UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS DOCTORAL

Caracterización genética de las poblaciones de las Edades del Cobre y del Bronce de la submeseta norte de la Península Ibérica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR

Sara Palomo Díez

Directores

Ángel Esparza Arroyo
Eduardo Arroyo Pardo

Madrid, 2015

© Sara Palomo Díez, 2015

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización genética de las poblaciones de las Edades del Cobre y del Bronce de la Submeseta Norte de la Península Ibérica

TESIS DOCTORAL

Sara Palomo Díez

Madrid, 2015

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EUROPEO
PRESENTADA POR

Sara Palomo Díez

Universidad Complutense de Madrid
Madrid, 2015

Esta tesis ha sido realizada en el *Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria* de la *Facultad de Medicina* de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los doctores:

Ángel Esparza Arroyo
Eduardo Arroyo Pardo

VºBº DIRECTORES DE TESIS

Dr. Ángel Esparza Arroyo
Dr. Eduardo Arroyo Pardo

VºBº DOCTORANDA

Sara Palomo Díez

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

A mis padres

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad, por la concesión del proyecto *Nuevos hallazgos y nuevas perspectivas en el estudio de los restos humanos del Grupo Cogotas I* (HAR2009-10105), así como a la beca F.P.I asociada al mismo. Además, la Junta de Castilla y León financió, mediante contrato Artº. 83 LOU entre su Consejería de Cultura y el Prof. Esparza Arroyo , el trabajo "Arqueogenética. Análisis de ADN para la caracterización genética de las poblaciones prehistóricas de la Submeseta Norte (Edades del Cobre y de Bronce)".

Hay muchas personas implicadas de un modo u otro en el desarrollo de este trabajo a las que me gustaría dar las gracias.

En primer lugar, agradecer la confianza, el apoyo y la paciencia a mis dos directores de tesis, Ángel Esparza y Eduardo Arroyo. Ángel, gracias por confiar en nuestro equipo, tu enorme y constante disponibilidad han hecho que apenas se notara la distancia entre Salamanca y Madrid, gracias por todo el esfuerzo realizado a pesar de las dificultades y por tu orientación constante. Eduardo, gracias por confiar en mi y dejarme formar parte de tu equipo de trabajo, aquí he aprendido todo lo que sé sobre ADN antiguo, pero además también he aprendido lo que significa en realidad trabajar en equipo, algo que sabes transmitir a todos los que pasamos por tu laboratorio, en el que me gustaría continuar aprendiendo.

Debo dar las gracias a la Junta de Castilla y León (Dirección General de Patrimonio y Dirección General de Políticas Culturales) por haber facilitado el estudio de los restos y la obtención de muestras en los Museos Arqueológicos de la Comunidad, así como a los Arqueólogos Territoriales y a los Direcctores y Conservadores de los Museos. Muy especialmente al Dr. Francisco Fabián García, Arqueólogo Territorial de Ávila, la Dra. Elisa Guerra Doce (Universidad de Valladolid) y al Dr. Alfredo Jimeno Martínez (Universidad Complutense de Madrid), por la cesión de muestras.

El trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de otros equipos de trabajo e investigación cuya aportación ha sido fundamental. Entre ellos hay que mencionar a *Poznan Radiocarbon Laboratory* (Poznan, Polonia) que llevó a cabo las dataciones radiocarbónicas del proyecto; y el CAI (Centro de Apoyo a la Investigación) de Genómica del Parque Científico de Madrid.

La interpretación de los resultados obtenidos en esta tesis no sería posible sin disponer del previo estudio antropológico de los restos correspondientes al proyecto, llevado a cabo por el Dr. Javier Velasco Vázquez, del departamento de Ciencias Históricas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Tampoco me quiero olvidar de la Dra. Ángeles Navas y su equipo, que han guardado a buen recaudo mis bacterias de clonación. Ni de Pedro Cuesta, del Centro de Cálculo de la U.C.M., quien ha tenido la gentileza de revisar los análisis estadísticos.

En el Laboratorio de Genética Forense y Genética de poblaciones del departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Complutense he tenido la suerte de haber coincidido con compañeros que han

sido un gran apoyo tanto laboral, como personal. Ana, gracias por estar siempre dispuesta a echar una mano y dar buenos consejos. Carlos, gracias por tus orientaciones con el análisis de relaciones familiares. Cláudia, a pesar de ser la ``peque´´ del equipo, tienes mucho que aportar y lo has demostrado. César, a veces los ratos de café son más necesarios que la ayuda en el laboratorio, gracias por aguantar mis lloros y quejas. Tampoco quiero olvidarme de los que pasaron por allí y ya están continuando su aventura en otros lugares: Mirian, Qi, María, Elena, Olga, Eva, Cristina, etc.

También tengo que dar las gracias a las personas que conocí durante mi estancia en la Universidad Tor Vergata de Roma. Gracias a la Dra. Olga Rickards por admitir mi solicitud para realizar la estancia con su equipo y a la Dra. Cristina Martínez Labarga por abrirme las puertas de su laboratorio y ser un gran apoyo durante ese periodo. También gracias al resto de doctorandos del laboratorio, pero en especial a la Dra. Roberta Lelli, por su ayuda con la *Real Time PCR*.

Antes de llegar si quiera a saber que era el ADN antiguo, hubo una persona que me mostró el mundo de la antropología física y la osteología, y a quien quiero dar las gracias, el Dr. Armando González Martín.

Gracias a los amigos que siempre han estado ahí, interesándose por “estas cosas raras” mías, gracias: Edu, Gema (alias Joe), Mari, Rosa, Cristina, Luis, Elena... y toda la gente de El Espinar que me queda en el tintero y a mis amigos de la Autonoma: Vero, Sandra, Conchi, Virgi, Lau y Miguel.

Guardo este último espacio para las personas más importantes de mi vida, mi familia. Gracias a mis padres, Fausto y Dolfi, por animarme desde muy pequeña a tener curiosidad por el mundo, a aprender y a estudiar; gracias por darme todo vuestro apoyo incondicional y estar siempre a mi lado. También gracias a mi hermana, Raquel, por estar a las buenas y a las malas, por ser sobre todo mi gran amiga. Gracias por vuestras visitas a Roma, también junto a Raúl y a Edu; gracias por acompañarme en la proximidad y en la distancia. Por último gracias a mi ya casi marido David, gracias por el día a día, por estar presente, por escuchar sin límites, por las correcciones de inglés, por las numerosas visitas a Roma y sobre todo... por darme alas.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS
ÍNDICE I
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS IX
GLOSARIO DE ABREVIATURAS XX
RESUMEN 1
ABSTRACT (ENGLISH) 3
1 INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DEL ADN ANTIGUO 9
1.1 EL ESTUDIO DEL ADN ANTIGUO 9
1.1.1 Aplicaciones 10
1.1.1.1 Caracterización Genética De Las Poblaciones Antiguas 10
1.1.1.2 Origen Geográfico 11
1.1.1.3 Estudio De Relaciones Familiares 12
1.1.1.4 Determinación Del Sexo 15
1.1.1.5 Identificación Personal 15
1.1.1.6 Análisis De Otras Especies Animales Y Vegetales 16
1.1.1.7 Paleopatología 16
1.1.2 Características Del Estudio De ADN Crítico 17
1.1.3 Estrategias Y Criterios De Autenticidad 18
1.1.3.1 La Escasez De ADN. Problema Y Estrategias 18
1.1.3.2 Fragmentación De Las Cadenas De ADN. Problema Y Estrategias 18
1.1.3.3 El Daño Molecular. Problema Y Estrategias 19
1.1.3.4 La Presencia De Sustancias Inhibidoras De La PCR. Problema Y Estrategias 19
1.1.3.5 La Contaminación. Problema Y Estrategias 20
1.1.3.6 Otras Estrategias Y Criterios De Autenticidad 21
La Selección Muestral 21
Características Y Funcionamiento Del Laboratorio Y El Material De Trabajo 22
Otras Medidas Y Criterios De Autenticidad 24
1.1.4 Antecedentes–El Estudio De Los Movimientos Humanos a través del ADN 25

2 CONTEXTO HISTÓRICO Y BASES ARQUEOLÓGICAS 31
2.1 EL MARCO CULTURAL Y CRONOLÓGICO: LAS EDADES DEL COBRE Y DEL BRONCE DE LA SUBMESETA NORTE 31
2.1.1 Calcolítico Inicial – Precampaniforme 31
2.1.1.1 Yacimientos Seleccionados Del Calcolítico Precampaniforme 33
El Tomillar (Bercial De Zapardiel, Ávila) 34
Los Areneros (La Lastrilla, Segovia) 35
Los Cercados (Mucientes, Valladolid) 36
Camino De Trascabañas (Simancas Y Ciguñuela, Valladolid) 37
2.1.2 Calcolítico – Campaniforme 37

2.1.2.1 Yacimientos Seleccionados Del Calcolítico Campaniforme 41
Aldeagordillo (Ávila) 41
El Mirador (La Lastrilla, Segovia) 41
Perro Alto (Fuente Olmedo, Valladolid) 41
Santa Cruz De Cabezón II (Cabezón De Pisuerga, Valladolid) 42
Pago De Valhondo (Pajares De Adaja, Ávila) 42
Terrazas Del Manzanares (Rivas-Vaciamadrid, Madrid) 43
Tablada del Rudrón (Burgos) 43
2.1.3 La Edad De Bronce En La Submeseta Norte 43
2.1.3.1 Yacimientos Seleccionados Del Bronce Antiguo 44
Santioste (Zamora) 45
Cueva De La Revilla (Atapuerca, Burgos) 45
2.1.4 La Gran Cultura Meseteña De La Edad De Bronce: Cogotas I 46
2.1.4.1 Yacimientos Protocogotas I Seleccionados 50
Carrelasvegas (Santillana De Campos, Palencia) 50
El Cementerio (Quintanilla De Onésimo, Valladolid) 50
El Cerro (La Horra, Burgos) 51
El Juncal (Villaralbo, Zamora) 52
Fuente De La Mora (Valladolid) 53
La Huelga (Dueñas, Palencia) 54
Los Rompizales (Quintanadueñas, Burgos) 54
Las Cañamonas (San Cristobal de Entreviñas, Zamora) 56
Los Tolmos (Caracena, Soria) 56
Tordillos (Aldeaseca De La Frontera, Salamanca) 56
2.1.4.2 Yacimientos Seleccionados De Cogotas I 57
La Requejada (San Román De Hornija, Valladolid) 57
El Cerro De La Cabeza (Ávila) 58
Canto Blanco (Sahagún, León) 59
2.1.5 El Bronce Final: Los Comienzos De La Cultura Del Soto De Medinilla 60
2.1.5.1 Yacimientos Seleccionados Del Soto Formativo 61
El Cerro De San Pelayo (Salamanca) 61

3 OBJETIVOS 65
3.1 OBJETIVOS METODOLÓGICOS 65
3.2 OBJETIVOS DE ÍNDOLE POBLACIONAL - CULTURAL 66
3.3 OBJETIVOS RELACIONADOS CON EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES DE PARENTESCO 66
3.4 OBJETIVOS RELACIONADOS CON LA DETERMINACIÓN DEL SEXO 67

4 MATERIAL Y MÉTODOS 71
4.1 MATERIAL 71
4.1.1 Selección Muestral Y Registo Fotográfico 71

4.1.1.1 Características De Los Individuos Y Muestras Seleccionadas 72
4.1.1.1.1 Calcolítico 72
4.1.1.1.1.1 Yacimientos Del Precampaniforme Estudiados 72
El Tomillar 73
Los Areneros 76
Los Cercados 79
Trascabañas 81
4.1.1.1.1.2 Yacimientos Del Campaniforme Estudiados 82
Aldeagordillo 82
El Mirador 84
Perro Alto 85
Santa Cruz II 86
Valhondo - Pajares de Adaja 87
Rivas Vaciamadrid 87

4.1.1.1.2 Edad De Bronce 88
4.1.1.1.2.1 Yacimientos Del Bronce Antiguo Estudiados 88
Santioste 89
Cueva de la Revilla 90
4.1.1.1.2.2 Yacimientos Protocogotas I Estudiados 92
Carrelasvegas 93
El Cementerio 93
El Cerro de la Horra 94
El Juncal 95
Fuente de la Mora 96
La Huelga 97
Los Rompizales 98
Las Cañamonas 199
Los Tolmos 100
Tordillos 101
4.1.1.1.2.3 Yacimientos De La Cultura Cogotas I Estudiados 105
La Requejada 105
El Cerro de la Cabeza 106
Cantoblanco 107
4.2.2.2.2 Edad Del Bronce Final – Transición Edad De Hierro 109
4.1.1.1.3.1 Yacimientos Del Soto Formativo Estudiados 109
Cerro de San Pelayo 109
4.2METODOLOGÍA 110
4.2.1 Proceso Experimental Y Criterios De Autenticidad 110
4.2.2 Protocolos Empleados En Los Dos Laboratorios 114

