ( $C= 0.202$ ;  $P< 0.001$ ) y V de Cramer ( $V= 0.207$ ;  $P< 0.001$ ).

#### Población de procedencia

En la Tabla R-17 se analiza la eficiencia en relación a la población estudiada; y como puede observarse, existe demasiada diferencia en cuanto al número de alícuotas analizadas para las distintas poblaciones y esto dificulta el análisis estadístico. Por ejemplo, para las poblaciones ELS y CE no se obtuvo ningún resultado positivo, pero únicamente se analizaron 2 y 3 alícuotas respectivamente, que además procedían de sólo un extracto de cada población (ver Tabla R-4).

Población	Periodo	Alícuotas		
		Total	Positivas	%
Ermita de la Soledad (ELS)	S. XVII d. C.	2	-	0.0
Iglesia de la Concepción (C)	S. XVI – XVII d. C.	25	-	0.0
Plaça Vella (PV)	S. XV – XVI d. C.	199	44	22.11
Monte Albán (MA)	Precolombino	8	-	00
Can Solà del Racó II (MCS)	S. IX d. C.	2	2	100
Can Solà del Racó I (MCS)	S. III – VII d. C.	12	-	0.0
Mas Rimbau (MR)	S. III – VII d. C.	9	1	11.11
Can Bosch de Basea (CBB)	S. V – VI d. C.	12	3	25
Calle de la Era (CE)	S. IV – VI d. C.	3	-	0.0
Puerto de Mazarrón (PM)	S. IV – VI d. C.	4	1	25
s'Illot des Porros (IP)	S. VI – II a. C.	47	2	4.25
Son Real (SR)	S. VI – II a. C.	9	-	0.0
Paja Sola (PS)	2300 años a. C.	19	2	10.52

**Tabla R-17** Eficiencia de la amplificación según la procedencia de la muestra.

---

Puede llamar la atención que ninguna de las 25 muestras analizadas de la población de la Iglesia de la Concepción (C), haya dado un resultado positivo, no obstante, este resultado no es tan extraño si se considera que los extractos procedían exclusivamente de muestras de hueso y cabello. De mayor relevancia puede parecer el hecho de no haber obtenido ningún resultado positivo a partir de las muestras de las poblaciones MA, MCS-I y SR, de las que se analizaron 8, 12 y 9 alícuotas respectivamente, sin embargo, sólo un estudio en el que se analice un mayor número de muestras y que incluya métodos de prospección molecular podría indicar si en estas poblaciones existe o no existe DNA endógeno amplificable.

Por otra parte, también es interesante la alta eficiencia de la población CBB (25%) de la que se analizaron 12 alícuotas, sin embargo, no existe diferencia significativa respecto a los resultados de PV (prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.7319$ ), y muy justa respecto a los resultados de IP (prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.0523$ ); lo que indica que el aumento de la eficiencia en esta población es aparente y que se debe en realidad al bajo número de alícuotas analizadas. Esto es obvio para los resultados de MCS-II. De especial consideración es la extrema baja eficiencia de las muestras procedentes de la población de s'Illot des Porros (IP), ya que se analizó un número relativamente importante de alícuotas. Más aún, el análisis estadístico de las diferencias entre los resultados de esta población y los de la Plaça Vella indican que la diferencia es significativa (prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.0032$ ).

Existen al menos dos posibilidades que pueden explicar esta diferencia, por un lado, que las muestras de IP contengan menos DNA amplificable o en peores condiciones y por otro, que contengan algún inhibidor que por ser de naturaleza diferente a los inhibidores de las muestras de PV no respondan de la misma forma al tratamiento del “almacenamiento frío”.

Con el fin de valorar la influencia que ejerce el origen y antigüedad de las muestras sobre los resultados del “almacenamiento frío” es necesario comparar, por un lado, los resultados obtenidos en las muestras de PV cuando han sido y cuando no han

---

sido sometidos al “almacenamiento frío”. En la Tabla R-18 se puede ver que dentro de las muestras de PV existe una diferencia importante entre aplicar y no aplicar el “almacenamiento frío”; diferencia que estadísticamente es muy significativa ( $\chi^2= 16.13$ ; g.l.= 1;  $P= 0.00006$ ).

Alícuotas PV	Total	Positivas	%
Con A.F.	125	39	31.2
Sin A.F.	74	5	6.75

**Tabla R-18** Eficiencia en las muestras de PV cuando se aplica el “almacenamiento frío”.

Por otra parte, al comparar esta tabla con la obtenida al incluir todas las poblaciones (Tabla R-16), resulta evidente que ninguna de las muestras de las demás poblaciones, dio un resultado positivo sin ser sometida al paso del “almacenamiento frío”, lo que habla en favor de la generalidad del método. Es evidente también que existen poblaciones en las que la aplicación del método no tuvo ningún efecto, pero esto puede atribuirse a otros factores, como a la inexistencia de DNA en esas muestras (C), o al bajo número de extractos analizados (CE, ELS).

Así, la cuantificación del beneficio del “almacenamiento frío” cuando se consideran todas las poblaciones, podría estar subestimada, debido al sesgo que ejercen las muestras en las que es imposible observar el beneficio por una u otra razón. Sin embargo, sólo una investigación más completa con las muestras de la población de IP podría indicar si la diferencia que presentan en la amplificación respecto a las muestras de PV se debe a que contienen menos DNA amplificable.

#### **Eficiencia en la reamplificación**

En lo referente a la reamplificación, 29 de las 54 alícuotas reamplificadas (53%) mostraron un resultado positivo. Dos factores pueden influir para que esta eficiencia sea

---

relativamente baja. Por un lado, el hecho de no purificar las muestras antes de reamplificarlas puede ocasionar que exista una inhibición en la reamplificación debido a la presencia de dNTP's, *primer-dimers*, etc. Por otra parte, también es posible que las amplificaciones obtenidas en la primera ronda de PCR, sean en realidad artefactos o bandas inespecíficas.

Aparentemente, la solución a este problema sería la purificación de las muestras antes de la reamplificación, sin embargo, dado el riesgo de contaminación que existe en este paso, esta solución no parece ser la más adecuada. A pesar de que sólo se obtiene la mitad de las muestras esperadas, el riesgo de haberlas obtenido debido a una contaminación es mucho menor.

### **Muestras no arqueológicas**

De las 10 muestras procedentes del individuo momificado del cementerio de la ciudad de Vic, únicamente fue posible amplificar un fragmento de 85pb a partir de una de ellas, obtenida de tejido muscular. De la pulpa dentaria del molar reciente, fue posible amplificar un fragmento de 300pb, en tanto que de las muestras de bulbos capilares se amplificó un segmento de 231pb. Ninguno de estos segmentos amplificados fue sometido a la reacción de secuenciación. En estas amplificaciones no se detectó contaminación.

El hecho de haber obtenido una amplificación positiva a partir de tejido momificado usando el protocolo basado en Formamida, es como mínimo esperanzador, ya que este protocolo es extraordinariamente sencillo, rápido y menos propenso a la contaminación pues todos los pasos son efectuados en el mismo tubo. Quizá esté limitado a muestras de relativa poca antigüedad, pero esto no es un problema si se piensa en su utilización para fines forenses. El resultado obtenido y las características del protocolo invitan a seguir investigando, ya que los beneficios podrían ser importantes.

---

## Secuencias de la región de control

En total, 38 muestras fueron purificadas y sometidas a la reacción de secuenciación, de las cuales se obtuvieron 33 secuencias (86.84%), ya que dos fueron descartadas por presentar más de dos sitios ambiguos y tres porque resultaron ser artefactos de amplificación. De las 33 secuencias obtenidas 28 corresponden a 27 individuos de la necrópolis de la Plaça Vella, pues para el individuo PV C-58b se obtuvieron dos secuencias a partir de extractos independientes, que resultaron ser idénticas. Las 5 secuencias restantes pertenecen a individuos de las poblaciones control (Tabla R-19).

### **Inferencia del haplogrupo**

En algunos casos, la inferencia del haplogrupo se vio complicada por la presencia de determinadas sustituciones en sitios inestables y por la falta de sustituciones características de algunos haplogrupos. Esto conlleva la imposibilidad de definir un haplogrupo concreto pero permite establecer dos niveles de asignación, por un lado los haplogrupos posibles, y dentro de estos, el haplogrupo o haplogrupos probables.

Por ejemplo, la sustitución 16270T del individuo PV T-26 podría corresponder al subgrupo U5, la 16219G de PV E-1 al subgrupo U6 y la 16356C de PV C-6 al U4; aunque es posible también que estos tres individuos pertenezcan a los haplogrupos H ó J que carecen de una sustitución característica dentro del segmento analizado. En similar situación se encuentran los individuos PV E-35 y PV C-72, que presentan una de las sustituciones típicas del haplogrupo T, pero no es posible asignarlas con seguridad a este haplogrupo porque no se conoce el estatus del sitio 16126, la otra posición “diagnóstica” de este haplogrupo; así que han sido asignados como posibles H, J ó U y como probables T.

La sustitución 16311C es característica del haplogrupo K, pero sólo en presencia de 16224C, ya que se trata de un sitio inestable (Macaulay et al. 1999a). Por este motivo,





---

La substitución 16304C la presenta el subgrupo T2a, pero éste presenta también los polimorfismos 16294T y 16296T, por lo que el individuo IP B-33 que carece de ambos, ha sido designado como posible H, J ó U. Además, el sitio 16304 es inestable y ha sufrido retromutaciones en la historia evolutiva del mtDNA, ya que también el haplogrupo F presenta una C en esta posición (Francalacci et al. 1999).

La secuencia 9.15 de PV E-34 contiene la substitución 16223T, que es característica de los haplogrupos L, X, W, I, A y M. Sin embargo, los haplogrupos L, X, W, A y M están caracterizados también por otros polimorfismos que no existen en esta secuencia, por lo que en principio, no es probable que pertenezca a ninguno de ellos. Por otro lado, la inclusión de esta secuencia dentro del haplogrupo I no puede ser descartada, ya que los polimorfismos 16129A y 16391A, que también son característicos del haplogrupo I, están fuera del segmento analizado. Asimismo, tampoco puede ser descartada la posibilidad de que pertenezca a los haplogrupos H, J ó U.

