

Estudio Diacrónico de la Variabilidad del DNA Mitocondrial en Población Catalana

Tesis Doctoral

Rafael Montiel Duarte

Barcelona, noviembre de 2000

Estudio Diacrónico del DNA Mitocondrial en Población Catalana

Memoria presentada por **Rafael Montiel Duarte** para optar al título de Doctor en Biología, dentro del programa del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección de los Doctores **Asunción Malgosa Morera** de la Unitat d'Antropologia del Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona y **Paolo Francalacci** del Instituto di Antropologia de la Università di Sassari.

Asunción Malgosa Morera

Paolo Francalacci

Rafael Montiel Duarte

Barcelona, noviembre de 2000

*Una esletxa
potser el començament
d'un espai infinit*

(anònim)

a Paqui

Quiero agradecer a las siguientes personas su importante colaboración:

A los Drs. Jordi Marquet y Gerard Marqués, del Departament de Químiques de la UAB, por su ayuda y discusión en el análisis espectrofotométrico.

Al Dr. Josep María Alcañiz por proveer los ácidos húmicos y fúlvicos y por la enriquecedora discusión sobre el tema.

A Anna López del Departament de Matemàtiques de la UAB por su inestimable ayuda y asesoría en los cálculos de probabilidad.

A Carme Rissech por su colaboración en la primera etapa de este trabajo, especialmente por el esfuerzo para iniciar la línea de investigación y por su ayuda en la puesta a punto de los protocolos. Además, por las discusiones y el apoyo brindado hasta la finalización de la tesis.

A Finuqui Zapata de la Universidad de Murcia por las importantes discusiones sobre el DNA antiguo y por brindar material antiguo para su análisis.

A Víctor Macías del Departamento de Genética del CINVESTAV-IPN (México) por facilitar el acceso a sus protocolos y datos no publicados.

También quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Asunción Malgosa por brindarme la oportunidad de desarrollar un tema tan interesante y por la confianza que depositó en mi; y al Dr. Paolo Francalacci por su acertada orientación, por sus enseñanzas sobre el DNA antiguo y los haplogrupos mitocondriales y por su amable hospitalidad durante las estancias en Sassari.

Asimismo quiero mostrar mi más amplia gratitud a todas las personas que de alguna u otra forma han estado conmigo en esta odisea: *els habitants* del B-105 (1992-1993) i del E-205 (1993-1995), especialmente a mi entrañable amigo Joanjo por esas largas veladas de discusión; a Cristina, Eva, Carme A., Xavi, Rodrigo, Costa y otros personajes ilustres que enriquecieron mi estancia en la Vila Universitària y en Cerdanyola; a Julián Méndez que ha tenido mucho que ver en la finalización de la tesis; a Elisa y Rafael por haberme inculcado de forma irrevocable, ciertos principios; a Gerardo, Raúl, Alberto, Fernanda, Martha Rodríguez y otros amigos de México por su apoyo constante que crecía en los momentos más bajos; a Gemma por las discusiones metodológicas en el laboratorio; a todos los compañeros de la Unidad de Antropología por sus consejos y apoyo; y a Paqui, para quien no tengo palabras suficientes.

Finalmente quiero agradecer al CONACYT de México por el soporte económico recibido durante tantos años.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	9
<i>Propiedades del DNA mitocondrial</i>	11
Organización genómica	11
Elevado número de copias	12
Transmisión por línea materna	13
Homoplasmía y heteroplasmía	16
Segregación de alelos	19
Tasa de evolución	21
Métodos filogenéticos	24
Métodos basados en modelos teóricos	30
Métodos empíricos	32
Evolución no neutral	35
Inserciones en el genoma nuclear	38
Polimorfismos	40
<i>DNA antiguo</i>	43
Historia	43
Trabajos de investigación	44
Esfuerzos conjuntos	52
Características fisicoquímicas del DNA antiguo	53
Fragmentación	53
Daño molecular	55
Cuantificación del aDNA	59
Degradación orgánica y preservación del DNA	62
Conservación de los tejidos	62
Preservación del DNA	63
Prospección molecular	77
Análisis histológicos	78
Microscopía óptica y electrónica	79
Citometría de flujo	79
Cromatografía de gas/espectrometría de masa	80
Racemización de aminoácidos	81
Otras posibilidades	82
Problemas metodológicos	82
Dificultad en la estandarización de los protocolos	83
Tamaño limitado de los segmentos	83
Escasez del DNA extraído y problemas en la cuantificación	84
Presencia de inhibidores	84
Contaminación con DNA exógeno	88
El efecto <i>carrier</i>	91