4.2.2.1 Características Generales De Los Laboratorios 114
4.2.2.1.1 El Laboratorio 1 114
4.2.2.1.2 El Laboratorio 2 115
4.2.2.2 Pretratamiento De Las Muestras 116
4.2.2.2.1 Pretratamiento En El Laboratorio 1 116
4.2.2.2.2 Pretratamiento En El Laboratorio 2 117
4.2.2.3 Pulverización 117
4.2.2.3.1 Pulverización En El Laboratorio 1 117
4.2.2.3.2 Pulverización En El Laboratorio 2 118
4.2.2.4 Extracción De ADN 119
4.2.2.4.1 Extracción De ADN En El Laboratorio 1 119
4.2.2.4.1.1 Extracción No Destructiva De ADN 120
4.2.2.4.2 Extracción De ADN En El Laboratorio 2 121
4.2.2.5 Amplificación 122
4.2.2.5.1 Amplificación De ADN Mitocondrial 123
4.2.2.5.2 Amplificación De STRs Autosómicos 126
4.2.2.5.3 Amplificación De STRs De Cromosomas Sexuales: X / Y 128
4.2.2.6 Detección De Productos De PCR Por Gel De Agarosa 129
4.2.2.7 Purificación De Productos De PCR 130
4.2.2.8 Secuenciación De Productos De Amplificado De ADN Mitocondrial Y Análisis DeSTRs 131
4.2.2.9 Clonación Bacteriana 132
4.2.2.10 Cuantificación De Secuencias Específicas De ADN Mitocondrial Por Real Time PCR 135
4.2.2.11 Determinación Del Sexo Por Real Time PCR 136
4.2.3 Interpretación De Resultados 137
4.2.3.1 Eficiencia Del Trabajo Realizado 137
4.2.3.2 Interpretación De Los Resultados De ADN Mitocondrial 140
4.2.3.2.1 Lectura De Secuencias De ADN Mitocondrial Y Establecimiento De Haplotipos 140
4.2.3.2.2 Establecimiento Del Haplogrupo Mitocondrial 141
4.2.3.2.3 Análisis De Los Resultados Del Estudio De ADN Mitocondrial 141
4.2.3.2.3.1 Análisis Diacrónico De Los Periodos Estudiados En Esta Tesis 141
4.2.3.2.3.2 Análisis Sincrónico De Los Yacimientos Estudiados En Esta Tesis 143
4.2.3.2.4 Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas Respecto De Otras Poblaciones 147
4.2.3.2.4.1 Construcción De La Base De Datos 148
4.2.3.2.4.2 Análisis Diacrónico 150
4.2.3.2.4.3 Análisis Sincrónico 153
4.2.2.2.2 Análisis De Correspondencias Y Análisis De Componentes Principales 157
4.2.3.2.6 Análisis De La Varianza Molecular (Amova) 157
4.2.3.2.7 Estudio De Distancias Genéticas FSTs 158
4.2.3.2.8 Creación De Mapas De Distancias Genéticas Y De Frecuencias De Haplogrupos 159
4.2.3.2.9 Elaboración De Networks 159
4.2.2.2 Interpretación De Los Resultados De ADN Nuclear 160

4.2.3.3.1 Enterramientos Colectivos Y Múltiples. Localización Y Periodo 160
4.2.3.3.2 Interpretación De Perfiles De STRs Nucleares 161
4.2.3.3.2.1 Asignación De Picos A Un Perfil 161
4.2.3.3.3 Establecimiento Del Perfil Consenso 164
4.2.3.3.4 Estudio De Relaciones De Parentesco Cercano 165
4.2.3.3.5 Diagnóstico molecular del sexo 166
4.2.3.3.6 Determinación Del Número De Individuos 167

5RESULTADOS 171

5.1EFICIENCIA DEL TRABAJO REALIZADO 171

5.1.1 Evaluación General De Los Resultados 171
5.1.1.1 Valoración Del Efecto Del Tiempo En La Obtención De Resultados 173
5.1.1.2 Valoración Del Efecto De La Edad Y El Sexo Del Individuo En La Obtención De Resultados 175
5.1.1.3 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas De Las Muestras 176
5.1.1.4 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas De Las Piezas Dentales 179
5.1.2 Evaluación De Los Factores Que Influyen En La Contaminación Con ADN Exógeno 180
5.1.2.1 Valoración Del Efecto De La Edad Y El Sexo En La Obtención De Resultados Contaminados 180
5.1.2.2 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas En La contaminación 181
5.1.3 Evaluación De Los Factores Que Influyen En El Daño Molecular 183
5.1.3.1 Valoración Del Efecto Del Tiempo Sobre La Presencia De Daño Molecular 183
5.1.3.2 Valoración Del Efecto De La Edad Y El Sexo Del Individuo Sobre La Presencia De Daño Molecular 184
5.1.3.3 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas Sobre El Daño Molecular 185
5.1.3.4 Valoración Del Efecto De Las Características De Las Piezas Dentales Sobre El Daño Molecular 187
5.1.4 Evaluación De Los Factores Que Influyen En La Fragmentación Del ADN 187
5.1.4.1 Efecto De La Utilización De Muestras Fragmentadas Sobre La Fragmentación Del ADN 188
5.1.4.2 Tipo De Tejido: Dental U Óseo 189
5.1.4.3 Efecto De la Presencia De Grietas En La Muestra Sobre La Fragmentación Del ADN 190
5.1.4.4 Efecto De La Utilización De Muestras Tratadas Con Consolidantes O Rotuladores Sobre La Fragmentación Del ADN 191
5.1.4.5 Efecto De Las Características De Las Piezas Dentales Sobre La Fragmentación 192
5.1.4.6 Efecto De La Coloración De La Muestra Sobre La Fragmentación Del ADN 193
5.1.5 Evaluación Mediante PCR A Tiempo Real De La Eficiencia De Los Distintos Protocolos De Extracción 194
5.1.5.1 Protocolo De Extracción Laboratorio 1 Vs. Protocolo De Extracción Laboratorio 2 194
5.1.5.2 Protocolos De Extracción De ADN Destructivos Vs. No Destructivo 197

5.2CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES ASOCIADAS AL ADN MITOCONDRIAL 200

5.2.1 Análisis Específico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis 200
5.2.1.1 Haplotipos Mitocondriales 200
5.2.1.2 Análisis Diacrónico De Los Periodos Estudiados En Esta Tesis 203
5.2.1.3 Análisis Sincrónico – Espacial De Los Yacimientos Estudiados En Esta Tesis 207
5.2.1.4 Combinación Del Análisis Diacrónico Y Sincrónico 215
5.2.1.5 Análisis De Los Haplogrupos 219

5.2.2 Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras 232
5.2.2.1 Análisis Diacrónico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras 232
5.2.2.2 Análisis Sincrónico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras 236
5.2.2.3 Combinación De Datos De Los Análisis Diacrónico Y Sincrónico 243
5.2.2.4 Estudio De los Haplogrupos: Análisis De Correspondencias 248
5.2.2.5 Elaboración De Networks 250
5.2.3 Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones Coetáneas De La Submeseta Norte Y Europa 253
5.3ANÁLISIS DE RELACIONES FAMILIARES EN ENTERRAMIENTOS COLECTIVOS Y MÚLTIPLES 255
5.3.1 Enterramientos Colectivos. Localización Y Periodo 255
5.3.2 Eficiencia Del Análisis De STRs Autosómicos 255
5.3.3 El Estudio De Relaciones Familiares, Caso Por Caso 256
5.3.3.1 Los Tolmos 257
5.3.3.2 Los Areneros 260
5.3.3.3 La Cueva de la Revilla 265
5.3.3.4 Los Cercados 266
5.3.3.5 Los Rompizales 268
5.3.3.6 Tordillos 270
5.3.4 Consideraciones Sobre El Análisis De STRs 274
5.4DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SEXO 277
5.4.1 Resultados Del Análisis De Sexo Molecular: Análisis De Strs Y Pcr A Tiempo Real 277

6 DISCUSIÓN 283
6.1CONSIDERACIONES GENERALES 283
6.2DISCUSIÓN SOBRE LOS OBJETIVOS METODOLÓGICOS 284
6.2.1 Evaluación De La Selección Muestral Y De Los Principales Problemas En La Obtención De Resultado 284
6.2.1.1 La Antigüedad De La Muestra 285
6.2.1.2 La Edad Y El Sexo De Los Individuos 286
6.2.1.3 Tipo De Tejido Analizado Y Tipo De Muestra 287
6.2.1.4 Características Macroscópicas De Las Muestras 288
6.2.1.5 Visión Global De La Eficiencia 290
6.2.2 Evaluación De Los Métodos De Extracción 291
6.2.3 Evaluación De Los Criterios Para El Establecimiento De Perfiles Consenso Sólidos De STRs 293
6.3DISCUSIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES ASOCIADAS AL ADN MITOCONDRIAL 295
6.3.1 Discusión Sobre El Análisis Específico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis 295
6.3.1.1 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas FSTs Según Un Criterio Cronológico 295
6.3.1.2 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas FSTs Según Criterios Geográficos 299
6.3.1.3 Discusión Sobre El Análisis De Datos Cronológicos Y Geográficos Combinados 303
6.3.1.4 Discusión Sobre El Estudio De Los Haplogrupos. Característicos De Cada Periodo

Analizado 306
6.3.2 Discusión Sobre El Análisis De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis En Su Contexto Temporal Respecto A Poblaciones Anteriores Y Posteriores De La Península Ibérica 308
6.3.2.1 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas FSTs Según Un Criterio Cronológico 309
6.3.2.2 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas FSTs Según Criterios Geográficos 312
6.3.2.3 Discusión Sobre El Análisis Combinado De Datos Cronológicos Y Geográficos 317
6.3.2.4 Discusión Sobre El Estudio De Los Haplogrupos Característicos De Cada Periodo Analizado 320
6.3.2. Discusión Sobre El Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones Contemporáneas De La Submeseta Norte Y Europa 321
6.4DISCUSIÓN SOBRE EL ANÁLISIS DE RELACIONES FAMILIARES EN ENTERRAMIENTOS COLECTIVOS 322
6.4.1 Consideraciones Generales 322
6.4.2 Análisis De STRs Autosómicos En Los Tolmos (Caracena, Soria) 322
6.4.3 Análisis De STRs Autosómicos En Los Areneros (La Lastrilla, Segovia) 324
6.4.4 Análisis De STRs Autosómicos En La Cueva De La Revilla (Atapuerca, Burgos) 327
6.4.5 Análisis De STRs Autosómicos En Los Cercados (Mucientes, Valladolid) 329
6.4.6 Análisis De STRs Autosómicos En Los Rompizales (Alfoz De Quintanadueñas, Burgos) 331
6.4.7 Análisis De STRs Autosómicos En Tordillos (Aldeaseca De La Frontera, Salamanca) 332
6.4.8 Análisis de STRs autosómicos en La Requejada (San Román de Hornija, Valladolid) 335
6.4.9 Análisis de STRs autosómicos en El Cerro (La Horra, Burgos) 335
6.4.10 Valoración Poblacional Del Análisis De STRs Autosómicos 336

6.5DISCUSIÓN SOBRE EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SEXO 337

7CONCLUSIONES 341
7.1 CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS METODOLÓGICOS 341
7.2CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS DE ÍNDOLE POBLACIONAL-CULTURAL 344
7.3CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS RELACIONADOS CON ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES DE PARENTESCO 347
7.4CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS RELACIONADOS CON LA DETERMINACIÓN DEL SEXO 350

8CONCLUSIONS (English) 352
8.1CONCLUSIONS ABOUT THE METHODOLOGICAL OBJECTIVES 352
8.2CONCLUSIONS ABOUT THE POPULATION - CULTURAL OBJECTIVES 355
8.3CONCLUSIONS ABOUT THE OBJECTIVES RELATED TO THE KINSHIP ANALYSIS 358
8.4CONCLUSIONS ABOUT THE SEX DETERMINATION OBJECTIVES 361

9BIBLIOGRAFÍA Y RECURSOS ELECTRÓNICOS 365

9.1 BIBLIOGRAFÍA 365
9.2 RECURSOS ELECTRÓNICOS 381

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Árbol simplificado de los pincipales haplogrupos mitocondriales correspondientes a cada continente 28

Figura 2. Localización geográfica de los yacimientos estudiados. 72

Tabla 1. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Tomillar. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 75

Figura 3. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Tomillar. 76

Tabla 2. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Areneros. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 77

Figura 4. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Areneros. 78

Figura 5. Restos óseos de los individuos del yacimiento de Los Cercados. Se indican con una flecha roja los traumas perimortem. 79

Tabla 3. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Cercados. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 80

Figura 6. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Cercados 81

Tabla 4. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Trascabañas. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 82

Figura 7. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Camino de Trascabañas 82

Figura 8. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Aldeagordillo. 83

Tabla 5. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Aldeagordillo. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 84

Tabla 6. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Mirador. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 84

Figura 9. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Mirador 85

Figura 10. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Perro Alto 85

Tabla 7. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Perro Alto (Fuente Olmedo, Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 86

Tabla 8. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Santa Cruz II. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 86

Figura 11. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Santa Cruz II (Cabezón). 86

Tabla 9. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Valhondo-Parajes de Adaja. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 87

Tabla 10. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Rivas-Vaciamadrid (Madrid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 87

Figura 13. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Rivas Vaciamadrid 88

Tabla 11. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Tablada del Rudrón (Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 88

Figura 14. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Tablada del Rudrón (Burgos). 89

Tabla 12. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Santioste (Otero de Sariegos, Villafáfila, Zamora). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 90

Figura 15. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Santioste 90

Tabla 13. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Cueva de la Revilla (Atapuerca, Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 91

Figura 16. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Cueva de la Revilla 92

Tabla 14. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Carrelasvegas (Santillana de Campos, Palencia). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 93

Figura 17. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Carrelasvegas 93

Tabla 15. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cementerio (Quintanilla de Onésimo, Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 94

Figura 18. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cementerio 94

Figura 19. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cerro de la Horra 95

Tabla 16. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cerro de la Horra (Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 95

Tabla 17. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Juncal (Villaralbo, Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 96

Figura 20. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Juncal 96

Tabla 18. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Fuente de la Mora (Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 96

Figura 21. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Fuente de la Mora 97

Figura 22. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de la Huelga 98

Figura 23. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Rompizales 98

Tabla 19. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de La Huelga 97

Tabla 20. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Rompizales. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 99

Tabla 21. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Las Cañamonas. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 99

Figura 24. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Las Cañamonas 100

Tabla 22. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Tolmos (Caracena, Soria). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 100

Figura 25. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Tolmos 101

Figura 26. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Tordillos. 103

Tabla 23. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Tordillos. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 105

Tabla 24. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de La Requejada (San Román de Hornija, Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 106

Figura 27. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de La Requejada. 106

Tabla 25. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cerro de la Cabeza. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 107

Figura 28. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cerro de la Cabeza. 107

Tabla 26. Detalle de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Canto Blanco. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 108

Figura 29. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Cantoblanco. 108

Tabla 27. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cerro de San Pelayo. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra. 109

Figura 30. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cerro de San Pelayo 109

Figura 31. Esquema del proceso experimental completo llevado a cabo en los 2 laboratorios implicados. 111

Figura 32. Plano esquematizado de la distribución de salas del laboratorio de Genética Forense y Genética de poblaciones de la Universidad Complutense de Madrid. 114

Figura 33. Plano esquematizado de los laboratorios de la Facultad de Biología de la Universidad Tor Vergata de Roma. 115