Para otras secuencias fue posible la asignación clara de algún haplogrupo pues presentaban los polimorfismos característicos correspondientes. Tal es el caso de las secuencias incluidas en el haplogrupo V y en los subgrupos K, T2 y T2a.

Así, de las 33 secuencias obtenidas, 19 podrían pertenecer al conjunto de haplogrupos H, J ó U; 2 al H, J, U ó T; 1 al H, J, U ó I y 5 al haplogrupo K; 3 al V y 2 al T.

La secuencia 9.1 del individuo PV E-56b no presenta características de ningún haplogrupo europeo y contiene un número muy elevado de substituciones, con transiciones C→T en 10 posiciones y T→C en una posición. Este resultado es poco común y debe considerarse con mucha precaución. Con excepción de las transiciones 16259T y 16375C, las substituciones que presenta esta secuencia han sido descritas en poblaciones europeas, pero en diferentes individuos (Handt et al. 1998). Por otra parte, 8 de las 11 substituciones que presenta podrían estar relacionadas con linajes

---

mitocondriales asiáticos. Son características, aunque no exclusivas, del haplogrupo M y del subgrupo C la sustitución 16223T; del subgrupo C la 16298C; y de los subgrupos A1a y A1b la 16355T y la 16360T respectivamente (Francalacci et al. 1999). Además, la sustitución 16250T ha sido descrita únicamente en individuos de Melanesia y las transiciones 16239T, 16256T y 16260T han sido encontradas en individuos asiáticos de diferente origen geográfico (Handt et al 1998).

No obstante, sería muy arriesgado sugerir que esta secuencia pertenezca a un mtDNA de origen asiático, pues no es común que una misma secuencia presente sustituciones características de tres grupos diferentes en sitios estables. Por otra parte, esta secuencia pudo haber sido originada por daño molecular, sobretodo considerando la alta incidencia de Timinas. Hay que recordar que el “Jumping PCR” se caracteriza por la introducción de Adeninas y Timinas ilegítimas, por lo que la secuencia 9.1 podría ser una secuencia mosaico formada a partir de pequeños fragmentos, que podrían ser endógenos o contaminates, o a partir de un DNA plantilla con daños moleculares que impidan la replicación continua (ver Marco Teórico). La presencia de la sustitución 16375T apoya esta hipótesis, pues no se encuentra en ninguna de las secuencias de la base de datos utilizada como referencia (Handt et al. 1998). Futuras investigaciones podrían esclarecer esta situación, en las que sería deseable la clonación de los segmentos amplificados y la secuenciación de múltiples clones, así como la extracción de DNA de diferentes muestras del mismo individuo.

En los 5 individuos de las poblaciones control, se encontraron 4 secuencias diferentes, 2 iguales a la secuencia de referencia (CBB 10-A y MCS3-244) y tres que son únicas, es decir que no están representadas por ningún otro individuo analizado. Este hecho excluye la posibilidad de tener un problema de contaminación generalizada en el laboratorio, ya que de ser así, se observaría una mayor homogeneidad de las secuencias sin importar la población de procedencia de las muestras. Además, dos de las sustituciones del individuo IP B-33 (16301T y 16335G) no se encuentran en ninguna otra de las secuencias analizadas, lo que excluye la posibilidad de que esta secuencia

---

provenga de contaminación cruzada de pequeños fragmentos que hayan podido ser recombinados vía “Jumping PCR”.

El individuo IP-C1AA presenta una posición heteroplásmica (16318M), en la que mostró una proporción igual de A y C. Sin embargo esta característica puede deberse a un error de la polimerasa, ya que la presencia de una C en esta posición implicaría una transversión que no la presenta ninguno de los 3295 individuos de la base de datos de Handt y col. (1998). En cualquier caso, sólo una investigación más profunda puede aclarar esta situación.

Otra de las características destacables en estos resultados es el hecho de que ninguna de las secuencias obtenidas sea igual a la secuencia del autor de la tesis (RMD), lo que descarta la posibilidad de que las secuencias de las muestras provengan del investigador relacionado con la extracción y amplificación de las muestras. De hecho, dado que la substitución que caracteriza la secuencia RMD (16344T) se presenta con una frecuencia muy baja en población europea (6/1219, según la base de datos de Handt et al. 1998), encontrar una secuencia idéntica en una de las muestras analizadas sería un fuerte motivo de sospecha, aunque obviamente no se tendría la seguridad de que se tratase de un evento de contaminación.

---

## Amplificación de las regiones codificantes

Para la amplificación de las regiones codificantes, únicamente se analizaron 31 individuos de los 32 de los cuales se obtuvo la secuencia del D-loop. El individuo MCS3 244, no fue incluido en el análisis de los segmentos codificantes debido a que sus extractos de DNA fueron utilizados para otros estudios, que al no constituir parte de los objetivos de esta tesis no serán presentados.

En una primera etapa del análisis se utilizaron los mismos extractos que fueron usados para la amplificación de la región de control y la mayoría de los que previamente habían dado un resultado positivo, fueron amplificados sin mayor problema para las regiones codificantes, tal y como se espera para fragmentos más cortos. Los extractos 56, 76, 78 y 80 fueron utilizados casi en su totalidad para la amplificación del fragmento del D-loop, por lo que fue necesario utilizar extractos independientes de los mismos individuos para la amplificación de las regiones codificantes.

Posteriormente y con el fin de verificar los resultados, fueron analizados extractos independientes de 20 individuos. La mayoría de estos extractos no dieron un resultado positivo en la amplificación del fragmento de la región de control, sin embargo, casi todos mostraron una buena eficiencia en la amplificación de los fragmentos más cortos de las regiones codificantes.

En la Tabla R-20 se muestra una visión general de la eficiencia en la amplificación que mostró cada uno de los extractos analizados. Como se puede apreciar, en algunos casos fueron necesarios más de un intento de amplificación e incluso fueron necesarias algunas reamplificaciones. Más aún, algunos extractos que previamente habían dado un resultado positivo para el fragmento de 231pb de la región de control, mostraron una eficiencia de amplificación muy baja en esta fase del análisis, por lo que los resultados obtenidos a partir de ellos no deben considerarse como definitivos.

En total, se analizaron 55 extractos que procedían de 25 de los 44 grupos de extracción realizados. De estos extractos se obtuvieron 481 alícuotas que fueron sometidas a PCR en un total de 48 grupos de amplificación.





**Tabla R-20** (continuación)

Individuo	Extracto	Tejido	Fragmento (pb)									
			D-loop (231)	X (166)	V (120)	H (123)	W (125)	K (160)	E (93)	U (123)	J (137)	T (154)
IP-C1AA	3.62	premolar	+	X35-	V41+	H42-	W42-	K43-	E37-	U40?	J20-	T17+
"	"			<b>X58-</b>	---	H57+	<b>W53+</b>	<b>K55+</b>	E53*	<b>U52-</b>	<b>J62-</b>	---
"	"			X48?	---	---	---	---	---	---	J51-	---
"	"			<b>X59-</b>	---	---	---	---	---	---	---	---
"	3.41	canino	-	X78-	---	H73+	---	K64-	E73+	---	---	T51-
PV E-47	3.76	incisivo	+	X36+	V10+	H46+	W10+	K44+	E41+	U41+	J23+	T42+
"	3.17	molar	---	X84+	V51+	H81+	W63-	K72+	E86+	U63+	J74+	T57+

**Tabla R-20** Eficiencia en la amplificación y reamplificación de cada extracto para cada uno de los fragmentos buscados. X= L1637-H1764 (166pb); V= L4538-H4621 (120pb); H= L6968-H7052 (123pb); W= L8927-H9014 (125pb); K= L8997-H9121 (160pb); E= L10366-H10420 (93pb); U= L12237-H12309 (123pb); J= L13627-H13725 (137pb); T= L15503-H15620 (154pb). Se indica si la amplificación dio una señal positiva (+), negativa (-), débil (\*) o dudosa (?) en el gel de agarosa. Las reamplificaciones se muestran en **negrita** y debajo de las alícuotas reamplificadas. Se indica también si el extracto dio alguna señal positiva en la amplificación del fragmento de 231pb del D-loop. Tres guiones (---) indican que no se intentó la amplificación.

Las reamplificaciones fueron evitadas en la medida de lo posible, por lo que de las 481 alícuotas sujetas a amplificación únicamente 69 fueron sometidas a reamplificación en un total de 8 grupos de reamplificación (Tablas R-3 y R-4; Pag. 233 y 234).

#### **Contaminación detectada en los blancos**

Ninguno de los grupos de extracción analizados mostró contaminación en sus respectivos blancos. En los 48 grupos de amplificación, se añadieron 63 blancos, de los cuales 3 resultaron contaminados (4.76%). Como estos blancos procedían de 3 grupos de amplificación distintos, la proporción de grupos contaminados es de 6.25% (3 de 48). No se detectó contaminación en ninguno de los blancos de reamplificación analizados.



---

## Factores que influyeron en la eficiencia de la amplificación

De las 481 alícuotas sujetas a PCR, 385 mostraron una amplificación positiva, según el análisis en gel de agarosa, lo que representa un 80.04%. Esta eficiencia tan alta está justificada por el hecho de que más de la mitad (61.8%) de los extractos utilizados en esta fase habían demostrado contener DNA amplificable durante el análisis de los fragmentos de la región de control. El análisis de los factores que influyeron en la amplificación en esta fase cobra más relevancia por el hecho de que todas las alícuotas fueron sometidas al paso del “almacenamiento frío”, con lo cual este factor es ahora constante.

### Polimerasa

En la Tabla R-21 se observan los resultados obtenidos según los dos tipos de polimerasa utilizados. Aunque la eficiencia de la *Taq* de Boline sigue siendo mayor, esta diferencia no es significativa (prueba exacta de Fisher bilateral,  $P= 0.4649$ ).

Polimerasa	Alícuotas		
	Total	Positivas	%
Boline <i>Taq</i>	430	346	80.4
Promega <i>Taq</i>	51	39	76.4

**Tabla R-21** Eficiencia según la polimerasa utilizada en la amplificación.

### Tipo de tejido

En lo referente al tipo de tejido utilizado, en la Tabla R-22 se observa que las muestras procedentes de hueso dieron nuevamente el rendimiento más bajo.