Autenticidad	92
Secuenciación directa	94
Aplicaciones y perspectivas	95
Zoología y Botánica	95
Medicina Forense	96
Datos de relevancia arqueológica y antropológica	97
Migraciones y genealogía de poblaciones humanas	99
Evolución molecular	100
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa ó PCR</i>	<i>102</i>
Principios teóricos	103
Polimerasas termoestables	106
Resultados sub-óptimos	107
Baja eficiencia	107
Amplificaciones inespecíficas	107
Oligomerización de los cebadores	108
Artefactos	109
Optimización de la reacción	110
Componentes del tampón de reacción	110
Perfil de los ciclos	111
Diseño de los cebadores	112
Estrategias para una mayor especificidad	113
Nested PCR	113
Hot start PCR	114
Touch down PCR	115
Otras aplicaciones y estrategias del PCR	115
Contaminación cruzada (<i>carryover</i>) y su prevención	116
Luz UV	118
dUTP y Uracil N-glicosilasa	120
Residuos de ribosa en el extremo 3'	121
PCR y DNA antiguo	122
Jumping PCR	123
Pre-PCR	125
PCR cuantitativa	126
MARCO DE REFERENCIA	129
<i>Estudios de la variabilidad del mtDNA en poblaciones humanas</i>	<i>131</i>
Distancias genéticas y reconstrucción filogenética	132
Distribución de las diferencias por parejas	139
Estudios de la variabilidad del mtDNA en poblaciones europeas	143
Origen de la variabilidad genética en Europa	144
El mtDNA y la expansión del Paleolítico	145
Las frecuencias alélicas y la expansión del Neolítico	149

El origen del hombre anatómicamente moderno en Europa	151
<i>La población de estudio</i>	153
OBJETIVOS	155
<i>Objetivo general</i>	157
<i>Objetivos particulares</i>	157
MATERIAL Y MÉTODOS	159
MATERIAL DE ESTUDIO	161
<i>Poblaciones</i>	161
Población antigua	161
Población actual	162
Poblaciones control	163
MÉTODO: DNA ANTIGUO	164
<i>Muestreo</i>	164
<i>Control de la contaminación</i>	165
Separación del trabajo: pre y post-PCR	165
Material de un solo uso	166
Limpieza del posible DNA contaminante	166
Limpieza de las áreas de trabajo	166
Limpieza de las piezas dentales	166
Limpieza del material de dentista	167
Limpieza de los huesos	168
Esterilización del material de vidrio	168
Otras precauciones	169
Preparación de las soluciones	169