Figura 34. Arenadora Dentalfarm Base I Plus 116

Figura 35. Crosslinker 116

Figura 36. Molino refrigerado con nitrógeno líquido. A la izquierda aparece el molino. En la parte inferior y meda de la derecha se observan los viales, los tapones y los percutores. 120

Tabla 28. Primers empleados para la amplificación de ADN mitocondrial 124

Figura 37. Mapa en el que se representa las divisiones geográficas establecidas para llevar a cabo el análisis espacial de variación genética. El mapa de Castilla y León se ha dividido en 5 regiones diferentes separadas por los principales ríos de la región: Esla, Pisuerga, Duero y Eresma. 144

Figura 38. Mapa en el que se representa los principales yacimientos localizados de manera más próxima a las principales cuencas hidrográficas. Representado en negro el yacimiento del Rio Tormes, en verde los yacimientos del río Adaja, en naranja los del Duero y en violeta los del Río Arlanzón. 146

Figura 39. Localización de los yacimientos empleados en el análisis diacrónico. Los yacimientos pertenecientes a esta tesis están representados con triángulos, por otro lado, las estrellas representan la localización de los yacimientos de otras fuentes bibliográficas que han sido empleados para realizar las comparaciones cronológicas. Los diferentes colores representan cada uno de los periodos estudiados, su significado aparece en la leyenda en la parte izquierda. Además bajo el nombre de cada yacimiento podemos observar su correspondiente referencia bibliográfica. 149

Tabla 29. Relación de los haplotipos más representativos. 149

Figura 40. Yacimientos empleados para llevar a cabo el análisis comparativo diacrónico. 151

Figura 41. División geográfica establecida para definir los distintos grupos poblacionales de manera espacial 154

Figura 42. Localización geográfica de los enterramientos colectivos estudiados. 160

Figura 43. Presencia de stutters en un electroferograma 162

Figura 44. Presencia de picos que se sitúan fuera de lo establecido por el ladder 163

Figura 45. Desequilibrio alélico 163

Figura 46. Electroferograma en el cual se presenta una situación en la cual podríamos estar observando a un individuo homocigoto para un marcador determinado, o bien un fenómeno de alelic dropout. 163

Figura 47. Electroferograma en el cual se presenta una situación en la cual ha tenido lugar la desaparición completa de picos en uno de los marcadores. Esto suele ocurrir con mayor frecuencia en los marcadores de mayor peso molecular, como el FGA que aparece en la imagen. 164

Figura 48. Diagrama de barras, en el cual se observan en verde la proporción de muestras que han aportado resultados válidos, y a su derecha desglosadas las diferentes causas de fracaso (ausencia de ADN en rojo, no replicación de resultados en naranja a partir de las diferentes amplificaciones de un mismo extracto de una muestra, en amarillo presencia de ADN contaminante y en violeta no replicación de resultados entre las distintas muestras o extractos del mismo individuo). 171

Figura 49. Diagramas de barras que representa en la proporción de muestras en las que ha sido posible amplificar un tamaño molecular máximo de ADN mitocondrial. A la izquierda observamos la gráfica que representa la proporción de muestras en las que se ha amplificado un máximo tamaño molecular de ADN mitocondrial, y a la derecha de ADN nuclear. En lo relativo al ADN mitocondrial, el máximo tamaño molecular amplificado ha sido de 255 pb, por debajo tenemos fragmentos de 225 pb , 179 pb y 167 pb. Los casos en los que no se ha obtenido amplificación están representados en rojo. En la gráfica de la derecha, observamos que el máximo tamaño molecular amplificado de ADN nuclear, ha sido de 300 pb, por debajo tenemos fragmentos de 265 pb, 202 pb, 150 pb y 125 pb. 172

Tabla 30. Resultados de la Prueba t-Student para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función del tiempo transcurrido desde la deposición del cadáver datada por radio-carbono. 173

Tabla 31. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función del tiempo transcurrido desde la deposición del cadáver valorando la cultura – periodo a la que pertenece. 174

Tabla 32. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función de la edad de los individuos, valorada en intervalos o grupos de edad: Perinatal, infantil, juvenil, adulto-joven, adulto, anciano e indeterminado. Y en función del sexo de los individuos: varones, mujeres o individuos de sexo indeterminable. Estos análisis se han realizado sobre el total de muestras, no de individuos. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. 176

Tabla 33. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función de las diferentes características macroscópicas de las muestras: Tipo de tejido empleado (óseo o dental), tipo de pieza o muestra procesada, utilización de piezas fragmentadas o completas, presencia de grietas en la muestra procesada, presencia de consolidantes en la muestra proceseada, utilización de muestras rotuladas y coloración de la muestra. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni. 177

Tabla 34. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función de la

utilización o no de piezas dentales con diferentes características: caries, desgaste dental y/o presencia de orificios en el ápice de la raíz. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni. 179

Tabla 35. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de contaminación en función de la edad del individuo analizado. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. 181

Tabla 36. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de contaminación en función del tipo de tejido de la muestra analizada y en función del tipo de muestra seleccionada para el análisis. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. 182

Tabla 37. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de contaminación en función las distintas características macroscópicas que muestre la pieza procesada: fragmentación, presencia de grietas, coloración, presencia de tintas y/o consolidantes. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni. 182

Tabla 38. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de la antigüedad de la muestra según el periodo o cultura a la que pertenece. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni. 184

Tabla 39. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de la edad del individuo analizado. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. 185

Tabla 40. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de las características macroscópicas de la muestra analizada. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni. 186

Tabla 41. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de la presencia o ausencia de determinadas características de las piezas dentales: presencia o ausencia de caries, orificios en el ápice de la raíz y presencia o ausencia de desgaste dental. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni. 187

Tabla 42. Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la fragmentación de la muestra analizada. 189

Tabla 43. Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función del tipo de tejido. 190

Tabla 44. Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la presencia o ausencia de griegas. 190

Tabla 45. Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de muestras que presenten pegamentos o consolidantes. 191

Tabla 46. Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de muestras para el análisis que presenten rótulos con tinta indeleble. 192

Tabla 47. Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la presencia o ausencia de caries en la muestra analizada. 192

Tabla 48. Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de piezas dentales que presenten sus extremos radiculares abiertos. 193

Tabla 49. Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de piezas dentales con desgaste en la corona. 193

Tabla 50. Resultados del anova para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función del color de la muestra analizada. 194

Tablas 51. Resultados relativos de la cuantificación por PCR a tiempo real sobre los extractos obtenidos mediante los dos protocolos empleados en el laboratorio 1 y el laboratorio 2. En la última columna de la derecha se indican en color rojo aquellos valores que resultaron indicar una mejor eficiencia del protocolo del laboratorio 1 (valores por encima de 1) y en violeta, aquellos que indican una mayor eficiencia del protocolo empleado en el laboratorio 2 (valores por debajo de 1). 196

Tabla 52. Resultados de la cuantificación de por PCR a tiempo real de los productos obtenidos mediante extracción de ADN destructiva y no destructiva. En las últimas columnas de la derecha se muestran las relaciones entre los protocolos de los laboratorios 1 y 2 frente al protocolo número 3, no destructivo. Están marcados en verde aquellos casos en los que la cantidad de ADN obtenida mediante el protocolo de extracción no destructivo es mayor que en los demás, en rojo se indica cuando el mejor protocolo resulta ser el del laboratorio 1 y en violeta cuando el más eficiente es el del laboratorio 2. 197

Figura 50. Imágenes de las muestras sometidas al protocolo de extracción no destructivo. 198

Tabla 53. Haplotipos de ADN mitocondrial establecidos para cada individuo analizado. Se marcan con el fondo blanco aquellos resultados que son válidos y con el fondo gris aquellos cuya validación no ha sido posible por diferentes causas. Los periodos a los que pertenecen vienen indicados en la primera columna de manera abreviada (PCAMP: Precampaniforme; CAMP: Campaniforme; BA: Bronce Antiguo; PCOG: Protocogotas; COG: Cogotas I y SF: Soto Formativo). 203

Tabla 54. AMOVA. Se observan los resultados del análisis de la varianza molecular entre los distintos grupos según un criterio temporal, entre los yacimientos pertenecientes a cada grupo y entre los individuos. 203

Tabla 55. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2, siguiendo un criterio cronológico. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos, dentro de cada grupo (entre yacimientos o poblaciones) y entre individuos (dentro de cada yacimiento o población). Se marcan en blanco aquellos valores más significativos entre grupos. 204

Figura 51. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los 6 periodos temporales estudiados: Precampaniforme, Campaniforme, Bronce antiguo, Protocogotas I y Cogotas I 205

Figura 52. Representaciones MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin., En cada una de las tres representaciones se marca bajo un mismo área de color aquellos yacimientos pertenecientes al mismo periodo crono-cultural, de modo que las regiones donde se superponen las áreas de los dos colores (verde y azul) será dónde podemos encontrar los yacimientos genéticamente más próximos entre sí. 206

Tabla 56. AMOVA. Se observan los resultados del análisis de la varianza molecular entre los distintos grupos según el criterio geográfico, entre los yacimientos pertenecientes a cada grupo y entre los individuos. 207

Tabla 57. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2, siguiendo un criterio geográfico. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos, dentro de cada grupo (entre yacimientos o poblaciones) y entre individuos (dentro de cada yacimiento o población). 208

Figura 53. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre las 5 regiones geográficas establecidas. La región 1 representada en verde comprende los yacimientos de Cañamonas y Santioste. La región 2, representada en azul, comprende los yacimentos de: Santa Cruz de Cabezón, Fuente de la Mora, Los Cercados, Trascabañas, Carrelasvegas, La Huelga, Cantoblanco y La Requejada. La región 3, representada en morado oscuro, comprende los yacimientos de: El Cerro, Tablada de Rudrón, La Cueva de la Revilla y Los Rompizales. La región 4, en naranja, está formada por: El Tomillar, Pajares de Adaja, Perro Alto, Tordillos y El Cerro de San Pelayo. Finalmente la región 5, representada en color violeta claro, comprende los yacimientos de: Los Areneros, El Mirador, El Cementerio y Los Tolmos. 209

Figura 54. Representaciones MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin establecidas entre los yacimientos ubicados en las distintas áreas o regiones geográficas establecidas. En las 10 representaciones MDS, numeradas de la a a la j, se representan bajo un mismo área de color aquellos yacimientos pertenecientes a la misma región geográfica, de acuerdo a los colores establecidos en el mapa de la Figura 36, de modo que las regiones donde se superponen las áreas de los dos colores será dónde podemos encontrar los yacimientos genéticamente más próximos entre sí a pesar de pertenecer a Regiones diferentes. Además, los nombres de cada uno de los yacimientos vienen precedidos de unas siglas que resumen su pertenencia a cada uno de los distintos periodos crono-culturales (PC: Precampaniforme; C: Campaniforme; BA: Bronce Antiguo; PCOG: Protocogotas; COG: Cogotas I; SF: Soto Formativo). 211

Tabla 58. Amova. Análisis de la varianza molecular entre grupos formados por los distintos yacimientos ubicados en determinadas cuencas hidrográficas. 214

Tabla 59. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos (Cada cuenca hidrográfica), entre yacimientos o poblaciones y entre individuos (dentro de cada yacimiento o población). 215

Figura 55. MDS en el que se representan las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los distintos yacimientos estudiados. Se indica mediante colores la región geográfica a la que pertenece cada yacimiento, así como con formas su pertenencia a los diferentes periodos temporales. Además el tamaño de las figuras es relativo al tamaño de cada población siendo la más grandes de entre 8 y 17 individuos, las medianas de entre 3 y 7 individuos, y las pequeñas de 1 o 2 individuo. 216

Figuras 56. Cada uno de estos mapas , representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del inmediatamente anterior de manera puntual. Aplicando el enfoque 1. En las leyendas de cada uno de los mapas se observa a qué transición termporal corresponde y en el lateral de cada mapa podemos observar la gradación que va desde el blanco (correspondiente una distancia FST baja) al azul intenso (correspondiente a la distancia FST más elevada). Los números que aparecen en los ejes X e Y de cada mapa se corresponden con las coordenadas geográficas. En estas comparaciones no se ha incluido el grupo Soto Formativo por ser poco significativo al estar constituido por un único individuo. 218

Figuras 57. Cada uno de estos mapas representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del conjunto de todos los anteriores en el tiempo. Aplicando el enfoque 2. En las leyendas bajo cada uno de los mapas se observa el periodo cronológico al que hace referencia cada mapa, y a la derecha de cada mapa se observa la gradación que va desde el blanco

(correspondiente una distancia FST baja) al azul intenso (correspondiente a la distancia FST más elevada). En este análisis no se ha considerado grupo Soto Formativo por estar constituido por un único individuo y no ser representativo. 219

Tabla 60. Relación de haplotipos y haplogrupos determinados. 221

Figura 58. Distribución espacio – temporal del haplogrupo K. Se representa la frecuencia del haplogrupo K en el espacio y a lo largo de los distintos periodos temporales. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población. 222

Figura 59. Distribución espacio – temporal del haplogrupo H. . Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población. 223

Figura 60. Distribución espacio – temporal del haplogrupo HV0. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población. 224

Figura 61. Distribución espacio – temporal del haplogrupo J. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población. 225

Figura 62. Distribución espacio – temporal del haplogrupo U. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población. 225

Figura 63. Distribución espacio – temporal de los haplogrupos I y T. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población. 226

Figura 64. Análisis de correspondencias. Haplogrupos – Periodos temporales. 227

Tabla 61. Haplotipos correspondientes a cada uno de los nombres asignados en el análisis de correspondencias. Así como los haplogrupos con a los que pertenece cada uno de los haplotipos. 228

Figura 65. Análisis de correspondencias: Haplotipos – Periodos temporales. Con cuadrados verdes están representados los periodos cronológicos, y con círculos azules los haplotipos. 229

Figura 66. Network. Haplogrupo H. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en azul los del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas y en naranja los correspondientes a la cultura Cogotas I. 230

Figura 67. Network. Haplogrupo HV0. Se indican en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas y en amarillo el individuo correspondiente al Soto Formativo. 230

Figura 68. Network. Haplogrupo K. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en azul los del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce y en violeta los Protocogotas. 231