Tejido	Alícuotas		
	Total	Positivas	%
Canino	147	126	85.71
Incisivo	122	111	90.98
Molar	91	66	72.52
Premolar	98	74	75.51
Hueso	23	8	34.78

**Tabla R-22** Eficiencia según el tipo de tejido utilizado para la extracción de DNA.

La diferencia que existe entre los cinco tipos es bastante significativa ( $\chi^2= 46.07$ ; g.l.= 4;  $P< 0.00001$ ), así como la diferencia que existe entre los 4 tipos de piezas dentales utilizadas ( $\chi^2= 16.57$ ; g.l.= 3;  $P= 0.00087$ ), lo que corrobora la desventaja en utilizar molares y la conveniencia de utilizar incisivos. Esta asociación está confirmada por los coeficientes de contingencia ( $C= 0.187$ ;  $P= 0.001$ ) y V de Cramer ( $V= 0.190$ ;  $P= 0.001$ ).

#### Protocolo de extracción

En la Tabla R-23 se presentan los resultados positivos obtenidos con cada uno de los protocolos utilizados. En general se observa un aumento en la eficiencia respecto a los resultados obtenidos con la amplificación del D-loop, pero también es notable que la diferencia entre los protocolos también es mayor.

Protocolo	Alícuotas		
	Total	Positivas	%
UAB-1	55	22	40.00
CINVESTAV	10	5	50.00
CINVESTAV-UAB	25	18	74.00
CINVESTAV/PK	19	17	89.47
UAB-2	360	319	88.61
MINI	12	4	33.33

**Tabla R-23** Eficiencia según el protocolo de extracción utilizado.

---

Aunque la comparación estadística a través de la prueba de ji-cuadrado se dificulta por el hecho de que para algunos protocolos se analizaron muy pocas alícuotas, la diferencia entre los 6 protocolos es bastante significativa ( $\chi^2= 95.857$ ; g.l.= 5;  $P< 0.0001$ ) y aún sin tener en cuenta los resultados del protocolo MINI (el de menor rendimiento), la diferencia entre los 5 protocolos restantes sigue siendo significativa ( $\chi^2= 82.85$ ; g.l.= 4;  $P< 0.0001$ ).

La diferencia que presentan entre sí las variantes del protocolo CINVESTAV es de particular interés, pues a pesar de que las diferencias que existen cuando se comparan los tres protocolos no son completamente significativas ( $\chi^2=5.420$ ; g.l.= 2;  $P= 0.06653$ ), la diferencia entre el protocolo CINVESTAV-PK, que incluye Proteinasa K, y el CINVESTAV, que no incluye, si es de significación estadística (prueba exacta de Fisher bilateral;  $P= 0.0302$ ). Esta información es relevante pues la función de la Proteinasa K durante la extracción, es la digestión de las proteínas asociadas al DNA, como las histonas o las “binding proteins” en el caso del mtDNA, así como de las proteínas celulares y esto podría indicar que el DNA de mejor calidad se conserva en células “momificadas” y no unido a la matriz de hidroxiapatita.

La baja eficiencia del protocolo UAB-1 puede ser debida al hecho de que los extractos 6 y 7 del individuo PV AJ-25, así como el extracto 8 del individuo PV T-26, fueron obtenidos con este protocolo a partir de muestras de hueso. Como se observa en la Tabla R-20, estos extractos presentaron una eficiencia extremadamente baja, que puede atribuirse al tipo de tejido más que al protocolo. Por otra parte, estos casos generaron una especie de círculo vicioso, ya que al presentar una eficiencia baja, se realizaron más intentos de amplificación, que al resultar negativos, contribuyeron a incrementar aún más la proporción de resultados negativos. Este efecto pudo sesgar también los resultados de la amplificación de algunos de los segmentos analizados. En teoría, la eficiencia debería de aumentar a medida que el tamaño del fragmento a amplificar disminuye.

---

## Tamaño del segmento

En la Tabla R-24 se observa que con excepción de los fragmentos L13627–H13725 (137pb) y L10366–H10420 (93pb), parece existir una tendencia a obtener mejores resultados con los fragmentos más cortos.

Segmento	Tamaño (pb)	Alícuotas		
		Total	Positivas	%
L1637 - H1764	166	55	38	69.09
L8997 - H9121	160	53	43	81.13
L15503 - H15620	154	51	45	88.23
L13627 - H13725	137	55	38	69.09
L8927 - H9014	125	46	37	80.43
L12237- H12309	123	54	47	87.03
L6968 - H7052	123	58	51	87.93
L4538 - H4621	120	45	41	91.11
L10366 - H10420	93	64	45	70.31

**Tabla R-24** Eficiencia según el tamaño del segmento amplificado.

La baja eficiencia del fragmento de 137pb se debe a que se realizaron varios intentos con los extractos de los individuos PV AJ-25 y PV T-26 para amplificar este segmento y todos dieron resultados negativos (ver Tabla R-20).

Es más difícil de explicar la baja eficiencia de la amplificación del fragmento de 93pb, ya que no se hicieron intentos repetidos con ningún extracto en particular, lo que nos remite a otro factor que puede ser decisivo en la amplificación, el diseño de los cebadores. El cebador L10366 presenta estructuras secundarias y el H10420 presenta corrimiento de bases (4 Timinas y 3 Adeninas); además, la diferencia de la temperatura de hibridación que existe entre los dos cebadores es de 8°C. Ninguno de los demás cebadores presenta estructuras secundarias ni corrimiento de bases, a excepción del H12309, así que la baja eficiencia podría estar relacionada con la combinación de factores negativos, sobretodo cuando éstos involucran a los dos *primers* de la pareja.

La correlación que existe entre la eficiencia y el tamaño de los fragmentos a amplificar, cuando se excluyen los fragmentos de 137 y 93pb, es negativa y relativamente débil, pero significativa según el análisis de regresión logística ( $\chi^2$  de la razón de verosimilitud= 5.712; g.l.= 1;  $P= 0.0169$ ). Esta correlación se pierde con la

---

inclusión en el análisis de los resultados atípicos de los dos fragmentos en cuestión ( $\chi^2$  de la razón de verosimilitud= 0.010; g.l.= 1;  $P= 0.9190$ ).

Por otra parte, la diferencia que existe entre las eficiencias de la amplificación de las regiones codificantes con las obtenidas para los fragmentos más largos de la región de control es bastante evidente (6.89% para el de 300pb y 17.43% para el de 231pb), no obstante, estas eficiencias no son comparables, pues hay que recordar que muchos de los extractos utilizados para la amplificación de las regiones codificantes habían demostrado previamente contener DNA amplificable.

En general, estos datos indican que el diseño de los *primers* puede tener un efecto negativo mayor que el tamaño del fragmento a amplificar, en el rango que va de los 93 a los 166pb (la baja eficiencia del fragmento de 166pb está influida por los numerosos intentos realizados con el individuo PV E-34, que resultaron negativos).

#### Población de origen

Los resultados del rendimiento en relación a la población de origen de las muestras no son informativos debido a que se analizaron muy pocos individuos de las poblaciones control. De la población IP se utilizaron dos extractos procedentes de dos individuos, y de las poblaciones CBB y PS únicamente se utilizó un extracto de cada una. Por lo tanto, los resultados presentados en la Tabla R-25 son prácticamente anecdóticos.

Población	Periodo	Alicuotas		
		Total	Positivas	%
Plaça Vella (PV)	S. XV – XVI d. C.	433	353	81.52
Can Bosch de Basea (CBB)	S. V – VI d. C.	9	9	100
Illot des Porros (IP)	S. VI – II a. C.	27	16	59.25
Paja Sola (PS)	2300 a. C.	12	7	58.33

**Tabla R-25** Eficiencia en la amplificación según la procedencia de la muestra.

---

### **Eficiencia en la reamplificación**

En lo referente a la reamplificación, 29 de las 69 muestras sujetas a reamplificación dieron un resultado positivo, lo que representa un 42.03%. Esta eficiencia es más baja respecto a la obtenida en la reamplificación de los fragmentos de la región de control y esto puede deberse a que para la amplificación de las regiones codificantes, se intentó la reamplificación de algunas muestras en las que no se había observado banda alguna en la primera amplificación. Esto fue necesario en las muestras en las que se consideraba importante verificar o aclarar un resultado anterior o verificar la correspondencia con los resultados inferidos a través de las substituciones de la región de control.

---

## Caracterización de los haplogrupos

En la Tabla R-26 se presentan los resultados de las reacciones de restricción para cada uno de los sitios analizados. En 23 de los 31 extractos que fueron amplificados y secuenciados para el fragmento del D-loop fue posible caracterizar el haplogrupo sin mayor problema. Dos extractos (3.25 de PV C-68 y 3.24 de PV C-56b), presentaron un patrón de sitios de restricción que no correspondió con ninguno de los haplogrupos buscados. Casos como estos han sido encontrados por otros autores y han sido definidos como “otros” (Torroni et al. 1996).

Sin embargo, el caso del individuo PV C-56b merece especial atención, pues como se ha descrito anteriormente, presenta una secuencia fuera de lo común y poco fiable. El hecho de que su patrón de sitios de restricción no sea compatible con ningún haplogrupo europeo puede entenderse desde las dos perspectivas expuestas en la sección anterior; por un lado si este DNA es de origen asiático, sería normal que no corresponda a ningún haplogrupo europeo, sin embargo no presenta el polimorfismo característico del super-haplogrupo asiático M (+10397*AhtI*). Por otra parte, también sería normal este resultado en el caso de que la secuencia haya sido producida por daño molecular, ya que si el daño es extenso, podría involucrar la pérdida (o la ganancia) de alguna de las dianas de restricción relevantes. Por lo tanto, los datos obtenidos del individuo PV C-56b no pueden ser utilizados hasta que no se realicen más investigaciones.

Para los extractos 2.1 (PV AJ-25); 13 (PV C-64) y 3.5 (PV C-6), que en general mostraron una eficiencia muy baja en la amplificación, no fue posible realizar una caracterización completa debido a que algunos de los fragmentos no fueron amplificados a pesar de los repetidos intentos. En otros casos, la caracterización fue incompleta o no se llevó a cabo debido a que los extractos estaban agotados o casi agotados. En los extractos 56 (PV C-56) y 78 (PV E-10) sólo había cantidad suficiente para amplificar un fragmento y del extracto 76 (PV C-48) no fue posible amplificar ningún fragmento.