Controles positivos y negativos	170
<i>Puesta a punto de la técnica de extracción de DNA</i>	<i>172</i>
Obtención del tejido	172
Extracción del DNA	172
UAB-1	173
CINVESTAV, CINVESTAV/PK y CINVESTAV-UAB	174
UAB-2	175
Mini-Extracción (UAB)	176
Otros protocolos	177
Persson (1992)	178
Extracción de DNA de la Hidroxiapatita (EDH)	179
Extracción mediante Formamida	180
Pääbo y col. (1988)	181
<i>Inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa</i>	<i>182</i>
Superar la acción inhibitoria	182
Caracterización de los inhibidores: espectrofotometría	182
Espectros de absorción de luz	183
Espectros de emisión de luz	184
<i>Preparación de las reacciones de amplificación</i>	<i>185</i>
<i>Secuencias de la región de control</i>	<i>187</i>
Protocolo de amplificación	188
Muestras en Formamida	189
Reamplificación	190
Purificación con gel de agarosa	191
Secuenciación	192
Inferencia del haplogrupo mitocondrial	192
<i>Análisis de los polimorfismos de restricción</i>	<i>194</i>
Sitios polimórficos	194
Cebadores utilizados	194
Condiciones de amplificación	196
Reacciones de restricción	196
<i>Criterios de autenticidad de resultados</i>	<i>198</i>
Extracciones múltiples	198
Poblaciones “control”	198
Correspondencia secuencia – haplogrupo	199
Cálculo de la probabilidad de error	199

Variabilidad a nivel de la secuencia de la región de control	205
Distribución de los haplogrupos	205
MÉTODO: DNA ACTUAL	206
<i>Muestreo</i>	206
<i>Extracción de DNA</i>	207
Muestras sanguíneas	207
Muestras capilares	208
<i>Análisis del DNA</i>	209
Amplificación	209
Secuenciación y análisis de restricción	209
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	211
<i>Valoración metodológica e inhibidores del PCR</i>	211
Extracción y amplificación del DNA antiguo	211
Inhibidores del PCR	211
ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y FILOGENÉTICO	212
<i>Haplogrupos</i>	212
Comparación poblacional	212
Diversidad genética	214
Prueba exacta de diferenciación poblacional	214
Reconstrucción filogenética	215
<i>Secuencias</i>	216
Poblaciones analizadas	216
Índices de diversidad	217
Haplotipos diferentes y sitios variables	218
Diversidad genética	218
Diversidad nucleotídica	218
Historia demográfica	218

Distribución de las diferencias por parejas	219
Inferencia de máxima verosimilitud	221
Análisis filogenético intrapoblacional	223
Reconstrucción filogenética a partir de distancias	223
Análisis filogenético interpoblacional	224
Distancias genéticas	224
Relaciones entre los haplotipos de las poblaciones	225

RESULTADOS 229

DNA ANTIGUO	231
<i>Extracciones realizadas</i>	231
Muestras arqueológicas	231
Muestras no arqueológicas	232
<i>Amplificación de fragmentos de la región de control</i>	233
Muestras arqueológicas	233
Contaminación detectada en los blancos	236
Blancos de extracción	236
Blancos de PCR	241
Blancos de Reamplificación	245
Eficiencia en la amplificación	245
Tipo de tejido	251
Protocolo de extracción	252
Tamaño del fragmento	253
Polimerasa utilizada	254
Almacenamiento frío	255
Población de procedencia	255
Eficiencia en la reamplificación	258
Muestras no arqueológicas	258
<i>Secuencias de la región de control</i>	260
Inferencia del haplogrupo	260
<i>Amplificación de las regiones codificantes</i>	265
Contaminación detectada en los blancos	268
Eficiencia en la amplificación	268
Polimerasa	269

Tipo de tejido	269
Protocolo de extracción	270
Tamaño del segmento	271
Población de origen	273
Eficiencia en la reamplificación	273
<i>Caracterización de los haplogrupos</i>	274
Concordancia secuencia – haplogrupo	277
<i>Variabilidad del mtDNA en la Plaça Vella</i>	283
Secuencias	283
Variabilidad de las secuencias dentro de los haplogrupos.	284
Haplogrupos	285
<i>Extracción de DNA de la hidroxiapatita del hueso</i>	288
<i>Inhibidores de la Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	290
Absorción de luz	290
Emisión de fluorescencia	291
Residuos obtenidos después del “almacenamiento frío”	291
Residuos obtenidos antes del “almacenamiento frío”	292
Análisis comparativo	293
Porfirinas o subproductos de su degradación	293
Productos de la reacción Maillard	293
Ácidos húmicos y fúlvicos	294
DNA ACTUAL	305
<i>Haplogrupos</i>	305
<i>Secuencias de la región de control</i>	307
Correspondencia secuencia – haplogrupo	307
ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA	310
<i>Haplogrupos</i>	310
Índice de diversidad	310
Prueba exacta de diferenciación poblacional	312
Distancias genéticas	315
Árboles filogenéticos	318