Figura 69. Network. Haplogrupo U. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce y en violeta los Protocogotas. 231

Tabla 61. Amova. Análisis de la varianza molecular entre grupos formados por los distintos periodos temporales analizados. 232

Tabla 62. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos, dentro de cada grupo y entre individuos. Los grupos se denominan de manera abreviada con los siguientes códigos: PAL/MES: Paleolítico / Mesolítico; NF: Neolítico Final; PCAMP: Precampaniforme; CAMP: Campaniforme; BA: Bronce Antiguo; PCOG: Protocogotas; COG: Cogotas; SF: Soto Formativo y XXI: Siglo XXI. Se marcan en blanco aquellas varianzas superiores a 10 o inferiores a 1. 233

Figura 70. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los 9 periodos temporales estudiados. 234

Figura 71. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre diferentes periodos temporales. Se han representado únicamente aquellos conjuntos con distancias genéticas significativas entre alguno de sus yacimientos. 235

Tabla 63. Resultados obtenidos del análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos organizados por criterios geográficos. 236

Tabla 64. Resultados obtenidos del análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos organizados por criterios geográficos 2 a 2. Cada número representa cada una de las regiones establecidas en el mapa de la figura 65. Se han marcado en blanco aquellos valores por encima de 10 o por debajo de 1, sin atender a signos negativos. 237

Figura 72. Representación MDS de las distancias FSTs de Slatkin entre las distintas regiones geográficas establecidas en la Figura 58. 238

Figura 73. Representaciones MDS de las distancias genéticas establecidas entre los yacimientos de las diferentes áreas geográficas definidas. En cada una de las gráficas se han marcado con diferentes áreas de color las dos regiones contrastadas en cada una de las gráficas MDS, correspondiéndose cada una a los colores que definen cada área geográfica según la Figura 40. También en la leyenda situada bajo cada una de las gráficas se puede leer a que regiones corresponde el análisis. Además podemos observar cada yacimiento marcado en distintos colores en función del periodo cronológico al que pertenece, siendo los colores correspondientes a los siguientes periodos: Paleolítico y Mesolítico, color marrón; Neolítico antiguo y final, amarillo; Precampaniforme, verde; Campaniforme, azul; Calcolítico, azul claro; Bronce antiguo, rojo; Protocogotas, violeta; Cogotas, naranja; Soto formativo, negro. Se han representado únicamente aquellas relaciones que dieron lugar a distancias significativas en alguno de los casos. Las matrices de distancias correspondientes pueden consultarse en el material complementario (hojas MFST6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, del archivo S.1). 241

Figura 74 . Representación MDS de las distancias genéticas existentes entre los yacimientos Calcolíticos de la Submeseta norte y la región Levantina. 242

Figura 75. MDS en el que se representan las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los distintos yacimientos estudiados. Se indica mediante colores la región geográfica a la que pertenece cada yacimiento, así como con formas su pertenencia a los diferentes periodos temporales. 245

Figuras 76. Cada uno de estos mapas representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del inmediatamente anterior de manera puntual. En la leyenda bajo cada una de las gráficas se puede observar a que periodos corresponde. A la derecha de cada una de las representaciones se observa una gradación de color que indica la distancia genética existente entre las poblaciones del periodo analizado respecto de la población inmediatamente interior, siendo el blanco el color que indíca una menor distancia genética y el azul cada vez más intenso indica una mayor distancia genética entre las dos poblaciones. Los números en los ejes X e Y de cada gráfica indican las coordenadas geográficas. 246

Figuras 77. Cada uno de estos mapas representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del conjunto de todas las poblaciones anteriores en el tiempo.. En la leyenda bajo cada una de las gráficas se puede observar a que periodo corresponde cada una.. A la derecha de cada una de las representaciones se observa una gradación de color que indica la distancia genética existente entre las poblaciones del periodo analizado respecto del conjunto de poblaciones anteriores en el tiempo, siendo el blanco el color que indica una menor distancia genética y el azul cada vez más intenso indica una mayor distancia genética entre las dos poblaciones. Los números en los ejes X e Y de cada gráfica indican las coordenadas geográficas. 247

Figura 78. Representación gráfica de la evolución de la prevalencia de los haplogrupos más significativos a lo largo del tiempo, de más antiguo a la izquierda a más reciente a la derecha. 249

Figura 79. Análisis de correspondencias 249

Figura 80. Network. Haplogrupo H. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo preCampaniforme, en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, en naranja los individuos correspondientes a la cultura Cogotas I y en negro los que corresponden al Neolítico Final. 250

Figura 81. Network. Haplogrupo HV0. Se indican en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, en naranja los individuos correspondientes a la cultura Cogotas I, y en negro los que corresponden al Calcolítico. En amarillo se ha incluido el individuo del San Pelayo, del Soto Formativo. 251

Figura 82. Network. Haplogrupo K. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, y en negro los que corresponden al Neolítico Final. 251

Figura 83. Network. Haplogrupo U. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, y en negro los que corresponden al Calcolítico Levantino y Neolítico Final. 252

Figura 84. Análisis de componentes principales. Cada punto representa uno de los yacimientos analizados. Los yacimientos correspondientes a esta tesis están marcados con círculos, mientras que los yacimientos dela bibliografía se representan mediante cruces. Representados con círculos verdes aparecen los correspondientes al periodo Precampaniforme de la Submeseta norte.). Representados con círculos azules, los correspondientes al periodo Campaniforme. Con círculos rojos, aparecen los yacimientos correspondientes al Bronce antiguo). Con círculos violetas están representados los yacimientos Protocogotas). Los Cogotas están representados mediante círculos rosas)..Con cruces verdes aparecen las poblaciones de la bibliografía (Gómez-Sánchez et al., 2014) que son calcolíticas; con cruces naranjas las poblaciones cazadoras-recolectoras de diferentes regiones. Con cruces amarillas se han representado las poblaciones Neolíticas y Mesolíticas, anteriores al Calcolítico. Finalmente, con cruces rojas están representados los yacimientos complementarios de la Edad del Bronce. 254

Tabla 65. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de Los Tolmos. 257

Tabla 66. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Tolmos, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias. 258

Tabla 67. Resultado del análisis de marcadores del cromosoma X en los individuos LTB1, LTB2 y LTB3. 259

Tabla 68. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de Los Areneros 260

Tabla 69. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Areneros, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias. 262

Tabla 70. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de la Revilla. 263

Tabla 71. Relaciones familiares más probables, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias. 265

Tabla 72. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de Los Cercados. 266

Tabla 73. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Cercados, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias. 267

Tabla 74. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de los Rompizales. 268

Tabla 75. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Rompizales, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias. 269

Tabla 76. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de Tordillos. 270

Tabla 77. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Tordillos, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias. 273

Tabla 78. Relación del número de alelos considerados en los perfiles de cada uno de los 42 individuos analizados, según el criterio elegido. 275

Tabla 79. Evaluación de los criterios para la selección de un perfil de STRs. 276

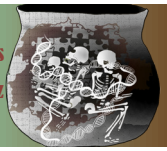
Tabla 80. Relación del número de relaciones de parentesco establecidas así como los linajes de ADN mitocondrial observados en cada yacimiento. 277

Tabla 81. Resultados obtenidos tras el análisis del sexo molecular mediante tres técnicas diferentes: análisis de STRs con dos kits comerciales y mediante Real Time PCR. En la segunda columna se muestra el sexo determinado antropológicamente, la sexta columna muestra un consenso molecular, indicando en la séptima si el resultado molecular es coincidente o no con el antropológico.. Cuando no hubo resultado se indica con un guión. 279

Figura 85. Proporción de varones y mujeres en cada periodo analizado. 280

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AC	Antes de Cristo (Calibrada)
a.C.	antes de Cristo (No calibrada)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aDNA	ADN antiguo, en inglés *Ancient DNA*
AMS	Datación Carbono 14 mediante Acelerador de espectrometría de masa, en inglés *Accelerator Mass Spectrometry*
AMGX	Fracción del gen de la amelogenina localizada en el cromosoma X
AMGY	Fracción del gen de la amelogenina localizada en el cromosoma Y
BP	Desde el presente, en inglés *Before Present*
C	Citosina
cm	Centímetros
com.pers.	Comunicación personal
CRS	Secuencia referencia de Cambridge, en inglés *Cambridge Reference Sequence*
D-Loop	Lazo D o región control del ADN mitocondrial, en inglés *Displacement Loop o Control Region*
DNA	Ácido desoxirribonucleico, en inglés *Desoxirribonucleic Acid*
E. coli	*Escherichia coli*
e.p.	En prensa
G	Guanina
g	Gramos
HVI	Región hipervariable I del ADN mitocondrial
HVII	Región hipervariable II del ADN mitocondrial
HVIII	Región hipervariable III del ADN mitocondrial
LCN	Bajo número de copias, en inglés *Low Copy Number*
LR	Razón de verosimilitud, en inglés *Likelihood Ratio*
LTD	Bajo número de moléculas de ADN molde, en inglés *Low Template DNA*
m	Metros
Mb	Mega bases, millones de bases
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mtDNA	ADN mitocondrial, en inglés *Mitochondrial DNA*
µg	Microgramos
µl	Microlitros
NGS	Técnicas de secuenciación de nueva generación, en inglés *Next Generation Sequencing*
nuDNA	ADN nuclear, en inglés *Nuclear DNA*
NUMTs	Pseudogenes del ADN mitocondrial insertados en el ADNN nuclear, en inglés *Nuclear mitocondrial DNA*



pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, en inglés *Polymerase Chain Reaction*
rCRS	Secuencia referencia de Cambridge revisada, en inglés *Revised Cambridge Reference Sequence*
rfu	Unidades referencia de fluorescencia, en inglés *Reference fluorescence units*
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR en tiempo real, en inglés *Real Time PCR*
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido, en inglés *Simple nucleotide polimorfism*
STR	Secuencias cortas repetidas en tándem, en inglés *Short Tandem Repeats*
UV	Ultravioleta

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

RESUMEN

El periodo cronológico que va desde el comienzo del Calcolítico hasta el final de la Edad del Bronce en la Submeseta Norte de la Península Ibérica abarca una serie de fenómenos sociales y culturales de gran interés, con la aparición de innovaciones culturales como la del Vaso Campaniforme o posteriormente la cultura de Cogotas I. Hasta la fecha son prácticamente nulos los estudios de ADN antiguo aplicados a restos esqueléticos de estos periodos temporales en la Submeseta Norte de la Península Ibérica, habiéndose publicado sólamente ciertos datos sobre los restos de la Cueva del Mirador ubicada en el entorno de Atapuerca (Burgos) (*Gómez-Sánchez et al., 2014*). Sin embargo, el análisis de marcadores genéticos en muestras humanas de estos periodos puede proporcionar información única y es un gran recurso para comprobar hipótesis planteadas desde la arqueología, la historiografía y la antropología.

Por ello, con esta tesis, tal como su propio título indica, se pretende abrir paso a la caracterización genética de las poblaciones que habitaron la Submeseta Norte entre 5.000 y 3.000 años atrás. Sin embargo también se ha considerado interesante abordar otra serie de aspectos de caracter metodológico. De manera que en esta tesis podemos diferenciar cuatro grandes ejes que se desglosan a continuación.

El primer eje hace referencia a los aspectos metodológicos. Pese al gran potencial de la técnica, existen ciertas limitaciones que no debemos obviar, todas ellas derivadas del hecho de que los restos arqueológicos presentan por lo general bajo contenido en ADN, y éste ADN a su vez suele verse afectado por diferentes fenómenos como la fragmentación, el daño molecular o la infiltración de sustancias tales como inhibidores de la PCR o ADN exógeno. Por ello, en este trabajo se han evaluado las característica macroscópicas de las muestras que contribuyen de manera más o menos negativa o positiva a la obtención de resultados fiables. Otra cuestione metodológica que se ha tenido en cuenta ha sido la evaluación de un método de extracción de ADN no destructivo, y se ha contrastado con otras dos metodologías diferentes para la extracción de ADN. Además, en lo relativo al estudio de marcadores autosómicos, STRs, se han establecido una serie de criterios para establecer perfiles genéticos consenso, valorando cuál es el criterio más apropiado, el que aporta mayor cantidad de información e introduce menor probabilidad de error.

El segundo eje, y quizá el más extenso, se centra en responder cuestiones de índole poblacional-cultural, pudiendo arrojar luz sobre cuestiones tan importantes como si las nuevas culturas materiales (principalmente la del Vaso Campaniforme y la de Cogotas I), van asociadas a la llegada de nuevos contingentes humanos que se asientan en la región, conviven con las preexistentes e incluso se mezclan, o si por el contrario se trata básicamente de conocimientos que se transmiten diferentes poblaciones sin que por ello tenga lugar una nueva contribución genética. Además, la fabricación manual de la cerámica, que vienen considerándose como trabajo llevado a cabo por las mujeres, de modo que gracias al estudio del ADN mitocondrial como marcador genético de linaje femenino, sería posible saber si son nuevas aportaciones femeninas las que están contribuyendo a la elaboración de esos nuevos productos materiales. Para resolver estas cuestiones se ha analizado el ADN mitocondrial de un total de 94 individuos procedentes de 28 yacimientos de 4 periodos crono-culturales distintos (Precampaniforme, Campaniforme, Cultura

Protocogotas I y Cultura Cogotas I) que se extienden desde finales del Calcolítico (Precampaniforme y Campaniforme) hasta plena Edad del Bronce (Protocogotas I y Cogotas I). Además se seleccionaron dos muestras correspondientes a un único individuo del Soto formativo (Bronce Final). Estas poblaciones además han sido comparadas también con otras de la Península Ibérica anteriores y posteriores en el tiempo. Como principales conclusiones, se ha observado que la cultura Campaniforme sí parece estar asociada a una llegada de nueva población genéticamente diferente a las poblaciones que habitaban la Península con anterioridad. Esta llegada no parece haber tenido lugar durante el Campaniforme, sino con anterioridad, durante el Precampaniforme; posteriormente las diferencias se irían reduciendo y la población sería cada vez más homogénea respecto de las poblaciones anteriores en el tiempo, hasta el periodo Protocogotas I durante el cual parece tener lugar una nueva llegada de contingentes humanos diferentes. De nuevo esto habría sucedido de manera previa al desarrollo pleno de la cultura Cogotas I. Así que en ambos casos, tanto al cultura Campaniforme como la de Cogotas I parecen asociarse a importantes cambios en la composición genética de las poblaciones, con llegada de nuevos pobladores. Con estos datos además se vendría a confirmar también la hipótesis de la vinculación entre las innovaciones en la cerámica y las mujeres.