Con el fin de obtener una información más completa y para corroborar los resultados, se analizaron otros 24 extractos independientes procedentes de 20 individuos, así que en total se analizaron 2 extractos para 17 individuos, 3 extractos para 2 individuos

y 4 extractos de un solo individuo; en tanto que para 11 individuos se analizó solamente un extracto de cada uno.

**Tabla R-26**

Individuo	Ext.	Sec.	Fragmento amplificado / Sitio de restricción									Haplogrupo
			X	V	H	W	K	E	U	J	T	
			1715 <i>Dde</i> I	4577 <i>Nla</i> III	7025 <i>Alu</i> I	8994 <i>Hae</i> III	9052 <i>Hae</i> II	10394 <i>Dde</i> I	12308 <i>Nin</i> I	13704 <i>Bst</i> 0I	15606 <i>Alu</i> I	
PV AJ-25	6	2.1	N.A.	+	+	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	-	no H, I, J, K, T, ni V
"	7	N.S.	N.A.	N.A.	N.A.	+	N.A.	-	(+)	N.A.	-	U?
PV T-26	8	2.3	N.A.	N.A.	-	N.A.	N.A.	+	-	N.A.	-	H?
PV C-56	56	4.60	---	---	+	---	---	---	---	---	---	<b>no H</b>
"	3.71	N.S.	+	+	+	+	-	+	+	+	-	<b>K</b>
"	2.25	N.A.	---	---	(-)	---	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	---	<b>H?</b>
PV E-30	60	4.61	+	+	+	+	-	+	+	+	-	K
"	55	N.A.	+	+	+	+	-	+	+	+	-	K
PV E-35	66	4.62	+	+	+	+	+	-	-	+	+	T
"	61	N.A.	+	+	+	+	+	-	-	+	+	T
PV C-45	67	4.63	+	+	+	+	+	+	-	-	-	J
"	62	N.A.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	J
PV C-58b	69	4.64	+	+	+	+	-	+	+	+	-	K
"	80	5.44	---	---	+	---	---	+	---	---	---	no H, posible I, J ó K
PV E-85	70	4.65	+	+	-	N.A.	+	-	-	+	-	H
"	2.16	N.A.	N.A.	---	N.A.	---	N.A.	N.A.	---	---	N.A.	---
PV C-64	13	4.66	N.A.	N.A.	N.A.	+	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	-	no T, no W
"	3.77	N.A.	+	+	+	+	+	-	+	+	-	U
PV C-48	76	4.79	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
"	3.65	N.A.	+	+	-	+	+	-	-	+	-	H
CBB 10-A	75	5.4	+	+	-	+	+	-	-	+	-	H
IP B-33	73	5.2	+	+	-	+	+	N.A.	-	+	-	H
PV E-10	78	5.42	---	---	+	---	---	---	---	---	---	no H
"	3.64	N.S.	+	+	+	+	+	-	-	+	+	T
PV C-13	79	5.43	N.A.	---	+	---	-	+	N.A.	N.A.	---	K
"	3.69	N.S.	+	+	-	+	+	-	-	+	-	<b>H</b>
"	26	N.S.	+	+	+	+	-	+	+	+	-	K
"	27	N.A.	+	+	+	+	-	+	+	+	-	K
PS H-510	2.1	5.46	+	+	+	+	+	-	N.A.	+	+	T
PV E-98	2.49	6.70	+	+	-	+	+	-	-	+	-	H
PV E-1	2.62	7.4	+	+	-	+	+	-	-	+	-	H
"	2.71	N.A.	+	+	-	+	+	-	-	+	-	H
PV E-80	2.63	7.5	+	+	-	+	+	-	-	+	-	H
PV C-16	16	7.73	+	+	+	+	+	+	-	-	-	J
"	34	N.A.	N.A.	---	+	---	N.A.	N.A.	---	---	N.A.	no H
"	30	N.A.	+	+	+	N.A.	+	+	-	-	-	J



**Tabla R-26** (continuación)

Individuo	Ext.	Sec.	Fragmento amplificado / Sitio de restricción									Haplogrupo
			X	V	H	W	K	E	U	J	T	
			1715 Dde I	4577 Nla III	7025 Alu I	8994 Hae III	9052 Hae II	10394 Dde I	12308 Ninf I	13704 Bst OI	15606 Alu I	
PV C-72	20	7.75	N.A.	+	-	+	+	-	-	N.A.	-	H
"	3.78	N.A.	N.A.	+	-	+	+	-	-	+	-	H
PV C-1	3.4	8.2	+	---	+	+	+	+	-	-	-	J
"	3.74	N.A.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	J
PV CE-39	3.6	8.4	+	+	+	+	-	+	+	+	-	K
"	3.70	N.S.	+	+	+	N.A.	-	+	+	+	-	K
PV E-40	3.7	8.5	+	-	+	+	+	-	-	+	-	V
PV C-68	3.25	8.26	+	+	+	+	+	-	-	+	-	Otro
PV C-6	3.5	8.98	+	N.A.	N.A.	N.A.	+	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	<b>no K, no X, no I</b>
"	3.68	N.A.	+	+	+	+	-	+	+	+	-	<b>K</b>
PV E-56b	3.24	9.1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	Otro
"	3.66	---	+	+	+	+	+	+	-	+	-	Otro
PV C-29	2.65	9.12	+	-	+	+	---	-	-	---	---	V
PV E-41-II	2.66	9.13	+	-	+	+	+	-	-	+	-	V
PV E-34	31	9.15	-	+	+	+	+	+	-	+	-	I
IP-C1AA	3.62	9.80	-	+	+	+	N.A.	-	-	N.A.	-	X
"	3.41	---	N.A.	---	+	---	N.A.	-	---	---	N.A.	no H, no J
PV E-47	3.76	9.94	+	+	-	+	+	-	-	+	-	H
"	3.17	---	+	+	-	N.A.	+	-	-	+	-	H

**Tabla R-26** Caracterización de los haplogrupos mediante la presencia (+) o ausencia (-) de 9 sitios de restricción. En **negrita** se muestran los resultados discordantes. Los extractos de cada individuo se presentan en el orden en el que fueron analizados. N.A.= alícuotas en las que no se obtuvo amplificación después de al menos un intento (ver Tabla R-20). Tres guiones (---) en los sitios de restricción indican que no se intentó la amplificación debido principalmente a que el extracto se había terminado. Algunos de los extractos amplificados para el fragmento del D-loop no fueron secuenciados.

En el caso del individuo PV C-56, los extractos analizados en segundo y tercer lugar (3.71 y 2.25) dieron resultados contradictorios entre sí y respecto al primero (56), lo que constituye una evidencia directa de contaminación. En similar situación se encuentra el individuo PV C-6 pues el segundo extracto analizado (3.68) dio un resultado contradictorio con el obtenido a partir del primero (3.5). En el caso del individuo PV C-13, el segundo extracto analizado (3.69) mostró un resultado contradictorio, pero al analizar otros dos extractos (26 y 27), fue corroborado el primer resultado.

Al igual que con los primeros extractos, en este segundo grupo se encontraron casos en los que la eficiencia fue muy baja o inexistente. En los extractos 80 (PV C-58b); 34 (PV C-16) y 3.41 (IP C1AA) se obtuvo una caracterización parcial y en el extracto 2.16 (PV E-85)

---

no se detectó DNA amplificable. Para el resto de extractos, la caracterización fue completa y no resultó contradictoria con la obtenida de los primeros extractos (Tabla R-26).

Así, para 27 de los 31 individuos analizados fue definido uno de los 9 haplogrupos europeos; para dos (PV C-68 y PV E-56b) no fue definido ninguno de ellos (agrupados como “otros”) y para los dos restantes (PV C-56 y PV C-6) no fue posible definir ningún haplogrupo de forma fiable, pues los resultados fueron contradictorios (Tabla R-26). En el caso de los individuos PV AJ-25 y PV T-26 el resultado debe tomarse con cierta precaución, ya que como se puede apreciar en las tablas R-20 y R-26 sus respectivos extractos mostraron una eficiencia muy baja en la amplificación de los segmentos codificantes, que son más pequeños que el fragmento de la región de control previamente amplificada. De acuerdo con Handt y col. (1994b; ver también Marco Teórico) “en el DNA antiguo se espera una relación inversa entre la eficiencia de la amplificación y la longitud del fragmento amplificado”.

En los 31 individuos analizados fueron encontrados 8 haplogrupos diferentes, a saber, H, K, T, J, U, V, I y X, mostrando una gran variabilidad. Esta alta variabilidad fue también observada entre las muestras que provenían del mismo grupo de extracción, excluyendo de esta forma un problema de contaminación general durante la extracción del DNA.

#### **Concordancia secuencia – haplogrupo**

En la Tabla R-27 se muestra el haplogrupo inferido mediante la secuencia y el haplogrupo caracterizado con enzimas de restricción.