<i>Secuencias de la región de control</i>	324
Índices de diversidad	324
Porcentaje de haplotipos diferentes	324
Diversidad genética de Nei	325
Porcentaje de sitios variables	327
Diversidad nucleotídica	328
Historia demográfica: distribución de las diferencias por parejas	331
Tiempo transcurrido desde la expansión	339
Tamaño inicial de la población	347
Historia demográfica: inferencia de máxima verosimilitud	347
Análisis filogenético intrapoblacional	350
Análisis filogenético interpoblacional	363
Distancias genéticas	363
Relaciones entre los haplotipos de las poblaciones	373
DISCUSIÓN	391
DNA ANTIGUO	393
<i>Consideraciones metodológicas</i>	<i>393</i>
Criterios generales	393
Diseño experimental	394
Variables que influyen en la preservación	396
Variables que influyen en la recuperación del DNA	399
<i>Criterios de autenticidad</i>	<i>401</i>
Relación eficiencia / contaminación	402
Contaminación no detectada	405
Concordancia secuencia-haplogrupo	406
Análisis de la variabilidad	411
Razón de verosimilitud	412
<i>El “almacenamiento frío” y los inhibidores del PCR</i>	<i>416</i>
El efecto del frío	416
Caracterización de los residuos	416
Ácidos húmicos y “almacenamiento frío”	419
Límites del “almacenamiento frío”	421

Mecanismo inhibitorio de las moléculas polares	422
RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA	423
<i>Consideraciones metodológicas</i>	423
Haplogrupos vs. Secuencias	423
Tamaño de los fragmentos	425
Árboles filogenéticos vs. redes medias	427
Correlación secuencia-haplogrupo	429
<i>Análisis filogenético</i>	431
El acervo mitocondrial de las poblaciones europeas	431
La información contenida en las secuencias de los distintos haplogrupos	432
Expansión poblacional Mesolítica	432
Antigüedad de los haplogrupos en Europa	434
Diferenciación de la población Catalana	436
Diferencias entre las poblaciones antigua y actual de Cataluña	436
Relación de la población Catalana con otras poblaciones	438
CONCLUSIONES	441
<i>Extracción del DNA antiguo</i>	443
Cuestiones metodológicas	443
Criterios de autenticidad	443
<i>El “almacenamiento frío” y los inhibidores del PCR</i>	444
<i>Análisis filogenético</i>	445
Cuestiones metodológicas	445
Análisis filogenético	446
<i>Consideración final</i>	447

BIBLIOGRAFÍA

449

APÉNDICE

469

INTRODUCCIÓN

La evolución molecular es un proceso histórico mediante el cual el DNA, portador de toda la información genética de los seres vivos, acumula cambios de forma aleatoria o por selección natural. La reconstrucción de este proceso genera información de interés para muchos campos de la biología; particularmente en el área de la Antropología biológica esta información puede ser usada en estudios filogenéticos y de dinámica de poblaciones. Para este tipo de estudios, el DNA mitocondrial (mtDNA), es una de las moléculas más utilizadas, debido entre otras cosas, a su heredabilidad exclusivamente materna, su tasa rápida de evolución y la ausencia de recombinación genética. Así, la genética molecular mitocondrial ha hecho contribuciones importantes en el campo de la Antropología biológica y en el estudio de la evolución de los homínidos, comenzando en 1980 con el trabajo de Wesley Brown. El progreso ha continuado con los estudios de Rebecca L. Cann y asociados en el laboratorio de Allan C. Wilson en Berkeley, los de Douglas Wallace y sus colegas en el grupo de Cavalli-Sforza en Standford así como los estudios realizados en diversos laboratorios de los cinco continentes.