Por otro lado, el tercer eje se enfoca sobre una cuestión importante en relación a las poblaciones estudiadas, como es la habitual aparición de enterramientos colectivos o múltiples, que muchas veces podrían ser interpretados como tumbas familiares. En este caso se han empleado herramientas forenses (kits de amplificación de miniSTRs) para poder analizar las relaciones de parentesco cercano entre los diferentes individuos exhumados en tumbas de este tipo. Se han obtenido resultados del estudio de miniSTRs en un total de 6 enterramientos colectivos y/o multiples;y se observan diferentes circunstancias en cada uno de ellos; no siendo demasiado frecuente el hallazgo de familias completas en una misma tumba. Sin embargo, sí se han detectado ciertas relaciones de parentesco cercano claras en algunos casos, como por ejemplo una relación de maternidad en el yacimiento de Los Tolmos (Caracena, Soria), que con enorme probabilidad eran una mujer embarazada y su feto.

Finalmente, el cuarto eje, pero no menos importante, centra su atención en otra cuestión en la que el estudio de ADN ha podido contribuir de manera importante a la investigación arqueológica, el diagnóstico molecular del sexo. Son numerosas las ocasiones en las que los restos esqueléticos no se conservan lo suficientemente bien como para poder determinar el sexo de forma segura mediante los protocolos de la antropología clásica; además en ciertos casos, como por ejemplo cuando se trata de individuos infantiles, la dificultad para determinar el sexo mediante métodos antropológicos se incrementa notablemente; por último, los frecuentes casos de indiviudos “alofisos”, que el sexo no puede ser determinado de forma concluyente por presentar rasgos eminentemente masculinos, junto a otros típicamente femeninos. Por todo ello, la determinación del sexo mediante métodos moleculares es un campo de gran interés, por ser este un dato primordial en cualquier estudio paleodemográfico así como en estudios de identificación personal. En la presente tesis se ha tratado de diagnósticar el sexo mediante la amplificación del gen de la amelogenina por tres técnicas diferentes, dos de ellas basadas en el empleo de kits de amplificación de miniSTRs y la tercera por RT-PCR (*Real Time PCR*). Se establece un resultado consenso entre los obtenidos y se valora la eficiencia de cada uno de los métodos.

ABSTRACT (ENGLISH)

The Chronological period since the beginning of the Chalcolithic to the end of the Bronze Age on the Iberian North Sub-plateau, involves interesting social and cultural phenomena, like the appearance of the Bell Beaker and later the Cogotas I culture. Up to date the DNA studies performed about skeletal remains from the Iberian North Sub-plateau of these periods are almost non-existent. Only, some data about the Mirador Cave, located in Atapuerca (Burgos, Spain) (Gómez-Sánchez et al., 2014) has been published. However, the DNA analysis in human skeletal ancient remains could provide valuable information and they are a great resource to prove several hypothesis formulated by other disciplines, like archaeology or anthropology.

Consequently, this thesis try to open up the genetic characterization of the human population, that lived on the North Sub-plateau between 5000 and 3000 years ago. Nevertheless, it was considered interesting to go in depth also in many methodology aspects. In this way, four main points have been analysed along this thesis.

The first point refers to the methodological aspects. Despite the great potential of the aDNA technical, there are several limitations that we must take into account; all of them derived from the low DNA content of ancient samples and it bad preservation stage. Additionally the aDNA should be affected by some different phenomena: DNA fracmentation, molecular damage and the infiltration of some kind of substances like PCR inhibitors and DNA exogenous. In order to analysed this failure factors, along this work, it was evaluated the different macroscopic characteristics of the samples according to the obtained results. Other methodological questions that has been taken into account were the evaluation of three different extraction DNA protocols, included one non-destructive extraction DNA protocol. Furthermore, regarding to the STR analysis, different criteria have been proposed in order to establish consensus STR profiles from partial STR profiles. This has been done taking into consideration which one in the most appropriate criterion and the one that provide the maximum quantity of information and the minimum probability of error.

The second main point, and maybe the largest one, analyses population and cultural questions that will be solved through the mtDNA analysis. Along this second point, it is intended to shed light on questions like if the different material cultures (Bell Beaker and Cogotas I) are associated with the arrival of new human populations who arrived to the region and established closed relationship with the endogenous populations or on the other hand if it could be the result of the transmission of knowledge without human population mixing. Other important question is the following: are the material cultures related to women populations? It is possible to answer this question through the mtDNA analysis. In order to solve all these questions, 94 individuals of 28 different archaeological sites of the Iberian North Sub-plateau have been analysed. These individuals were from four different Chrono-cultural periods (Pre Bell Beaker period, Bell Beaker period, Protocogotas I culture and Cogotas I culture) since the end of the Chalcolithic up to the Bronze Age. Additionally, it was selected also two samples from a Soto Formative

individual (Bronze Age Ending). All these populations were compared also with other Iberian previous and subsequent populations over the time. Through the results of these analysis, it is possible to conclude that the Bell Beaker culture is associated with the arrival of a new human population genetically different. The arrival of the new population took place before the complete development of the material culture, during the Pre-Bell Beaker Period. Also, it is possible to confirm that the Cogotas I culture is also precede by another human population arrival during the Protocogotas I period. As result, both cases, Bell Beaker and Cogotas I cultures, seem to be associated with important changes in the genetic composition of the human population. Moreover, it is possible to confirm the closed relation between the woman population movements and the material cultural changes.

The third point of interest of this thesis is focused on the establishment of kinship analysis between individuals buried together in multiple or collective burials. This kind of burials are assumed in many times as familiar burials. This part of the research have been performed in order to prove or discard the hypothesis about the familiar relationship between them. In order to achieve this target, forensic tools (miniSTRs amplification kits) have been used. It was possible to obtain results from 6 collective or multiple burials. The results achieved showed different circumstances in the analysis of each one. In most of the cases analysed, no complete familiar nucleus have been found in this kind of burials. However, some closed kinship have been identified, as the case of a mother and her child (fetus or new-born) in Los Tolmos (Caracena, Soria).

Finally, the last point, but not the less important, is focused on the molecular diagnosis of sex. The sex determination is an essential issue of any archaeological study. However, many times the skeletal remains are not enough well preserved to guarantee the anthropological sex determination. Furthermore, in the case of infant individuals, it is even more difficult to determine the sex by classic anthropological protocols. Other example of a critical situation to determine sex, are the cases when the anthropologist has to face with female remains with masculine traits or male remains with feminine traits. Due to all these possible situations, the sex determination through molecular methods is an important field of study. The sex of the individuals is an essential data for the paleodemography reconstruction and also in personal identification studies. Concretely, the molecular diagnosis of the sex has been carried out through the amplification of amelogenine gen by miniSTRs amplification kits and by RT-PCR (Real Time PCR). Finally, a consensus result between the different methods have been established and the efficiency of each one has been evaluated.

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

Introducción

al estudio del ADN antiguo

Sólo somos una raza avanzada de monos en un planeta menor de una estrella promedio. Pero podemos entender el universo. Eso nos hace muy especiales.

Stephen Hawking

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

1 INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DEL ADN ANTIGUO

1.1 EL ESTUDIO DEL ADN ANTIGUO

Hacia la mitad de la década de los ochenta se publicaron los primeros estudios sobre ADN antiguo (*Higuchi et al., 1984; Pääbo, 1985; Pääbo, 1989*). Sin embargo, aquellos trabajos presentaron elevadas tasas de contaminación con ADN exógeno, debido a la escasa cantidad y a la mala calidad del ADN propio de la muestra. De modo que en muchas ocasiones no fue posible la replicación de resultados; lo que hoy se considera un criterio indispensable para poder validar cualquier estudio arqueogenético (*Handt et al, 1994; Pääbo et al 2004*).

Desde entonces la disciplina ha continuado evolucionando, estandarizándose protocolos e implementando técnicas cada vez más eficientes. Ya en 1987, se desarrolló la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (*Mullis y Faloona, 1987*), gran hito en el campo de la biología molecular, que posibilitó en el ámbito del ADN antiguo la amplificación y análisis de ADN a partir de cantidades ínfimas de moléculas degradadas. A este respecto, destacan los primeros trabajos de ADN antiguo de Pääbo y Wilson (*Pääbo y Wilson, 1988*) en los que se indican las ventajas de la técnica de la PCR. Tan sólo un año más tarde fue posible la obtención de ADN a partir de restos óseos y dentales de hasta 5.000 años de antigüedad (*Hagelberg et al., 1989*). Básicamente, la tecnología de la PCR aplicada al estudio del ADN antiguo busca aislar fragmentos de ADN a partir de un resto humano, o en general biológico, y obtener millones de copias de una secuencia de interés o *target* (amplificación). Finalizado el proceso de PCR, se procede a leer la información compleja almacenada en ese ADN en forma de una determinada secuencia de bases. Esta lectura es posible gracias a equipos automatizados de secuenciación de ADN (secuenciadores), bien sean secuenciadores clásicos o los últimos de nueva generación (*Next Generation Sequence*) (*Palomo-Díez et al., 2014*).

Sin embargo es importante tener en cuenta que la gran eficiencia y sensibilidad de la PCR a la hora de crear copias de ADN conlleva además un gran riesgo de contaminación, ya sea con ADN exógeno de los propios manipuladores o de moléculas que ya hubieran sido procesadas de manera previa en el laboratorio (*carry-over*). Esta probabilidad de contaminación además se ve incrementada cuando hablamos de ADN antiguo, ya que este tipo de ADN es escaso y de mala calidad, lo que le hace más susceptible de ser contaminado. Un claro ejemplo de contaminación se ha dado en la publicación de secuencias de millones de años de antigüedad que en un comienzo fueron recibidas con gran entusiasmo, pero también con cierta polémica (*Goldenberg et al., 1990*) y que fueron muy criticadas por la imposibilidad de replicar sus resultados de manera independiente (*Pääbo y Wilson, 1991; Lindahl, 1993*). Hay que tener en cuenta que una molécula de ADN fresco procedente de una fuente contaminante tiene más probabilidad de ser amplificada que las

moléculas antiguas endógenas, degradadas y dañadas, de la muestra objeto de estudio.

Desde aquellos primeros trabajos el campo de la arqueogenética ha evolucionado notablemente, y se ha pasado del análisis de pequeños fragmentos de ADN a la amplificación de genomas mitocondriales completos, gracias a las nuevas técnicas de secuenciación masiva (Morris et al., 2014; Meyer et al, 2014).

1.1.1 Aplicaciones

Las aplicaciones del estudio del ADN a partir de muestras antiguas son amplias, y dependen fundamentalmente de la cuestión que nos planteemos. En la mayoría de las ocasiones nos referimos a estudios sobre restos esqueléticos humanos, pero del mismo modo es posible el análisis de restos orgánicos de otras especies animales o vegetales.

Uno de los marcadores más empleados es el ADN mitocondrial, por ofrecer una mayor garantía de resultado debido a su mayor número de copias en la célula eucariota animal; pero también cabe la posibilidad de amplificar marcadores nucleares que nos van a aportar una información diferente, si bien esta última posibilidad es más difícil debido a la mayor escasez del ADN nuclear.

En cualquier caso, es fundamental conocer la cuestión de partida, para de ese modo aplicar el estudio del marcador más adecuado. A continuación se describen las principales aplicaciones del ADN antiguo.

1.1.1.1 Caracterización Genética De Las Poblaciones Antiguas

Las distintas poblaciones humanas llevan asociadas diferentes distribuciones de frecuencias de ciertas características genéticas, y esto se ve reflejado en una distribución geográfica de los marcadores genéticos. Esto sirve para distinguir una población de otra y para conocer su historia y origen. Gracias a la posibilidad de recuperar información genética de las poblaciones del pasado, podemos conocer la variabilidad genética de las poblaciones antiguas, así como el estudio temporal de los cambios genéticos ocasionados por fenómenos de mutación genética, pero también por migración y mezcla de poblaciones. Todo ello nos permite verificar las hipótesis planteadas por la historia, prehistoria o arqueología acerca de las migraciones del pasado y las diferentes barreras de tipo geográfico, cultural o religioso. Algunos ejemplos de este tipo de estudios son el poblamiento de América (*García-Bour et al., 2004*) o el proceso de difusión del neolítico en Europa (*Fernandez, 2005; Gamba et al., 2011; Gamba et al., 2012; Fernandez et al., 2014*).

1.1.1.2 Origen Geográfico

En este mismo contexto, es posible la atribución, en términos de probabilidad, de un origen poblacional y geográfico a un individuo aislado; gracias a la caracterización molecular de poblaciones, en base a la distribución diferencial de las frecuencias de sus marcadores genéticos.

Para llevar a cabo este tipo de estudios a partir de restos de origen arqueológico, lo más habitual es el análisis de marcadores de ADN mitocondrial, por ser este tipo de ADN más abundante en la célula eucariota animal (presentando miles de copias por célula) que el ADN nuclear (que tan sólo presenta dos copias por célula en el caso de los marcadores autosómicos y únicamente una copia cuando hablamos de cromosomas sexuales). Para la asignación de un origen geográfico a un individuo a través del estudio de su ADN mitocondrial, se han establecido una serie de haplogrupos que se asignan en función de los haplotipos de cada individuo. La clasificación de haplogrupos mitocondriales conocidos hasta el momento se recoge en el *phylotree* (*Van Owen and Kayser, 2008).* Durante el empleo de este marcador para conocer el origen biogeográfico de un individuo o analizar orígenes poblacionales, siempre se debe tener en cuenta la vinculación mitocondrial al linaje materno, siendo este un marcador de origen únicamente matrilineal.