De los 27 individuos en los que se caracterizó el haplogrupo, únicamente en el individuo IP C1AA se observó contradicción entre la secuencia y el haplogrupo. El haplogrupo X se caracteriza por la presencia de los polimorfismos 16223T y 16278T, que no presenta la secuencia del individuo IP C1AA, lo que indica la posibilidad de que haya ocurrido un evento de contaminación intra-extracto que puede estar relacionado, bien con la secuencia, bien con el haplogrupo o bien con ambos. La fiabilidad de la secuencia se ve

**Tabla R-27**

Individuo	Extracto	Secuencia	Haplogrupo Inferido	Haplogrupo Caracterizado
PV AJ-25	6	2.1	H,J,U	no H, I, J, K, T, ni V
"	7	---	---	U
PV T-26	8	2.3	H,J,U5	H
PV C-56	56	4.60	H,J,U	no H
"	3.71	---	---	K
"	2.25	---	---	H
PV E-30	60	4.61	K	K
"	55	---	---	K
PV E-35	66	4.62	H,J,U,T	T
"	61	---	---	T
PV C-45	67	4.63	H,J,U	J
"	62	---	---	J
PV C-58b	69	4.64	K	K
"	80	5.44	K	no H, posible I,J ó K
PV E-85	70	4.65	H,J,U	H
"	2.16	---	---	---
PV C-64	13	4.66	H,J,U	no T, no W
"	3.77	---	---	U
PV C-48	76	4.79	H,J,U	---
"	3.65	---	---	H
CBB 10-A	75	5.4	H,J,U	H
IP B-33	73	5.2	H,J,U	H
PV E-10	78	5.42	T (T2a)	no H
"	3.64	---	---	T
PV C-13	79	5.43	K	K
"	3.69	---	---	H
"	26	---	---	K
"	27	---	---	K
PS H-510	2.1	5.46	T	T
PV E-98	2.49	6.70	H,J,U	H
PV E-1	2.62	7.4	H,J,U6	H
"	2.71	---	---	H
PV E-80	2.63	7.5	H,J,U	H
PV C-16	16	7.73	H,J,U	J
"	34	---	---	no H
"	30	---	---	J
PV C-72	20	7.75	H,J,U,T	H
"	3.78	---	---	H

**Tabla R-27** (continuación)

Individuo	Extracto	Secuencia	Haplogrupo Inferido	Haplogrupo Caracterizado
PV C-1	3.4	8.2	H,J,U	J
"	3.74	---	---	J
PV CE-39	3.6	8.4	K	K
"	3.70	---	---	K
PV E-40	3.7	8.5	V	V
PV C-68	3.25	8.26	H,J,U	Otro
PV C-6	3.5	8.98	H,J,U4	no K, no X, no I
"	3.68	---	---	<b>K</b>
PV E-56b	3.24	9.1	?	Otro
"	3.66	---	---	Otro
PV C-29	2.65	9.12	V	V
PV E-41-II	2.66	9.13	V	V
PV E-34	31	9.15	H,J,U,I	I
IP-C1AA	3.62	9.80	H,J,U	<b>X</b>
"	3.41	---	---	no H, no J
PV E-47	3.76	9.94	H,J,U	H
"	3.17	---	---	H

**Tabla R-27** Comparación entre la caracterización del haplogrupo mediante la secuencia y mediante el análisis con enzimas de restricción. Los resultados contradictorios entre las caracterizaciones se indican en **negrita**.

cuestionada por la presencia de un sitio ambiguo (16318M), sin embargo, la caracterización del haplogrupo en el mismo extracto también es cuestionable, pues como se observa en las Tablas R-20 y R-26, la digestión relevante para el haplogrupo X (1715 Dde I) se llevó a cabo sobre una amplificación dudosa (X48). Desafortunadamente, a partir del segundo extracto analizado de este individuo no se obtuvo la información adecuada para distinguir si la contaminación está representada por la secuencia o por el haplogrupo. En cualquier caso, ni los resultados de la secuencia ni del haplogrupo de este individuo pueden considerarse para análisis posteriores hasta que no se confirme alguno de ellos mediante nuevas extracciones.

La concordancia de resultados para el individuo PV C-56 no pudo ser evaluada debido a que los tres extractos analizados con enzimas de restricción dieron resultados contradictorios. Este hecho también dificulta el esclarecimiento del tipo y origen de la

---

contaminación. En primer término, no se puede asumir que dentro del extracto 56 exista contaminación, pues sus resultados en los niveles de secuencia y de haplogrupo no son incompatibles. Por otra parte, en el segundo extracto analizado (3.71) se obtuvo un resultado completamente discordante con lo esperado según la secuencia del primero, indicando que al menos uno de los dos resultados no es auténtico. Para complicar más las cosas, el haplogrupo del tercer extracto (2.25) resultó compatible con la secuencia del primero, pero no con el haplogrupo ni del primero ni del segundo. Sin embargo, la determinación del haplogrupo del extracto 2.25 se llevó a cabo a partir de una amplificación deficiente, lo que provocó que el resultado de la restricción no fuese muy claro. La duda entonces, podría centrarse entre el extracto 56, que puede pertenecer a los haplogrupos J ó U (según los resultados de secuencia y haplogrupo) y el extracto 3.71 que contiene un DNA mitocondrial del haplogrupo K.

Ahora bien, el individuo PV C-6 se encuentra en una situación similar, pues la concordancia entre secuencia y haplogrupo no es incompatible dentro del mismo extracto (3.5), pero el haplogrupo del segundo extracto (3.68) si es incompatible, tanto con la secuencia como con el haplogrupo del primer extracto.

Cabe la posibilidad de que el resultado contradictorio de estos dos individuos esté relacionado, pues los extractos 3.68 (PV C-6) y 3.71 (PV C-56) fueron obtenidos utilizando las mismas soluciones *stock* y los dos fueron caracterizados como haplogrupo K, a pesar de que otros extractos obtenidos con las mismas soluciones hayan resultado ser de haplogrupos distintos. Si el DNA contaminante se encuentra muy diluido (como para pasar desapercibido en los blancos de extracción), sería normal que fuese detectado en algunas muestras pero no en otras, sobretodo en aquellas en las que la cantidad de DNA endógeno fuese mínima. En este sentido, al observar los resultados de los extractos 2.25 de PV C-56 y 3.5 de PV C-6 (Tabla R-20), salta a la vista la baja eficiencia que mostraron, indicando que en los restos de estos individuos el DNA es escaso o de mala calidad. Si se confirmara que la contaminación se produjo en los análisis posteriores, el primer resultado de ambos individuos podría ser válido, pero obviamente, no pueden ser considerados para ningún análisis en tanto no se investigue más al respecto.

---

Los resultados del individuo PV C-13 resultan interesantes porque después de analizar un segundo extracto, presentaba una situación similar a la descrita para los individuos anteriores. El extracto 79 de este individuo mostró una secuencia con los polimorfismos del haplogrupo K y la caracterización enzimática del extracto corroboró el resultado. No obstante, la caracterización enzimática del segundo extracto resultó contradictoria porque indicó que el DNA de este extracto pertenecía al haplogrupo H. Para aclarar esta situación fueron analizados dos extractos más (26 y 27) que habían sido obtenidos previamente. El haplogrupo de estos dos extractos resultó ser K, lo que corroboró, doblemente, el resultado del primer extracto. Cabe aclarar que tanto el extracto 79 como los 26 y 27 fueron obtenidos con soluciones *stock* distintas a las utilizadas para los extractos conflictivos (3.68 y 3.71).

En situación más delicada se encuentran los resultados del individuo PV CE-39, ya que el segundo extracto analizado (3.70) que resultó ser del haplogrupo K, en concordancia con la secuencia y el haplogrupo del primer extracto (3.6), fue extraído con las mismas soluciones *stock* que los extractos conflictivos (3.68 y 3.71). De hecho los extractos 3.70 y 3.71 fueron obtenidos incluso en el mismo proceso de extracción. Existe pues el riesgo de que la corroboración obtenida con el segundo análisis en este individuo sea falsa. No obstante, el extracto 3.6 fue obtenido utilizando distintas soluciones *stock* y presentó una buena eficiencia en la amplificación, indicando la existencia de DNA amplificable en este individuo. Así, aunque es prudente considerar este resultado como provisional, no existen motivos para descartarlo. Por otra parte, este caso ilustra uno de los posibles errores que se deben considerar cuando se utiliza la concordancia secuencia – haplogrupo como método de autenticación y será valorado más adelante, en la Discusión.

Otro caso que llama la atención, lo representan los individuos PV E-35 y PV C-72. Estos dos individuos presentaron la misma secuencia, con el polimorfismo 16294T, sin embargo, presentaron una caracterización enzimática diferente. El individuo PV E-35 resultó ser del haplogrupo T, un resultado corroborado con dos extractos independientes (66 y 61), en tanto que el individuo PV C-72 es del haplogrupo H, también según el

---

análisis de dos extractos (20 y 3.78). En realidad este resultado no es tan extraño, pues aunque el polimorfismo 16294T es típico del haplogrupo T, también se ha encontrado en individuos de otros haplogrupos como sustitución sin valor filogenético (Torroni et al. 1996). Esto, sin embargo, resalta la importancia de escoger adecuadamente los polimorfismos para predecir la pertenencia a los haplogrupos en base a la secuencia. En el caso del haplogrupo T, es necesario corroborar la presencia de sustituciones adicionales, como la 16126C, para alcanzar un mayor nivel de confianza en la predicción.

En este sentido, el individuo PV E-34 también resulta interesante, pues presentó en la secuencia una de las sustituciones típicas del I (16223T), además de la 16311C con escaso valor filogenético y la 16249C que corresponde al subgrupo U1. La caracterización enzimática a partir del mismo extracto (31) del que fue obtenida la secuencia, mostró que este individuo pertenece al haplogrupo I. Esto sugiere que la sustitución 16249C no es tan fiable para la predicción del haplogrupo al que pertenece una secuencia. Por otra parte, el polimorfismo 16223T tiene el problema de su antigüedad evolutiva, pues lo presentan todos los haplogrupos africanos, los europeos X, W e I, y el asiático M. En este caso, la localización geográfica de la muestra puede ayudar bastante en la predicción del haplogrupo, tal y como indican Francalacci y col. (1999).

El resto de individuos no presentó contradicción alguna entre lo esperado a partir de la secuencia y lo obtenido con la caracterización enzimática, ya sea dentro del mismo extracto, en relación a otro extracto o en relación a los dos o más extractos analizados.

Usando el criterio de la concordancia fue autenticado el mtDNA de 27 individuos diferentes, en tanto que el procedente de 4 mostró ser de origen incierto, incluyendo el del individuo PV C-56b. De estos 27 individuos, 24 provienen de la necrópolis de la Plaça Vella y los 3 restantes de las poblaciones control.

## Variabilidad del mtDNA en la Plaça Vella

### Secuencias

Las secuencias de los 24 individuos de la Plaça Vella de Terrassa cuyo mtDNA fue autenticado, se presentan en la Tabla R-28. Se encontraron 12 sitios variables, todos ellos representados por transiciones, que en 6 sitios fueron del tipo T->C, en 4 del tipo C->T, en uno del tipo A->G y en otro del tipo G->A.