La genética molecular mitocondrial ha contribuido en el intento de aclarar las relaciones filogenéticas de la tricotomía formada por el gorila, el chimpancé y el hombre (Saitou, 1991; Horai et al. 1992; Collura y Stewart, 1995; Arnason et al. 1996). Por ejemplo en el trabajo realizado por Horai y col. (1992) se concluye a través de la comparación de ciertos segmentos de la secuencia de mtDNA que el hombre y el chimpancé están más relacionados entre sí, que el chimpancé y el gorila o que el gorila y el hombre. Similares conclusiones fueron obtenidas por Arnason y col. (1996) usando la secuencia completa del mtDNA. Sin embargo, a pesar de que todos los estudios anteriormente citados apoyan el mismo patrón filogenético, las estimaciones en el tiempo de divergencia de esta tricotomía, varían mucho de un estudio a otro. Horai y col. (1992) estiman que la separación de la rama que condujo al hombre de la del chimpancé ocurrió hace 4.7 ± 0.5 millones de años, y para Arnason y colaboradores (1996), esta separación ocurrió hace alrededor de 13.5 millones de años.

A finales de la década de los 70 y principios de los 80, se empezaron a realizar estudios acerca de la genética del mtDNA. Encontramos en la bibliografía por ejemplo el trabajo de Brown, George y Wilson (1979), en el que se estudia la tasa de evolución del mtDNA. Encontramos también el trabajo de Giles, Blanc, Cann y Wallace (1980) en el que se estudia la heredabilidad materna del mtDNA humano. Pero es el trabajo de Wesley Brown (1980) el que inicia los estudios de polimorfismos del mtDNA en humanos. En este trabajo, Brown estudia el mtDNA de 21 humanos (de diferente origen geográfico y étnico),

sometiéndolo a digestión mediante 18 enzimas de restricción (cada enzima de restricción reconoce un sitio específico en la secuencia de DNA y lleva a cabo un corte en la cadena). Después de hacer una electroferesis en gel de agarosa, comparó los tamaños de los fragmentos de DNA resultantes y encontró que cada una de las 21 muestras podía ser caracterizada individualmente mediante esta digestión. A partir de estos datos, calculó que los individuos estudiados diferían de la secuencia de un supuesto antecesor en un 0,18% en sus pares de bases. Con esta cifra y tomando en cuenta una tasa de sustituciones de bases que había calculado en un trabajo anterior, propone que el Homo sapiens podría haber surgido como especie o que podría haber pasado por una severa reducción de la población hace 180.000 años, una fecha relativamente reciente. Brown concluye principalmente que este método de análisis hace posible la investigación de muchas cuestiones concernientes a la genética de poblaciones humanas, evolución e historia reciente.

Sin embargo, dentro de las investigaciones acerca del origen del hombre, uno de los trabajos que más ha llamado la atención es el realizado por Cann y col. en 1987, en el que el grupo de Alan C. Wilson propone que todo el DNA mitocondrial humano actual proviene de una mujer que vivió hace aproximadamente 200.000 años en Africa. Las implicaciones evolutivas de estos resultados apoyan la teoría de que la transformación de formas arcaicas en formas anatómicamente modernas de Homo sapiens ocurrió en Africa hace 100.000 a 200.000 años, y que todos los humanos actuales son descendientes de esa población africana, que habría reemplazado en su momento a las poblaciones eurasiáticas de Homo erectus (Cann et al. 1987a). Esta teoría conocida como “salida de África” (out of Africa) se remonta a las observaciones que hizo Louis Leakey hace más de 25 años (Aiello, 1993); desarrollada y defendida por Christopher Stringer, se contrapone a la llamada teoría multiregional, una teoría que tiene sus raíces en el trabajo realizado hace más de 50 años por Franz Weidenreich (Freyer et al. 1993) y que fue desarrollada en 1981 por Thorne y Wolpoff, sus principales defensores (Thorne y Wolpoff, 1992). Así pues, el trabajo de Cann y colaboradores aportó nuevos datos a la larga y acalorada polémica existente entre los paleontólogos sobre el origen del hombre anatómicamente moderno.