No obstante, el origen biogeográfico del individuo también puede estudiarse a través de marcadores autosómicos o de los cromosomas sexuales. En contraposición al ADN mitocondrial que se hereda de manera matrilineal, nos encontramos con los marcadores del cromosoma Y, que aportarían la información relativa al origen paterno. El estudio conjunto de estos dos marcadores (ADN mitocondrial y cromosoma Y), proporcionaría una información muy completa sobre el origen tanto paterno como materno del individuo. Sin embargo, el estudio del cromosoma Y a partir de muestras de origen arqueológico, suele ser bastante más dificultoso. El cromosoma Y representa tan solo entre el 2 y el 3 % del genoma humano haploide y posee muy pocos genes codificantes. En esencia es un marcador de linaje ya que su porción no recombinante completa se transmite de manera invariable a lo largo de la línea paterna, variando exclusivamente a través del acumulo progresivo de mutaciones. Es decir, tiene una utilidad similar a la del ADN mitocondrial, con la diferencia clave de que en este caso el cromosoma Y solamente es transmitido y heredado por los varones, exactamente igual que tradicionalmente los apellidos en muchas sociedades, de ahí que se hayan realizado estudios en paralelo del origen de apellidos y el cromosoma Y (*López-Parra et al, 2005; Arroyo-Pardo et al, 2009*). Por ello, al igual que en el ADN mitocondrial, también se habla de haplotipos del cromosoma Y, que en este caso se basan en la información proporcionada por una batería de STRs. Pero para el análisis filogenético de este marcador, es importante completar esa información con aquella proporcionada por sistemas con una tasa de mutación menos elevada, por ejemplo, los SNPs (*Jobling y Tyler-Smith, 2003*).

Otro marcador interesante, pero muy poco utilizado es el cromosoma X. Sin embargo el hecho de que este marcador presente recombinación, hace que muestre mayores dificultades y por lo tanto los estudios asociados al cromosoma X son reducidos debido a las dificultades asociadas a la construcción de diferentes

filogenias (*Tomas et al., 2008, Pereira et al 2011*). Filogenéticamente es interesante porque representaría la historia de la población humana y no solo de uno de los sexos, como ocurre en los otros casos, como por ejemplo en el caso del cromosoma Y que tan sólo es heredado por los varones. Pero a pesar de su gran potencial, el cromosoma X no ha sido objeto de estudio en la parte poblacional de esta tesis; entre otras razones por la dificultad de obtención de resultados a partir de muestras antiguas en este tipo de marcador. Además posteriormente (punto 1.1.1.3) veremos que el cromosoma X también presenta gran interés en la resolución de ciertos tipos de relaciones de parentesco.

1.1.1.3 Estudio De Relaciones Familiares

Cuando en una excavación arqueológica se encuentran enterramientos múltiples, la determinación de relaciones de parentesco biológico puede ayudar a la comprensión de las pautas de enterramiento así como de ciertas características del comportamiento social, siendo todo ello de gran utilidad para la investigación arqueológica (*Gamba et al., 2010*).

A día de hoy son escasos los trabajos sobre establecimiento de relaciones familiares en enterramientos colectivos de los periodos cronológicos estudiados en esta tesis, en la región central de la Península Ibérica, tan sólo se conocen algunas referencias al Noreste de España (*Simón et al., 2011*).

Para establecer este tipo de relaciones, se emplea la información procedente de los marcadores genéticos, especialmente marcadores autosómicos, de origen nuclear, por ser los que más información aportan. Aunque también pueden aportar información suplementaria marcadores de herencia haploide como el ADN mitocondrial y los polimorfismos de cromosoma Y y del cromosoma X, de origen nuclear.

Los marcadores autosómicos se sitúan en las 22 parejas de cromosomas heredados de los progenitores. Los STRs (*Short Tandem Repeats*), son pequeños fragmentos de 2 a 6 pares de bases que se repiten un número determinado de veces. Estos marcadores se han hecho populares debido a que son fácilmente amplificables por PCR y son útiles dentro del ámbito forense a la hora de identificar individuos o establecer relaciones de parentesco cercano (*Butler, 2005; Gamba et al., 2010*). Aunque también se han empleado con otros fines, como la caracterización de enfermedades (ver apartado 1.1.1.7).

Sin embargo, los STRs autosómicos tienen el inconveniente de que su origen nuclear (solo dos copias por núcleo celular, una procedente del padre y otra de la madre) hace mucho más difícil su recuperación cuando la muestra biológica está degradada, frente a las 1000-10000 copias de ADN mitocondrial presentes en cada célula del individuo (*Palomo-Díez et al., 2014*).

Durante la amplificación de STRs autosómicos en ADN antiguo es fundamental tener presente la posible aparición de fenómenos estocásticos. Estos fenómenos en presencia de ADN de baja cantidad y mala calidad (denominado también LTD, *low template DNA*) pueden manifestarse por ejemplo generando alelos muy desequilibrados en un marcador, o incluso provocando la desaparición de manera aleatoria de

uno de los alelos, produciéndose fenómenos de *Alelic dropout* (*Butler, 2005*). Las reacciones de PCR con ADN con una concentración por debajo de los 100pg suelen mostrar fenómenos de este tipo (*Fregeau et al 1993, Kimpton et al 1994, Gill et al 2000, Butler, 2005*). Esto se manifiesta en forma de una falsa homocigosis, ya que el segundo alelo no es detectado. Estos problemas estocásticos pueden evitarse ajustando el número de ciclos de la reacción de PCR (*Butler, 2005*). Otro fenómeno que podemos observar es la presencia de *Stutters (*ver apartado 4.2.3.3.2.1 de Material y Métodos). Los *stutters* consisten en unos pequeños picos de varias bases más pequeños que los alelos reales que se manifiestan en forma de "sombra" que antecede al pico principal. Dichos picos son un resultado del proceso de PCR por el cual la ADN-polimerasa introduce una unidad de repetición extra durante la amplificación y se manifiesta en forma de esa "sombra" o "eco" (*Buttler, 2005*).

El análisis de este tipo de marcadores difiere del anterior análisis empleado para el ADN mitocondrial, en el cual hacíamos una simple reacción en cadena en la que se obtenían copias de un fragmento de interés y posteriormente se leía su secuencia de nucleótidos. En este caso lo que se pretende determinar es el número de veces que se repite la unidad de repetición de un marcador STR concreto. Es decir, un STR consiste en un fragmento de ADN compuesto por un determinado número de pares de bases con una secuencia concreta que se repite un número de terminado de veces. Por lo tanto, los STRs varían en función del número de pares de bases que componen una unidad de repetición y del número de repeticiones de dicha unidad (*Buttler, 2005*).

El pequeño tamaño de los STRs hace de ellos una gran herramienta para el estudio de ADN autosómico en muestras degradadas. Aunque de entre todos los STRs aquellos con un menor tamaño (menor tamaño del amplicón) serán los mejores candidatos para los estudios forenses y de ADN antiguo. La metodología para la detección de los STRs es similar a una electroforesis clásica, con la excepción de que en este caso se emplean una serie de fluorocromos para identificar a cada marcador, y el resultado se observa en forma de picos en un electroferograma en lugar de bandas en un gel (Butler, 2005).

Hoy en día se emplean plataformas para la detección de estos STRs, siendo algunos de los más populares el *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* de un capilar (utilizado en los análisis de la presente tesis) y el *ABI Prism 3100* de 16 capilares de la casa *Applied Biosystems*. El primero de ellos se introdujo en el año 1995, y desde entonces se ha convertido en un método ampliamente utilizado en los laboratorios de genética forense para el tipaje de STRs, entre ellos el laboratorio del FBI de Washington (*Butler, 2005*). El *ABI 310* es un instrumento de un único capilar con detección de múltiples colores de fluorescencia, y básicamente lo que lleva a cabo es una electroforesis para la separación de las cadenas de ADN en función de su peso molecular, pudiendo diferenciarlas además por los distintos fluorocromos que se han incorporado previamente durante la PCR realizada con determinados kits específicos para el análisis de STRs (*Butler, 2005*).

En los últimos años, con la difusión de programas informáticos, las relaciones familiares pueden establecerse en términos de probabilidad matemática, del mismo modo que se hace en casos forenses, de manera más

sencilla y rápida (*Kling et al., 2014*). Este procedimiento tiene el inconveniente de la inexistencia de bases de datos de ADN antiguo correspondientes a cada población antigua (según corresponda). Por lo que para la interpretación de los resultados se emplean las frecuencias genéticas de las poblaciones actuales, que no tienen por qué ser las mismas frecuencias que en el pasado, si bien aportan la ventaja de objetivar conclusiones que de otro modo quedarían como meras interpretaciones de los resultados.

Los programas informáticos, tales como el software Familias (*Kling et al., 2014*), creados para el cálculo de probabilidades de parentesco, se basan en el cálculo de LRs (*Likelyhood Ratio*, o lo que es lo mismo razones de verosimilitud). Se trata de un cociente entre la probabilidad de que se cumpla una hipótesis de parentesco, frente a la probabilidad de que no se cumpla dicha hipótesis.

Los marcadores de los cromosomas sexuales, X e Y, también pueden resultar muy interesantes en el establecimiento de relaciones de parentesco, sobre todo para complementar el análisis de STRs autosómicos. A pesar de que ambos presentan el problema de una mayor escasez de copias en el genoma.

Tal como ya se mencionó anteriormente, el cromosoma Y es en esencia un marcador de linaje, ya que su porción no recombinante completa se transmite de manera invariable a lo largo de la línea paterna, variando exclusivamente a través del acumulo progresivo de mutaciones. Pero también puede emplearse para el establecimiento de relaciones de parentesco padre-hijo.

Por otro lado, el cromosoma X contiene unas 153Mb, aproximadamente el 5% del total del genoma humano. Aunque se presente en doble copia en las mujeres, existe un mecanismo de compensación por el que solo uno de los dos X queda activado. La recombinación y su elevado desequilibrio de ligamiento hacen que utilizar el X como marcador de parentesco sea muy complicado a la hora de interpretar los resultados por ejemplo en un estudio sobre una relación madre-hija. Sin embargo tiene un interés muy especial en algunos casos concretos de relaciones de parentesco cercano (*Gomes et al., 2012, Pereira et al., 2011; Gusmao et al., 2008; Gusmao et al, 2009*). La utilización del cromosoma X puede ser fundamental en estudios de parentesco entre un supuesto padre y una supuesta hija (mujer), en ausencia de la madre; ya que en un caso como este, ambos (padre e hija) deberían compartir un cromosoma X exactamente idéntico. Del mismo modo, puede resultar muy útil si el padre se encuentra ausente, pero se cuenta con la presencia de la supuesta abuela paterna, la cual también compartirá un cromosoma X con su nieta. También podríamos encontrar cierto grado de parentesco a través del cromosoma X entre una mujer y sus tías paternas en ciertas ocasiones (*Gomes et al., 2012, Pereira et al., 2011*).

Por ello, en el contexto de esta tesis, se ha realizado el estudio de marcadores (STRs) de cromosoma X en algunos casos muy concretos (en el estudio relativo a los restos del yacimiento de Los Tolmos, ver *Tabla 66* del apartado 5.3.3.1).

1.1.1.4 Determinación Del Sexo

Con cierta frecuencia, la preservación de restos óseos humanos no permite determinar el sexo del individuo mediante el diagnóstico anatómico. Esto sucede no solo en aquellos casos en los que los restos se hallan fragmentados, sino también en restos humanos infantiles o bien en un reducido porcentaje de individuos masculinos con rasgos esqueléticos femeninos o femeninos con rasgos esqueléticos masculinos. En todos estos casos el diagnóstico molecular del sexo puede ser de utilidad, ya que su determinación a través de la metodología antropológica clásica puede resultar muy difícil, si no imposible en ciertos casos. Una de las pruebas más empleadas consiste en la determinación de la secuencia del gen de la amelogenina, situado en los cromosomas X e Y, que presenta en determinadas partes de su secuencia una longitud diferencial. La técnica aprovecha estas pequeñas diferencias para establecer la presencia de un único tipo de cromosoma (XX), como sucede en las mujeres, o de dos tipos diferentes (XY), como ocurre en los varones (*Akane et al. 1998; Sullivan et al. 1993; Alonso et al, 2004; Bauer et al., 2013*). Así, dado un grupo de individuos, la determinación del porcentaje de sexos en la población puede contribuir a sostener distintas hipótesis arqueológicas y/o antropológicas.

1.1.1.5 Identificación Personal

La tecnología del ADN antiguo ha sido empleada en el pasado para la identificación de restos óseos y dentales (*Jeffreys et al. 1992; Burger et al. 1999*). Concretamente, se ha empleado para la identificación de personajes históricos como es el caso de los supuestos cadáveres de la familia imperial zarista (*Gill et al. 1994*), especialmente el asunto de la célebre princesa Anastasia. Este caso se resolvió mediante el empleo conjunto de marcadores autosómicos y de ADN mitocondrial (*Gill et al. 1994; Coble et al., 2009*). Otros casos célebres han llevado a la publicación de una secuencia mitocondrial de unos restos atribuidos al evangelista San Lucas procedentes de un sepulcro de Pádua (*Vernesi et al. 2001*). E incluso se han realizado atribuciones de una mancha de sangre correspondiente al rey de Francia, Luis XVI (*Olalde et al, 2013*).

Al igual que en el caso de las relaciones familiares, los programas informáticos específicos permiten estimar hipótesis arqueológicas e históricas de identificación en términos de probabilidad matemática. Del mismo modo en estos casos, el marcador estrella empleado es el STR autosómico, por ser el que aporta mayor información a la hora de estudiar tanto relaciones de parentesco cercano como para poder realizar identificaciones, por ser este tipo de marcador más específico. No obstante en numerosas ocasiones los estudios de marcadores autosómicos son complementados con análisis de otros tales como el ADN mitocondrial e incluso el cromosoma Y. Estos dos últimos marcadores, jugaron por ejemplo un papel importante en los análisis que llevaron a resolver la vinculación de los esqueletos de la familia de los Zares de Rusia con familiares vivos, tales como el Duque de Edimburgo (*Coble et al., 2009*).

A pesar de que la mayor parte de los casos de identificación personal se han basado en los marcadores ya descritos, en algunos casos se han llegado a amplificar marcadores relacionados con características fenotípicas del individuo, tal como el color de ojos en el caso del análisis de una mancha de sangre atribuida al Rey Luis XVI de Francia (*Olalde et al 2014*).