Extracto	Individuo	Sec.	Posición	
				Haplogrupo
			11111111111111	
			66666666666666	
			2222222222223	
			112247999901	
			393490467841	
	CRS		GACTTCCCTTTT	
6	PV AJ-25	2.1	.....C.	U
8	PV T-26	2.3	.....T.....	H
60	PV E-30	4.61	...C.....C	K
66	PV E-35	4.62	.....T.....	T
67	PV C-45	4.63	.....	J
69	PV C-58b	4.64	...C.....	K
70	PV E-85	4.65	.....	H
13	PV C-64	4.66	.....C	U
76	PV C-48	4.79	.....	H
78	PV E-10*	5.42	.....TTC.C.	T2a
79	PV C-13	5.43	...C.....C	K
2.49	PV E-98	6.70	A.....	H
2.62	PV E-1	7.4A	G.....	H
2.63	PV E-80	7.5	.....	H
16	PV C-16	7.73	.....	J
20	PV C-72	7.75	.....T.....	H
3.4	PV C-1	8.2	.....	J
3.6	PV CE-39	8.4	...C.....C	K
3.7	PV E-40	8.5	.....C..	V
3.25	PV C-68	8.26	.....	Otro
2.65	PV C-29	9.12	.....C..	V
2.66	PV E-41-II	9.13	.....C..	V
31	PV E-34	9.15	..T.C.....C	I
3.76	PV E-47	9,100	A.....	H

**Tabla R-28** Secuencias y haplogrupos de los DNAs mitocondriales autenticados de los individuos de la Plaça Vella.



---

Se encontraron en total 12 secuencias diferentes (50%), de las cuales 7 son únicas, 2 están representadas por dos individuos cada una, 2 están presentes en 3 individuos cada una y una la comparten 7 individuos. Esta última, la más común, es idéntica a la secuencia de referencia, sin embargo, no todos los individuos que la presentan pertenecen al mismo haplogrupo.

Este hecho no es sorprendente pues en el segmento analizado no existen sustituciones particulares que definan los haplogrupos H, J y U. Además, este segmento es relativamente pequeño, lo que incrementa la posibilidad de encontrar secuencias iguales.

De estos 7 individuos, 3 pertenecen al haplogrupo J, 3 al H y uno a “otro”, lo que indica que a pesar de que las secuencias sean iguales para este fragmento, en realidad representan tipos mitocondriales distintos, y es probable que contengan diferentes sustituciones en otros sitios.

Esta observación es importante a la hora de valorar la probabilidad de que estas secuencias provengan de eventos de contaminación y retomaremos este punto en la Discusión.

Variabilidad de las secuencias dentro de los haplogrupos.

En la Tabla R-28b se presentan las secuencias ordenadas de acuerdo al haplogrupo al que pertenecen con el fin de observar la variabilidad intra-haplogrupo.

En las ocho secuencias del haplogrupo H, se encontraron 5 secuencias diferentes, de las cuales 3 son únicas, una la presentaron dos individuos y una coincide en 3 de ellos. En las cuatro correspondientes al haplogrupo K, existen dos secuencias diferentes y sólo

una de ellas es única. Las dos secuencias del haplogrupo T y las dos del U son diferentes, en tanto que en las secuencias de los haplogrupos J y V no existe variabilidad. La única secuencia del haplogrupo I es diferente a todas las demás.

Extracto	Individuo	Sec.	Posición	
			11111111111111	66666666666666
			2222222222223	112247999901
			393490467841	Haplogrupo
	CRS		GACTTCCCTTTT	
6	PV T-26	2.3	.....T.....	H
8	PV E-85	4.65	.....	H
60	PV C-48	4.79	.....	H
66	PV E-98	6.70	A.....	H
67	PV E-1	7.4	AG.....	H
69	PV E-80	7.5	.....	H
70	PV C-72	7.75	.....T.....	H
13	PV E-47	9.100	A.....	H
76	PV E-34	9.15	..T.C.....C	I
78	PV C-45	4.63	.....	J
79	PV C-16	7.73	.....	J
2.49	PV C-1	8.2	.....	J
2.62	PV E-30	4.61	...C.....C	K
2.63	PV C-58b	4.64	...C.....	K
16	PV C-13	5.43	...C.....C	K
20	PV CE-39	8.4	...C.....C	K
3.6	PV E-35	4.62	.....T.....	T
3.7	PV E-10*	5.42	.....TTC.C.	T2a
3.25	PV AJ-25	2.1	.....C.	U
2.65	PV C-64	4.66	.....C	U
2.66	PV E-40	8.5	.....C..	V
31	PV C-29	9.12	.....C..	V
3.76	PV E-41-II	9.13	.....C..	V
3.25	PV C-68	8.26	.....	Otro

**Tabla R-28b** Secuencias de los individuos de la Plaça Vella ordenadas según el haplogrupo al que pertenecen.

### Haplogrupos

En la muestra formada por los 24 individuos están representados 7 de los 9 haplogrupos europeos: H, K, T, J, U, V e I. Ocho individuos pertenecen al haplogrupo H,

4 al K, 3 al J, 3 al V, 2 al T, 2 al U, 1 al I y uno a “otro” (Tabla R-29). En general esta variabilidad es incompatible con la posibilidad de que haya sido producida por un evento de contaminación. Por otra parte, la distribución de los haplogrupos en los individuos de la Plaça Vella, es similar a la encontrada en otras poblaciones europeas (ver la sección de análisis estadístico y filogenético). El haplogrupo H resultó ser el más representado, tal como se espera en poblaciones europeas. Otros haplogrupos frecuentes como el U, el T, el K ó el J, están bien representados en nuestra muestra, en tanto que los haplogrupos raros W y X no fueron encontrados y el I, resultó pobremente representado.

Haplogrupo	N	%
H	8	33.3
I	1	4.2
J	3	12.5
K	4	16.7
T	2	8.3
U	2	8.3
V	3	12.5
W	0	0.0
X	0	0.0
Otro	1	4.2
<b>Total</b>	<b>24</b>	

**Tabla R-29** Frecuencia de los haplogrupos en la muestra de 24 individuos de la Plaça Vella.

Es interesante destacar la alta frecuencia del haplogrupo V, ya que es compatible con la hipótesis de que éste tuvo su origen en la península Ibérica, pues ha sido encontrado con alta frecuencia en población vasca y catalana (Torrioni et al. 1998b).

El haplogrupo K presenta una frecuencia particularmente alta en relación a otras poblaciones Europeas, no obstante, un cierto grado de fluctuación en la frecuencia de los diferentes haplogrupos es observable en todas las muestras. Lo mismo puede decirse respecto a la relativa baja frecuencia del haplogrupo H, aunque esta baja frecuencia podría deberse también al hecho de haber eliminado los individuos PV C-56 y PV C-6, que por su secuencia podrían pertenecer a este haplogrupo; sobretodo si se tiene en

---

cuenta que el evento de contaminación por el cual fueron eliminados, pudo haber sido producido en las extracciones y/o amplificaciones subsecuentes.

En cualquier caso, existen otros factores que también pueden explicar las particularidades que presenta determinada muestra, como la consanguinidad y otros efectos poblacionales tales como la deriva y el efecto “fundador”. En este sentido sería muy interesante investigar sobre la posibilidad de relaciones familiares en la población de la Plaça Vella, utilizando el estudio de microsatélites. De hecho, hemos realizado algunos análisis preliminares en colaboración con el Laboratorio de Identificación Genética del Departamento de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, utilizando el locus F13A y el locus VWA, no obstante, por el momento no ha sido posible obtener resultados positivos.

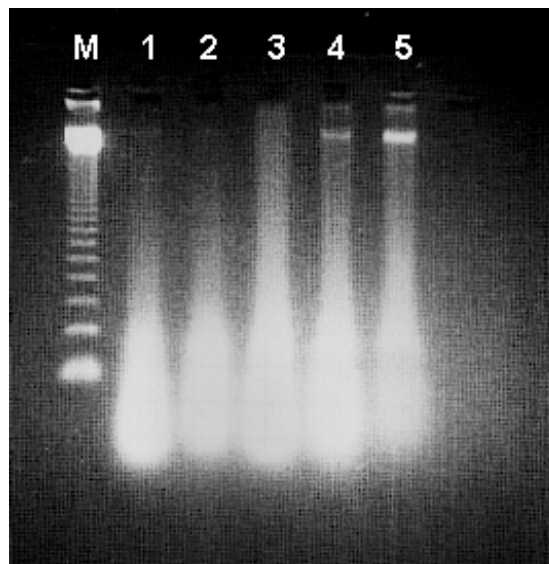
Un análisis de la variabilidad, tanto de las secuencias como de los haplogrupos, será realizado con profundidad en una sección posterior, utilizando métodos estadísticos para evaluar las diferencias que puede presentar esta población en relación a otras poblaciones ibéricas, mediterráneas y europeas.

---

## Extracción de DNA de la hidroxiapatita del hueso

Para el protocolo de extracción de la hidroxiapatita (EDH) se utilizaron distintas muestras de un individuo de la Plaça Vella (PV AJ-25), usando las cuatro concentraciones del tampón de fosfato. La electroforesis en el gel de agarosa reveló la presencia de DNA en los extractos de los cuatro tampones. En la Figura R-4 se muestra el DNA recuperado con 3 de los tampones utilizados. El haber obtenido una cantidad importante de DNA con los tampones de baja concentración (0.14 y 0.16 M) es bastante interesante, pues en teoría, con estas concentraciones únicamente puede ser eluído el DNA de cadena sencilla. Son necesarios más experimentos para corroborar que este DNA sea monohebra y por otro lado, para indagar sobre su posible origen, ya que podría tratarse de DNA de microorganismos.

El polvo de hueso utilizado para la extracción del DNA de la hidroxiapatita, fue usado para una segunda extracción de DNA mediante el protocolo UAB-2, con el fin de



**Fig. R-4** Extracción de DNA de muestras de hueso utilizando el protocolo EDH (1-3) y el protocolo UAB-2 (4 y 5) a partir de las mismas muestras. M= múltiplos de 123pb (Sigma); 1= EDH tampón de 0.14 M; 2= EDH tampón de 0.16 M; 3= EDH tampón de 0.36 M; 4= UAB-2 de la muestra utilizada para extraer el DNA del carril 1; 5= UAB-2 de la muestra utilizada para extraer el DNA del carril 3. El DNA extraído de la hidroxiapatita es mayoritariamente de bajo peso molecular. El DNA restante presenta también una banda de alto peso molecular.