No obstante, numerosas críticas y comentarios se han realizado en torno al trabajo de Cann y col., como los publicados por Saitou y Omoto (1987); Spuhler (1988); Krüger y Vogel (1989); Maddison (1991); Gee (1992) y Watterson y Donnelly (1992) entre otros. Se han publicado también artículos sobre trabajos complementarios que apoyan un origen africano reciente, como los de Wilson y col. (1987); Horai y Hayasaka (1990); Hasegawa y Horai (1991); Horai y col. (1995) y Penny y col. (1995) entre otros. Destacó en su momento

el trabajo de Vigilant y col. (1991) en el que se utilizaron nuevos métodos para el análisis del DNA mitocondrial y en el que se intentaron superar las deficiencias metodológicas que las críticas señalaron en el trabajo de Cann y colaboradores. No obstante, este trabajo generó nuevas discusiones (Templeton, 1991; Hedges et al. 1991; Templeton, 1993; Stoneking, 1993). Desde entonces, diversos grupos han realizado estudios en diversas poblaciones y las conclusiones siguen siendo divergentes, ya que al parecer existen características de la evolución del mtDNA que aún se desconocen y que pueden hacer que los resultados sean sesgados (Jorde et al. 1998). Por lo tanto, la polémica sobre la utilidad del mtDNA para esclarecer el origen de las poblaciones humanas aún continúa (Stoneking, 1994; Templeton, 1994; Cavalli-Sforza y Minch, 1997; Richards et al. 1997; Simoni et al. 2000b).

De igual forma, han surgido bastantes trabajos relacionados con el origen y migración de poblaciones antiguas y modernas, utilizando diversos polimorfismos del mtDNA. Encontramos por ejemplo los trabajos en japoneses realizados por Horai, Gojobori y Matsunaga (1984) y Horai y Matsunaga (1986); los trabajos sobre judíos de Tikochinski y col. (1991), y el de Torroni y col. (1992), en el que se utilizan los mapas de sitios de restricción para inferir el origen de los nativos americanos. No menos interesantes son los estudios que muestran la posibilidad de inferir la historia demográfica (Rogers y Harpending, 1992; Sherry et al. 1994) y el modo de producción (Watson et al. 1996) de las poblaciones a través de la estructura que presenta su acervo genético mitocondrial. También han sido importantes y polémicos los estudios sobre el origen de los europeos, los cuales serán reseñados más adelante en el marco de referencia.

Más recientemente, se están aprovechando las nuevas técnicas de recuperación de DNA a partir de restos antiguos (DNA antiguo o DNA "fósil"). Los primeros trabajos publicados siguiendo esta línea, tenían un carácter principalmente metodológico, como el de Horai y col. (1989) y el de Ginther y col. (1992). Después se han publicado trabajos ya con un carácter más aplicativo, como el de Horai y col. (1991) en el que se estudia la afiliación filogenética de humanos antiguos y contemporáneos; el de Lalueza (1996) sobre la población extinta de Tierra del Fuego (Patagonia); el de Hagelberg (1997) sobre la colonización de las islas del pacífico; y sobre todo, el del grupo del Dr. Svante Pääbo, en el que por medio de la recuperación y análisis de un segmento de mtDNA de un individuo Neandertal, se concluye que el Homo sapiens y el hombre de Neandertal son especies diferentes, ya que según sus análisis, a nivel mitocondrial no hay contribución genética alguna entre ellos (Krings et al. 1997). Cabe mencionar que a pesar de que el trabajo de Krings y colaboradores está considerado como una auténtica proeza técnica (Kahn y