1.1.1.6 Análisis De Otras Especies Animales Y Vegetales

La recuperación de ADN de restos antiguos no se limita únicamente a los seres humanos de poblaciones pretéritas, sino que también puede efectuarse en otro tipo de vestigios biológicos. El estudio genético de especies vegetales antiguas, extintas o no, nos permite la posibilidad de reconstruir paisajes, e incluso de conocer cómo tuvo lugar la dispersión de determinadas formas de agriclutura. Un ejemplo de ello es la identificación de ADN de semillas del género *Triticum L*., que ha permitido verificar hipótesis arqueológicas sobre los cultivos de cereal de las poblaciones neolíticas de la Península Ibérica (*Fernandez et al. 2013*). Así mismo, el aislamiento de ADN a partir de restos de animales ha permitido conocer la difusión de ciertas razas de interés ganadero, distinguir molecularmente entre óvidos y cápridos, tan frecuentes en algunos tipos de enterramiento o, simplemente, conocer el genoma de especies ya extinguidas (*Higuchi et al. 1984; Debruyne et al. 2003*). Un ejemplo de esto último es la obtención de la secuencia completa del ADN mitocondrial correspondiente a dos aves (moas) extintas (*Cooper et al, 2001*).

Al menos teóricamente, la recuperación de ADN puede ensayarse en restos biológicos de lo más dispar, como son las pupas de insectos que acompañan a momias, coprolitos, especies animales extinguidas, pólenes, etc.

1.1.1.7 Paleopatología

Otra aplicación de la tecnología del ADN antiguo es la caracterización genética de enfermedades. Esta aplicación resulta de gran importancia, dado que existen diversas lesiones osteológicas similares, o incluso idénticas, entre sí, que construyen en común un síndrome osteoarqueológico a través del cual se puede concluir un diagnóstico más o menos fiable, pero en diversas ocasiones, ese “cuadro clínico” puede ser síntoma de diferentes patologías (*Thillaud, 1994*). Por ello a través de la observación de las lesiones del hueso, en ciertas ocasiones, no es posible determinar la patología exacta a la que es debida dicha lesión. Además debemos señalar que la paleopatología clásica se centra en la determinación de enfermedades que dejan señal en el hueso, sin embargo estas enfermedades son minoritarias en comparación con todas aquellas que no dejan ningún síntoma en nuestro esqueleto o dentición. Un ejemplo de ello son las enfermedades relacionadas con intolerancias alimenticias, sobre las que ya se han realizado análisis genéticos en muestras antiguas, tales como los estudios realizados sobre la intolerancia a la lactosa (*Burger et al, 2007; Krüttli et al., 2014*) o incluso sobre casos de celiaquía en restos humanos antiguos (*Gasbarrini et al., 2012*).

A menudo, cuando se trata de enfermedades infecciosas, la presencia del agente infeccioso deja lesiones mínimas que apenas son valorables desde el punto de vista antropológico o que pueden ser síntoma de diferentes dolencias. Por ejemplo, la infección con diferentes especies de treponemas, genera señales osteológicas similares, sin embargo no siempre la enfermedad generada es la misma; por ejemplo en el caso de la sífilis se han realizado estudios de identificación del patógeno que causa la enfermedad (*Treponema pallidum*) en restos esqueléticos de 200 años de antigüedad (*Kolman et al, 1999);* y en el caso de la lepra incluso más antiguos *(Montiel et al., 2003*).

La amplificación y detección de secuencias específicas del agente infeccioso puede contribuir a determinar la causa de la muerte así como corroborar otras hipótesis de interés arqueológico e histórico. En los casos en los que la lesión ósea es evidente, el diagnóstico molecular puede confirmar el diagnóstico antropológico y a veces aportar información sobre la variabilidad genética del agente infeccioso y su posible relación con cepas del citado agente, con una distribución geográfica específica, permitiendo así obtener información sobre la evolución de una epidemia.

1.1.2 Características Del Estudio De ADN Crítico

La obtención de ADN a partir de muestras críticas depende del grado de preservación de la muestra. Un mal estado de preservación del ADN se va a manifestar de diferente manera en secuencias de ADN o en marcadores STRs.

Unos cinco minutos tras la muerte, el nivel de oxígeno en la sangre desciende y el dióxido de carbono aumenta, esto produce que el pH disminuya y los productos de degradación de la célula comiencen a acumularse. Al mismo tiempo, las enzimas líticas de la propia célula comienzan a degradar los componentes celulares, rompiendo membranas y liberando otras enzimas intracelulares como las endonucleasas, las cuales actúan degradando el material genético (*Gilbert, 2005*).

Además de los fenómenos autolíticos, también los microorganismos, los hongos del suelo y los insectos llegan hasta el cuerpo en descomposición, contribuyendo al proceso de degradación (Gilbert, 2006). Además, debemos tener en cuenta que la velocidad de la tasa de descomposición puede variar dependiendo de diferente factores, y especialmente en función de las condiciones ambientales, tales como la luz, la humedad y la temperatura; que actúan de manera importante acelerando o decelerando la actividad enzimática (*Bus and Allen, 2014*).

Muchas veces las condiciones ambientales en que se produce la degradación de la materia orgánica son más relevantes que el tiempo transcurrido o la antigüedad de la muestra (*Nielsen-Marsh y Hedges, 2000; de Torres et al., 2002; Allentoft et al, 2012*).

Desde un punto de vista molecular, las principales consecuencias de todos estos procesos son: en primer lugar, la escasez de moléculas de ADN (bajo número de copias o *low copy number*, LCN). Además, esas

pocas moléculas, suelen estar fragmentadas y presentan alteraciones moleculares. En tercer lugar, la escasez de fragmentos íntegros y endógenos a la muestra, hace que ésta sea más susceptible de ser contaminada con ADN exógeno, procedente del medio externo o de las personas que han estado en contacto con la muestra (arqueólogos y/o antropólogos, por ejemplo) o que trabajan en el laboratorio. Por último, ciertas impurezas del suelo pueden ser arrastradas en el proceso de extracción de ADN con efecto inhibidor en las reacciones químicas que hacen posible amplificar y secuenciar.

Todos estos problemas se pueden enfrentar mediante un conjunto de procedimientos estándar conocido como "criterios de autenticidad", que contemplan medidas preventivas en el laboratorio en cuanto a métodos de aislamiento, infraestructuras especiales, instrumental y técnicas específicas, de manera que solo mediante su observancia puede decirse que un resultado de ADN antiguo está validado por la comunidad científica (*Pääbo et al. 2004*).

1.1.3 Estrategias Y Criterios De Autenticidad

Debido a los problemas que conlleva el estudio de muestras donde la cantidad de ADN es baja y de mala calidad, se han establecido, como ya hemos dicho, una serie de normas o criterios para poder ofrecer resultados sólidos y fiables (*Pääbo et al 2004*). A continuación se citan los principales problemas que plantea cualquier análisis de ADN antiguo, y las estrategias que se toman para enfrentarnos a dichos problemas y poder generar resultados sólidos y fiables.

1.1.3.1 La Escasez De ADN. Problema Y Estrategias

El primero de los problemas planteado en el apartado anterior, es la escasez de ADN. Para obtener amplificados cuando la cantidad de ADN de partida es muy baja, se toman tres medidas básicas para optimizar los resultados: la primera es la utilización de mayores cantidades de extracto de ADN durante la PCR. Además, y en segundo lugar, se pueden emplear kits específicos para muestras degradadas, que ya son comercializados por distintas empresas. La tercera medida, pero no menos importante, es la aplicación de un mayor número de ciclos al programa del termociclador (*Palomo-Díez et al., 2014*).

1.1.3.2 Fragmentación De Las Cadenas De ADN. Problema Y Estrategias

El segundo problema que hemos venido viendo es la fragmentación de las cadenas de ADN. Esto se refleja en la imposibilidad de amplificar un fragmento de ADN de larga longitud, no obteniendo resultado alguno debido a que el fragmento se encuentre roto en algún punto.

Por ello, a la hora de trabajar con ADN antiguo, para conseguir la amplificación de un fragmento de ADN

largo, se trabaja amplificando fragmentos de ADN de corta longitud que solapen entre sí (*Serre et al., 2004*). Se amplifican cuantos pequeños fragmentos sean necesarios hasta completar toda la región de interés.

1.1.3.3 El Daño Molecular. Problema Y Estrategias

El daño molecular que sufre el ADN tras tiempo de exposición a diferentes agentes ambientales puede manifestarse de diferentes formas. Una de las más "peligrosas" en lo que a interpretación de resultados se refiere ocurre cuando el daño molecular se percibe en forma de "falsas mutaciones"; es decir, puede que observemos alteraciones en las cadenas de ADN que pueden ser confundidas con mutaciones, cuando en realidad son producto del daño que han sufrido las moléculas. Este fenómeno suele ser consecuencia de las denominadas "*miscoding lessions*" (*Gilbert et al, 2007; Vives et al, 2008*). Por las cuales las cadenas de ADN sufren modificaciones en su secuencia de bases, producto de las transformaciones post-mortem (*Brotherton et al, 2007*) que pueden ser confundidas con mutaciones, cuando en realidad no lo son. Sin embargo, ha sido posible vencer este problema mediante diversas estrategias en diferentes estudios de ADN antiguo (*Fernández et al, 2014*).

Para detectar estos fenómenos y no interpretar de manera errónea los resultados, es fundamental realizar el proceso experimental varias veces a partir de la misma y de distintas muestras del mismo individuo, para poder comprobar que los resultados son consistentes (*Pääbo et al, 2004*). El criterio fundamental que distingue el daño molecular post-mortem de una verdadera mutación es que un cambio de base nitrogenada en una cadena de ADN provocado por daño molecular aparecerá de manera aleatoria, pero no en todas sus cadenas de ADN, como debe ocurrir en caso de que se trate de una mutación real.

Es decir, la estrategia que empleamos para detectar el daño molecular, consiste en la realización de varias extracciones de ADN a partir de distintas muestras del mismo individuo. A su vez se realizan diferentes amplificaciones a partir de cada uno de los extractos obtenidos (*Fernández et al, 2014; Gamba et al, 2012*). De este modo, se tomará como válido un perfil genético cuando este sea replicable, es decir cuando se haya obtenido el mismo resultado a partir de las sucesivas amplificaciones del mismo y de diferentes extractos de un mismo individuo. De ese modo las alteraciones moleculares serán detectadas y las falsas mutaciones descartadas. Otro método ampliamente aplicado para resolver esta cuestión es la clonación bacteriana. Estos son algunos criterios fundamentales para la validación de resultados en estudios de ADN antiguo (*Pääbo et al., 2004*).

1.1.3.4 La Presencia De Sustancias Inhibidoras De La PCR. Problema Y Estrategias

Otro problema importante en la arqueogenética es la infiltración de inhibidores de la PCR. Se trata de sustancias que pueden ser subproductos generados por la degradación de la materia orgánica, o

bien pueden proceder de la composición del suelo en el que se encuentra enterrado el resto (por ejemplo, los ácidos húmicos y flúvicos del suelo). También pueden ser sustancias sintéticas como por ejemplo las resinas artificiales utilizadas por el investigador. En cualquier caso, se trata de substancias que pueden llegar a ser co-purificadas junto con el ADN (*Pääbo et al, 2004*) y el resultado de este problema se traduce en la no obtención de resultados, ya que estos productos interfieren en la PCR bloqueando la actividad enzimática de la polimerasa (*Tuross, 1994*; *Willson, 1997*).

Es posible detectar la presencia de inhibidores, y pueden eliminarse mediante una mejor limpieza del extracto, pero en ocasiones su eliminación no es sencilla. Para evitar este tipo de agentes es importante realizar una buena selección de la muestra, con una coloración clara y natural (ya que los colores anaranjados y/o marrones, suelen ser indicativos de presencia de inhibidores en algunos casos).

Sin embargo, en numerosas ocasiones la detección y eliminación de sustancias inhibidoras resulta muy compleja, y aunque la mayor parte de las estrategias para enfrentar este problema se han centrado en la realización de múltiples lavados de la muestra; en los últimos años se han abierto otras posibles vías de ataque al problema, tal como el diseño de nuevas polimerasas termoestables (*Monroe et al., 2013*).

1.1.3.5 La Contaminación. Problema Y Estrategias

Cómo ya se mencionó con anterioridad, la escasez y mal estado de conservación del ADN en una muestra antigua, hacen que se incremente la posibilidad de contaminarla con ADN exógeno.

La contaminación puede producirse en diferentes estadios del proceso (*Palomo-Díez et al, 2011; Palomo-Díez et al, 2014*). De hecho es posible, aunque poco común, que la contaminación tenga lugar antes de la exhumación del resto (Por ejemplo entre individuos enterrados de forma colectiva). Posteriormente la muestra puede contaminarse si no se toman las precauciones necesarias durante la exhumación, durante la realización del estudio antropológico, o posteriormente en el propio laboratorio de genética. Por esa razón es fundamental tipar genéticamente a todo el personal que entra en contacto con la muestra desde el comienzo del proceso, hasta el final (*Fernández, 2005 Palomo-Díez et al, 2011; Palomo-Díez et al, 2014*). Además, se recomienda que aquellas muestras que vayan destinarse a un estudio genético sean exhumadas en primer lugar, y aisladas en un recipiente estéril, permitiendo que se sequen previamente para evitar la condensación de la humedad dentro del recipiente. Además, debemos tener en cuenta que la contaminación puede no venir dada únicamente por las personas que entran en contacto con la muestra, sino también por el ambiente del laboratorio. Las cadenas de ADN contaminantes pueden estar presentes en los reactivos o en los utensilios empleados. Por esta última razón es fundamental cumplir minuciosamente todos los criterios de autenticidad (*Pääbo et al., 2004*), y mantener el laboratorio en condiciones de máxima esterilidad, limpiando todas sus superficies antes y después de cada utilización con lejía y etanol al 70%, así como radiándolo con luz ultravioleta. De no seguir estas pautas rigurosamente podría tener lugar una contaminación generalizada de las muestras, produciendo falsos resultados.