---

averiguar si era posible recuperar más DNA y en qué cantidad. Se obtuvo bastante DNA en la segunda extracción (Fig. R-4), que notablemente presentaba una mayor cantidad de DNA de alto peso molecular respecto al obtenido de la hidroxiapatita. Esto indica que existe una cantidad importante de DNA que no es preservado unido a la fracción mineral, lo que podría apoyar la teoría de la “momificación celular”. No obstante, este DNA puede provenir también de microorganismos, sobre todo el de alto peso molecular.

Con el fin de indagar la procedencia, tanto del DNA extraído de la hidroxiapatita como del obtenido con el protocolo UAB-2, se realizó un intento de amplificación del fragmento de 231pb de la región de control a partir de estos extractos. Desafortunadamente no fue posible amplificar ninguna de las muestras, sin embargo, este resultado no es concluyente debido a la posibilidad de que haya ocurrido inhibición. En todo caso, estos primeros resultados abren una vía de investigación que puede ayudar a esclarecer los mecanismos de la preservación del DNA. Por otra parte, protocolos como el EDH, pueden ser la elección en restos muy antiguos, en los que la fracción orgánica sea mínima.

---

## Inhibidores de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

### Absorción de luz

La muestra de DNA antiguo analizada después del “almacenamiento frío” presentó un pico de absorción a 260nm, característico del DNA (Fig. R-A1; Pag. 296); sin la presencia notoria de ningún otro incremento en la absorción que pudiese indicar la existencia de sustancias contaminantes. Sin embargo, en el espectro de otro extracto analizado se observó una “espalda” a 240nm que podría indicar la presencia de las sustancias inhibitorias y un pico a 280nm que podría corresponder a las proteínas (Fig. R-A2). Es posible que en esta muestra el pico del DNA esté oculto por el aumento de la absorción alrededor de los 240nm.

La diferencia entre los dos extractos podría deberse a que la cantidad de sustancias inhibitorias en el segundo de ellos era más elevada que en el primero y esto podría indicar que sólo una fracción de las sustancias contaminantes puede ser retenida en el tubo debido a la acción del frío, un punto a tener en cuenta para definir los límites del método del “almacenamiento frío”.

Los residuos obtenidos después del almacenamiento en nevera mostraron un espectro con signos claros de absorción de luz, indicando la presencia de alguna sustancia que permaneció en el tubo después de retirar el extracto una vez transcurridos los tres días a 4°C.

En la Figura R-A3 se observa un aumento de la absorción a 210nm y picos a 240 y 280nm, con una intensidad mayor que la observada en el extracto de DNA. Es posible observar también un ligero aumento de la absorción a los 260nm, aunque no llega a constituir un pico bien definido quizá por quedar oculto por el pico de 240nm. No

---

obstante, una de las características que llaman más la atención, son los picos invertidos, o *gaps*, que se observan a 488, 582 y 658nm, ya que podrían indicar algún tipo de emisión de luz, motivo por el cual se decidió realizar el espectro de emisión de fluorescencia de los residuos.

### **Emisión de fluorescencia**

#### Residuos después del “almacenamiento frío”

En los residuos obtenidos después del “almacenamiento frío” se observó un pico de emisión alrededor de 347nm, un pico amplio entre 420 y 440nm y un pico de menor tamaño alrededor de los 685nm; en tanto que excitando a 390nm se observó un solo pico alrededor de los 450nm. Los espectros obtenidos de residuos de extractos de hueso de individuos de la Plaça Vella, no presentaron diferencias importantes entre sí, a pesar de haber sido obtenidos con distintos protocolos (Fig. R-E1; Pag. 298). Únicamente destaca un ligero desplazamiento del segundo pico de los residuos del extracto obtenido con el protocolo de Persson. Con dicho protocolo, la separación de los inhibidores se realiza mediante la precipitación selectiva del DNA con espermidina, por lo tanto este ligero desplazamiento puede deberse a la presencia de algún rastro de esta sustancia. En cualquier caso la consistencia del patrón que presentan las diferentes muestras indica que se purifica la misma sustancia sin importar el protocolo utilizado.

En los espectros que presentan los residuos de los extractos de dientes (Fig. R-E2), no se observaron diferencias entre las muestras procedentes de distintas poblaciones, lo que constituye una clara evidencia de que en las piezas dentales existe la misma sustancia, sin importar la procedencia de la muestra.

Sin embargo, a pesar de que el patrón que presentan los residuos de los extractos de huesos y dientes es bastante similar, existen diferencias cualitativas importantes que



---

podrían indicar la presencia de sustancias diferentes en huesos y dientes. La diferencia está dada por la intensidad de fluorescencia del segundo pico (localizado entre los 420 y 440nm), que presenta una intensidad de fluorescencia mayor o menor respecto al primer pico de emisión (situado en los 347nm) según el tipo de muestra analizada. En los residuos de huesos, el segundo pico es más intenso que el primero en tanto que en los dientes, la intensidad del primer pico es mayor que la del segundo (Fig. R-E3). Este puede ser un dato importante que podría explicar la baja eficiencia en la amplificación de DNA de hueso obtenida en este trabajo y observada por otros investigadores ya citados.

La diferencia de los espectros de los residuos de huesos y dientes no es tan evidente con una longitud de onda de excitación de 390nm (Figuras R-E4 y R-E5), sin embargo, en los espectros de las muestras procedentes de hueso se observa un ligero abultamiento que podría representar un pico oculto situado alrededor de los 500nm, que no es tan notorio en los residuos de piezas dentales.

Estas diferencias podrían deberse a que en huesos y dientes existan dos sustancias diferentes, pero también serían explicadas en caso de que en los huesos existiera otra sustancia además de la que existe en los dientes. Otra hipótesis que podría explicar estas diferencias es la posibilidad de que se trate de dos variantes de la misma sustancia, lo que no sería raro si se tratase de sustancias poliméricas, como los ácidos húmicos, los ácidos fúlvicos o los productos de la reacción Maillard.

#### Residuos obtenidos antes del “almacenamiento frío”

Los residuos de los extractos de piezas dentales obtenidos antes de ser sometidos al “almacenamiento frío” mostraron el mismo patrón que los obtenidos después de este paso, no obstante, existen diferencias cuantitativas importantes. Los residuos de los extractos sin “almacenamiento frío” mostraron una intensidad de fluorescencia mucho menor, muy marcada en el segundo pico del espectro de excitación a 310nm (Fig. R-E6), aunque también evidente en los dos picos restantes (Fig. R-E7). La diferencia de

---

intensidad no fue tan notoria cuando se excitó a 390nm, pero en general también fue menor en los residuos obtenidos sin someter los tubos a la acción del frío, ya que se obtuvieron valores de intensidad de 70 a 115 a.u., con una media de 89 (Fig. R-E8), en tanto que en las muestras sometidas a “almacenamiento frío” se obtuvieron valores de entre 106 y 219 a.u., con media de 159. Aunque los datos son pocos, la diferencia entre las medias es significativa (prueba *t* para varianzas desiguales;  $t= 3.635$ ; g.l.= 4.9;  $P= 0.0156$  / prueba no paramétrica de Mann-Whitney;  $P= 0.011$ ).

Otra característica interesante de los resultados de los residuos sin “almacenamiento frío”, es que presentan una menor variabilidad, al grado de que su varianza es significativamente diferente (menor) que la obtenida con los residuos después del “almacenamiento frío” (prueba de F para la igualdad de varianzas; razón de  $F= 7.52$ ;  $P= 0.482$ ). Esto indica que la cantidad de residuos que permanecen en el tubo, cuando no se aplica el frío, es más o menos constante, independientemente de la concentración inicial, lo cual es normal si no existe un mecanismo que induzca la precipitación; en cambio, la mayor variabilidad que se observa cuando se aplica el frío puede deberse a las variaciones en la concentración inicial de las sustancias en la solución y/o a una velocidad diferente de precipitación o de formación de micelas.

En cualquier caso, la menor intensidad de fluorescencia indica la presencia de una cantidad menor de residuos en los tubos que no han sido sometidos a la acción del frío, lo que constituye una evidencia directa de que el almacenamiento en nevera promueve la precipitación o la adhesión de las sustancias a las paredes del tubo. Sin embargo, con estos datos no es posible dilucidar el mecanismo preciso por el cual pierden solubilidad las sustancias inhibitorias. En la Fig. R-E9 se comparan los espectros típicos de cada grupo.

---

## **Análisis comparativo**

### Porfirinas o subproductos de su degradación

En general, las porfirinas y metaloporfirinas muestran dos absorciones principales en la región de la luz visible, que comprenden una serie de bandas de moderada intensidad aproximadamente a los 550nm y una banda de gran intensidad cerca de los 400nm (Rest, 1982). El espectro de absorción de la mesoporfirina IX dihidroclorada mostró una banda a 390nm (Fig. R-A4; Pag. 297), claramente diferente a las encontradas en los residuos de los extractos de DNA antiguo. Por otra parte, el espectro de fluorescencia con excitación a 390nm mostró un pico intenso a 609nm (Fig. R-E10, Pag. 302) que tampoco fue observado en los residuos.

### Productos de la reacción Maillard

Estos productos poliméricos de coloración marrón pueden mostrar un nivel moderado de quimioluminiscencia (Dills, 1993). Wondrak y col. (1995) describieron el espectro de fluorescencia de algunos productos Maillard, que mostraron dos picos amplios alrededor de los 500 y 695nm, que no coinciden con la emisión de fluorescencia de los residuos de los tubos analizados en este trabajo. Sin embargo, Nagaraj y Monnier (1992) observaron en este tipo de productos la emisión de fluorescencia a 440nm, excitando a 366nm. Estas diferencias parecen indicar que la gran variedad en la composición de estos productos involucra también una diversidad de respuestas en los espectros de absorción y emisión de luz. Por lo tanto, queda abierta la cuestión de si el pico observado en los residuos excitando a 390nm pudiese corresponder a alguno de los productos de la reacción Maillard.