Gibbons, 1997; Lindahl, 1997), no está exento de polémica. Nordborg, (1998) expone que hay una serie de factores, como la cuestión de si la variabilidad del mtDNA está producida por cambios selectivamente neutros, que no pueden resolverse con sólo una muestra antigua, o incluso contando con muchas muestras, con sólo un locus analizado. Asimismo, G. A. Clark (1997) de la Universidad Estatal de Arizona, opina que para que la comparación sea válida, se debería contar con la secuencia de uno de los primeros Homo sapiens europeos, o de uno de los fósiles de humanos modernos de las cuevas de Israel, ya que las diferencias encontradas entre el ejemplar Neandertal analizado y las secuencias de hombres actuales, podrían deberse solamente a una función del tiempo.

Por otra parte, cabe mencionar que los estudios de DNA antiguo en restos humanos están siendo obstaculizados por problemas de contaminación con DNA moderno, proveniente de las personas que entran en contacto con las muestras, o de DNA extraído previamente de tejidos frescos (sangre o pelo por ejemplo). Esto revela la importancia de trabajar con métodos para evitar y detectar la contaminación y que permitan autenticar el DNA obtenido.

Como hemos visto, no obstante la relevancia de los trabajos citados, el estudio del mtDNA humano como herramienta primordial en el conocimiento evolutivo de las poblaciones humanas, presenta ciertos problemas metodológicos que no están del todo resueltos y que hacen que las conclusiones obtenidas no puedan ser definitivas.

Por ejemplo, aunque se sabe que la tasa de evolución del mtDNA es rápida con relación a la que presenta en promedio el DNA nuclear, las estimaciones que se han hecho de ella presentan una gran variabilidad, al grado de que existen diferencias hasta de un orden de magnitud en las tasas de evolución calculadas por diversos investigadores (Spuhler, 1988; Howell et al. 1996; Parsons, et al. 1997). Esto trae como consecuencia discrepancias substanciales a la hora de fechar eventos en la historia humana, ya que la tasa de evolución es el factor principal a la hora de calibrar el “reloj biológico” del DNA mitocondrial. Es por tanto, de vital importancia diseñar métodos para estimar con certeza la tasa de evolución del DNA mitocondrial.

Otro de los problemas metodológicos en este tipo de estudios, viene dado por los métodos de reconstrucción filogenética. De éstos, existen dos tipos principales: los métodos basados en el criterio de la parsimonia, y los métodos de las distancias genéticas. Ambos tipos de métodos se sustentan en supuestos y modelos evolutivos establecidos *a priori*, lo

que ocasiona que muchas veces se obtengan resultados contradictorios dependiendo del método que se utilice y además, los resultados obtenidos no se pueden verificar independientemente (Sober, 1993; Håstad and Björklund, 1998; Schmidt, 1998). Por tanto, es necesario investigar también en el diseño de nuevos métodos de reconstrucción filogenética, en los que la verificación del resultado, sea independiente del método en sí. Por otra parte, en opinión de Penny y colaboradores (1995) las críticas que han surgido en torno al trabajo de Vigilant y col. (1991) deben interpretarse como críticas a las técnicas analíticas disponibles, o sea a los métodos de reconstrucción filogenética.

Ahora bien, ¿es la aplicación de las técnicas de DNA antiguo al estudio de la genética molecular mitocondrial lo que puede ayudar a resolver estos problemas?, es decir, ¿es el DNA antiguo una herramienta viable para calcular con más exactitud la tasa de evolución del mtDNA?, ¿lo es igualmente para evaluar de forma independiente los resultados de los métodos de reconstrucción filogenética?, y finalmente ¿qué planteamiento se debería seguir?.

La presente tesis pretende contribuir en la resolución de estos problemas, mediante un estudio piloto en el que se analiza el mtDNA a nivel poblacional y de forma diacrónica aplicando para ello técnicas de DNA antiguo.