---

## Ácidos húmicos y fúlvicos

Los espectros de las soluciones de los ácidos húmicos y fúlvicos presentaron una zona de absorción intensa desde los 208 a los 350nm, en el caso de los ácidos fúlvicos (Fig. R-A5) y hasta 400nm en el caso de los ácidos húmicos (Fig. R-A6). Además, los ácidos húmicos mostraron cierta absorción a 242 y 280nm que podría coincidir con la observada en los espectros de absorción de los residuos. En ambos compuestos también fueron observados picos invertidos muy similares a los que presentaron los residuos de los tubos de los extractos.

Los espectros de fluorescencia de ambos ácidos mostraron en general el mismo patrón de emisión. Excitando a 310nm (Fig. R-E11) se observaron tres picos con un patrón similar al observado en los residuos de los extractos de hueso. El primer y tercer pico coinciden completamente y la diferencia está dada por el segundo pico, que en los ácidos se encuentra desplazado hacia una longitud de onda mayor (498nm) respecto al observado en los residuos. Sin embargo, en este pico también se observa una “espalda” alrededor de los 445nm indicando la presencia de un pico, que podría ser similar al observado en los residuos de los extractos de DNA, si no estuviese eclipsado por la importante emisión que se observa a 498nm. En la Fig. R-E12 se compara el espectro de los ácidos con los que presentaron las muestras de residuos de hueso y diente.

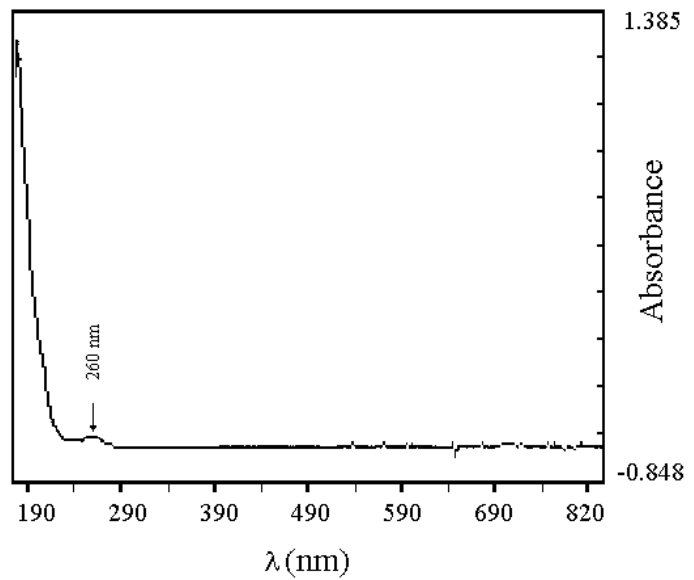
En el espectro de fluorescencia que presentaron los ácidos con excitación a 390nm se observó una banda importante entre 420 y 520 nm (Fig. R-E13), resultado que concuerda con lo publicado por otros autores (MacCarthy y Rice, 1985). Cuando se analizaron las soluciones de menor concentración, se observó la presencia de dos picos en esta región del espectro, lo que podría ser explicado por la presencia de dos tipos de sustancias o de dos variantes de la misma sustancia; una de ellas con una emisión menor que quedaría completamente oculta por la otra cuando la concentración de ambas es mayor. De estos dos picos, el de menor longitud de onda es similar al observado en los residuos de los extractos de huesos y dientes; en tanto que el pico de longitud de onda

---

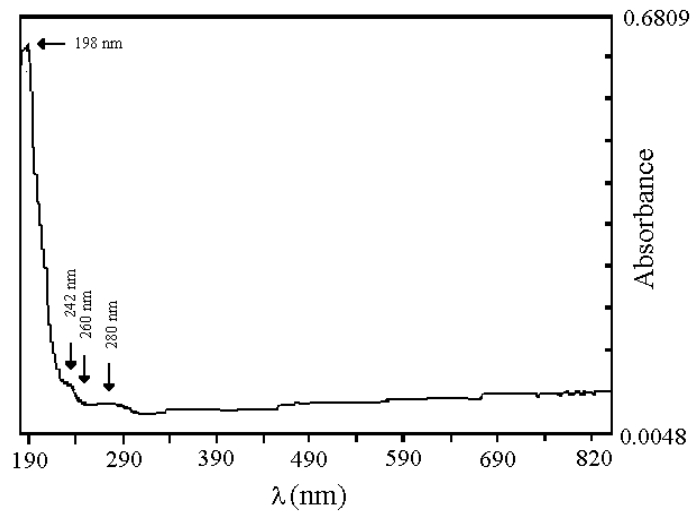
mayor podría coincidir con el abultamiento que se observa en los espectros de hueso (Fig. R-E14).

Al igual que en el caso de los productos Maillard, queda abierta la posibilidad de que las sustancias encontradas en huesos y dientes representen una fracción de los ácidos húmicos o fúlvicos. Opción razonable si consideramos que estas sustancias han debido pasar por el proceso de extracción de DNA, que involucra entre otros procedimientos, el tratamiento con solventes orgánicos.

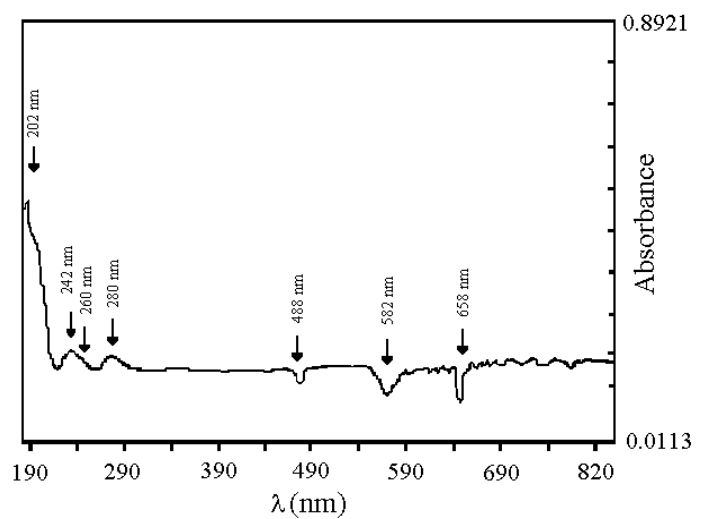
**Figura R-A1** Espectro de absorción de luz (UV-vis) de extractos de DNA después del “almacenamiento frío”.

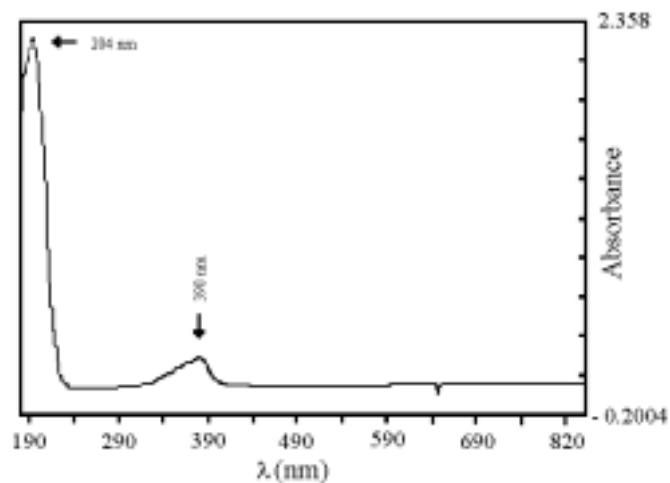


**Figura R-A2** Espectro de absorción de luz (UV-vis) de extractos de DNA después del “almacenamiento frío”.

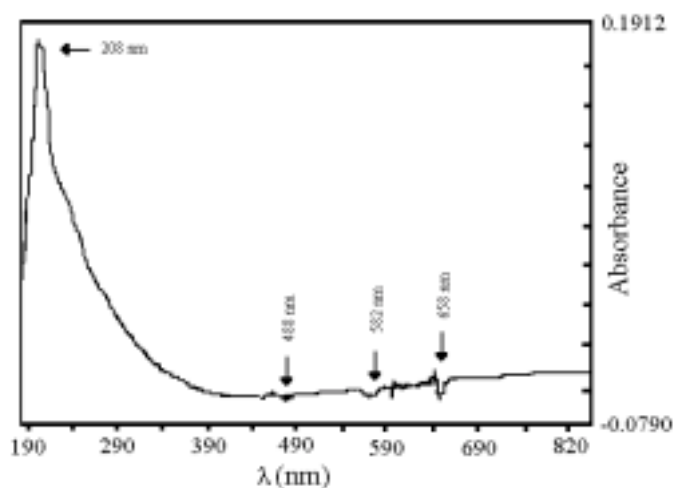


**Figura R-A3** Espectro de absorción de luz (UV-vis) de los residuos de los tubos. Son notables los picos invertidos en la zona de la luz visible.

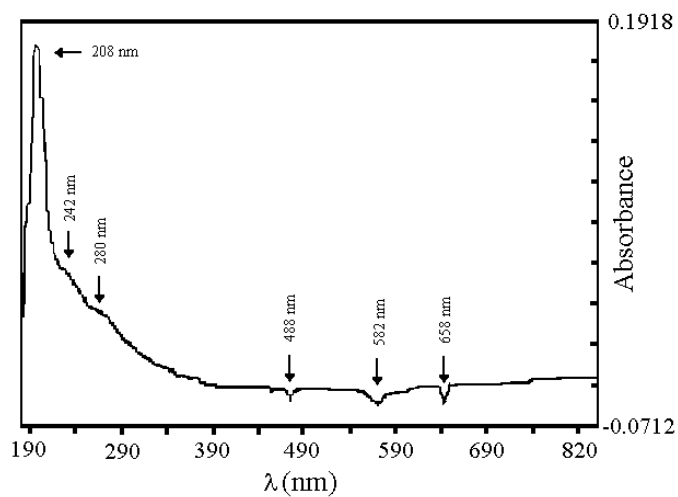




**Figura R-A4** Espectro de absorción de luz (UV-vis) de la mesoporfirina IX dihidroclorada en medio básico.



**Figura R-A5** Espectro de absorción de luz (UV-vis) de los ácidos fúlvicos.



**Figura R-A6** Espectro de absorción de luz (UV-vis) de los ácidos húmicos. Son notables los "hombros" a 242 y 280nm, similares a los observados en la Fig. R-A2