Las muestras seleccionadas con fines de análisis genético deben ser monitorizadas en todo momento, controlando a las personas que entran en contacto más o menos directo con ellas. No obstante, a pesar de cumplir todos los criterios de autenticidad destinados a impedir la contaminación, en algunas ocasiones se siguen detectando cadenas de ADN exógeno en los extractos de ADN antiguo. Por ello en los últimos años han surgido algunos estudios destinados a la detección de contaminación y aislamiento de las cadenas endógenas de la muestra por otras metodologías (*Skoglund et al, 2013*). Teniendo en cuenta que el ADN antiguo suele caracterizarse por mayores niveles de daño molecular (*miscoding lessions*) que el ADN moderno, se han desarrollado modelos matemáticos para valorar la probabilidad de que las diferentes cadenas de ADN que resultan de un amplificado sean endógenas a la muestra o contaminantes (*Skoglund et al., 2013*).

También es posible detectar la presencia de inhibidores mediante cuantificación por Real Time PCR (*Goodwin et al., 2011*).

1.1.3.6 Otras Estrategias Y Criterios De Autenticidad

La Selección Muestral

Para hacer frente a toda la problemática que supone el estudio de muestras críticas (ver puntos 1.1.2 y 1.1.3) el primer paso a llevar a cabo es una adecuada selección muestra. Esto consiste en seleccionar piezas, preferiblemente dentales, completas, sin fisuras, roturas ni caries y con una coloración clara, lo más natural posible. Aquellas muestras que no presenten estas características, tendrán una mayor probabilidad de presentar contaminantes o inhibidores de la PCR, y por lo tanto es probable que proporcionen malos resultados o nulos.

En cualquier caso, la persona más adecuada para realizar la selección muestral es el investigador que lleva a cabo todo el proceso experimental, de este modo se minimizan las fuentes de contaminación. Sin embargo, esto no es posible en todos los casos, ya que para eso el investigador debería estar presente desde el comienzo de la excavación. Por ello, creemos esencial que exista una comunicación fluida entre el laboratorio de genética y los arqueólogos de campo; así como entre el resto de profesionales implicados en el estudio (antropólogos, paleontólogos, museólogos, etc.). De modo que cuando el genetista no pueda llevar a cabo la selección muestral, el responsable de la recogida de la muestra al menos tenga los conocimientos necesarios para hacerlo de manera correcta. Uno de los criterios de autenticidad del ADN antiguo más fundamentales es la replicación de resultados (*Pääbo et al, 2004*); para cumplirlo al menos se deben seleccionar dos muestras por cada uno de los individuos estudiados.

Para la obtención de cada una de las muestras se deben tomar, y se han tomado, las siguientes medidas:

- Utilización de guantes y mascarilla.
- Limpieza con lejía y etanol al 70% del material empleado para la obtención de la muestra, antes y

después de cada uso.

- Radiación con luz ultravioleta del material empleado para la obtención de la muestra, antes y después de cada uso.

Dentro de las limitaciones del registro arqueológico y las características particulares de cada excavación, se trató de seguir dentro de lo posible ciertos requisitos para la selección de la muestra:

Siempre que fue posible se seleccionaron dientes en lugar de huesos. Esta medida se debe a que a pesar de que el contenido celular (y por tanto genético) del hueso esponjoso es mayor que la del hueso compacto y el diente (*Currey 2002*); la estructura dental, formada en su parte superficial por el tejido más duro del organismo, el esmalte, hace que el diente actúe como una cápsula protectora excepcional del ADN que se encuentra en la pulpa (*Kurosaki et al. 1993; Oota et al. 1995*).

Se mostró preferencia por las piezas dentales completas, sin fisuras ni caries. Las muestras que presentan características como esas, son más susceptibles de haber podido ser contaminadas.

En cuanto a la coloración, preferiblemente colores claros, lo más parecidos a la coloración natural del diente en vivo. Los colores anaranjados o marrones suelen asociarse a presencia de inhibidores.

En el caso de los individuos infantiles, en los cuales encontramos gérmenes dentales que no han completado el crecimiento de sus raíces, o aquellos otros individuos en los que no se conservara dentición, se optó por la selección de fragmentos de huesos largos, tales como húmero o fémur; o fragmentos de calota craneal; por ser este tipo de piezas las que han proporcionado mejores resultados dentro de nuestro laboratorio.

Hay que subrayar, que las medidas tomadas son orientativas, ya que no es posible conocer de antemano el rendimiento de las mismas en cuanto al estado de preservación de su ADN.

Como punto final, debemos señalar que se trató de seleccionar siempre al menos dos muestras a partir de cada uno de los individuos estudiados. La finalidad de esto, es duplicar el proceso experimental; cumpliendo de este modo uno de los criterios fundamentales para el análisis de ADN antiguo (*Pääbo et al, 2004*)

Características y Funcionamiento del Laboratorio y el Material de Trabajo

A grandes rasgos, cualquier laboratorio destinado al análisis genético de muestras de origen arqueológico debe tener una estructura específica. El laboratorio debe disponer de tres regiones bien diferenciadas y físicamente separadas (*Palomo-Díez et al, 2014*). La primera de ellas es la región pre-PCR, es decir la zona donde se almacenan las muestras tras su llegada al laboratorio, donde se limpian, pulverizan y se lleva a cabo la extracción de ADN. La segunda región, será dónde se lleve a cabo la mezcla de PCR, que

posteriormente se deberá introducir en el termociclador, localizado en un laboratorio ubicado en otro espacio físico diferente. Esto es esencial, ya que tras la PCR cantidades pequeñas de ADN se multiplican, pasando de una mínima cantidad a miles de copias. Por último, la tercera región de que se debe disponer, es de un laboratorio en el cual se llevarán a cabo el resto de procesos experimentales posteriores a la amplificación (geles de agarosa, secuenciación, clonación, etc.).

Es necesario que el laboratorio completo, o al menos la primera y segunda regiones del mismo, esté destinado exclusivamente al análisis de muestras críticas y/o antiguas, no procesando jamás muestras frescas de buena calidad en esos espacios, ya que eso comprometería la fiabilidad de los resultados. Además de la separación física, el recorrido del investigador a través de las distintas regiones o salas es unidireccional desde la región 1 hacia la 3, no pudiendo invertirse nunca. Es decir, queda prohibido el acceso al laboratorio de extracción de ADN antiguo si anteriormente se ha accedido a cualquiera de las otras regiones.

El acceso a las salas de extracción y PCR debe ser restringido al mínimo número de investigadores, para minimizar las posibilidades de contaminación. Además dichos investigadores siempre deben acceder con la vestimenta adecuada (buzo, cubre-zapatos, mascarilla, gorro, gafas y guantes), que será desechable y de un único uso (*Pääbo et al, 2004; Palomo-Díez et al., 2014*).

Las salas de trabajo deben ser limpiadas por completo antes y después de cada utilización, empleando lejía y etanol al 70% y deben estar dotadas de luz ultravioleta para inhabilitar los restos de ADN que puedan quedar en el ambiente; generando de este modo un espacio estéril.

El material empleado dentro de cada sala debe ser de utilización exclusiva en dicha sala, y siempre que sea posible desechable. Del mismo modo que la sala, todo el material debe ser limpiado con lejía y etanol al 70% antes y después de cada uso, y radiado con luz UV.

Además de estas medidas generales, que afectan principalmente a la estructura del laboratorio y al material de trabajo, existen otra serie de medidas de precaución obligatorias en el análisis de ADN antiguo, y derivan fundamentalmente de la problemática de este tipo de estudios. Las medidas hasta aquí mencionadas, van destinadas fundamentalmente a evitar la contaminación de la muestra, sin embargo existen otros problemas asociados al ADN antiguo. A continuación se señalan dichos problemas y las estrategias que se emplean para sobrellevarlos.

Todas estas medidas de seguridad se recogen en los criterios de autenticidad del ADN antiguo establecidas por Pääbo y colaboradores en el año 2004 (*Pääbo et al., 2004*).

Otras Medidas Y Criterios De Autenticidad: Procesamiento de controles o blancos, replicación de resultados, clonación bacteriana y cuantificación.

Otro criterio de autenticidad que se debe cumplir en todos los laboratorios de ADN antiguo es el procesamiento de controles o blancos tanto durante la extracción de ADN como durante la amplificación por PCR (*Pääbo et al., 2004*). Consiste en la utilización de mezclas de reacción que incluyen todos los reactivos necesarios para el experimento en cuestión, y a los cuales no se añade ninguna fuente de ADN. Estos controles se analizan paralelamente a las muestras analizadas, y deben mostrar siempre resultados negativos, probando de ese modo la autenticidad de los resultados. En caso contrario sería posible detectar contaminaciones puntuales o generalizadas en una determinada extracción o amplificación.

Al igual que para detectar daño molecular, la realización de múltiples extracciones y amplificaciones también contribuye a la detección de posibles contaminaciones.

En algunas ocasiones podemos percibir presencia de varios perfiles de ADN en una misma amplificación de ADN mitocondrial. En estos casos la estrategia empleada para discernir entre distintas moléculas de ADN molde, amplificadas de forma conjunta es la clonación bacteriana (*Cooper and Poinar, 2000*). Esta técnica se basa en la inserción del ADN amplificado en un vector de clonación o plásmido, con el que se transforman células de la bacteria *E. coli*. El mecanismo de clonación permite que cada vector incorpore un único inserto y que cada célula bacteriana incorpore un único vector. Una vez que el plásmido está en la bacteria, ésta se multiplica reproduciendo el ADN incorporado como si fuera propio. De este modo, cada colonia bacteriana será descendiente de la original y contendrá copias de ADN idénticas (*Sambrook and Russell, 2001*). Si alineamos todas las secuencias obtenidas mediante clonación de distintos productos de amplificación de distintas extracciones y amplificaciones de un mismo individuo, será posible identificar cuál es la secuencia endógena de la muestra, y diferenciarla de otras moléculas contaminantes, así como de nucleótidos que hayan podido sufrir daño molecular.

Finalmente, otra medida tomada habitualmente es la cuantificación de las moléculas de ADN, que sirve como una medida de la fiabilidad de los resultados. Lo más habitual y preciso es llevar a cabo esta cuantificación mediante PCR a tiempo real (*Real time PCR o RT-PCR*).

La cuantificación por RT-PCR nos permite evaluar la calidad de nuestro extracto de ADN. Varios autores proponen que la obtención de información genética a partir de un número de copias de ADN inferior al millar no proporciona resultados fiables ni reproducibles (*Handt et al. 1994; Gilbert et al 2003b;*). Por ello, para determinar si la información recuperada de las muestras antiguas estudiadas es suficientemente fiable, se estimó el número de moléculas de ADN mitocondrial presentes en distintos extractos mediante este tipo de cuantificación absoluta por *Real Time PCR (RT-PCR),* empleando para ello una sonda TaqMan

MGB específica.

La cuantificación por RT-PCR permite monitorizar la reacción de PCR mientras que tiene lugar. En este tipo de cuantificación la detección comienza durante los primeros ciclos de amplificación, cuando la cantidad de producto amplificado sobrepasa un determinado umbral. Cuanto mayor es el número de copias presentes en el extracto de ADN, antes se sobrepasa dicho umbral y se inicia la detección.

El diseño de cuantificación empleado en este trabajo utiliza la química *TaqMan MGB*, según la cual se diseña una sonda específica complementaria a una región del producto que se desea amplificar (sonda *TaqMan MGB*) (*Alonso et al., 2004).* La sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5`o *reporter* y otro unido en el extremo 3`o *quencher*. Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher*. Si la secuencia de ADN complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde 3´ del cebador, degrada la sonda gracias a su actividad 5`nucleásica. Esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es recogido y almacenado por el secuenciador. La separación de la sonda del ADN posibilita que el proceso de extensión del primer continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR, generando un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado. Las sondas *TaqMan MGB* además presentan un segundo *quencher* no fluorescente en el extremo 3´ e incorporan además en este mismo extremo un grupo MGB (*Minor Groove Binder*), cuya función es aumentar la temperatura de fusión de la sonda, permitiendo así el empleo de sondas cortas (*Goodwin et al., 2011)*.

1.1.4 Antecedentes – El Estudio De Los Movimientos Humanos A Través Del ADN En Europa Y La Península Ibérica

Apesar de que la mayoría de los genes se localizan en el ADN nuclear, con dos copias por célula; en el ADN mitocondrial tan solo hay 37 genes, que presentan miles de copias por célula y se transmiten de manera monoparental (*Griffiths et al., 2002*).

El elevado número de copias del ADN mitocondrial, como ya se ha comentado, hace que este tipo de ADN presente mayores posibilidades de éxito a la hora de llevar a cabo un estudio genético a partir de muestras antiguas. Sin embargo, esta no es la única ventaja del ADN mitocondrial.

Además el ADN mitocondrial presenta una tasa de evolución mucho mayor que la del ADN nuclear y no presenta recombinación, de modo que la variación en este tipo de genoma se ha producido únicamente por la acumulación de nuevas mutaciones a lo largo de los linajes maternos. Es decir, si nos remontamos a tiempos pretéritos, todas las cadenas de ADN mitocondrial del presente compartirían un único origen común, al que se ha denominado de forma general *Eva Mitocondrial*. Esto permite que este marcador pueda servir para conocer no sólo la historia genealógica, sino también las migraciones femeninas, y conocer fenómenos de ramificación de ese árbol genealógico del ADN mitocondrial, pudiendo reconstruir

fenómenos de migración y dispersión humana (*Torroni et al., 2006*).

Al campo de la genética aplicada al estudio de la historia de la humanidad se la bautizó con el nombre de arqueogenética, y esta disciplina dio sus primeros pasos de la mano de *Caballi-Sforza* , quien trabajó con los marcadores clásicos de los años 70, realizando un primer esfuerzo por unir arqueología y genética en una única disciplina.

De las 16569 pares de bases del ADN mitocondrial, las regiones más estudiadas, han sido las regiones del *D-loop* mitocondrial, o región control; formadas por las Regiones Hipervariables I, II y III; de las que se han analizado fundamentalmente la primera y la segunda, por ser precisamente las más variables entre individuos y poblaciones (*Anderson et al., 1981*). Para la asignación de haplogrupos mitocondriales es muchas veces necesario ampliar el estudio a otras regiones de la secuencia del ADN mitocondrial que se encuentran en la región codificante (*Van Oven and Kayser, 2008*). Sobre la primera secuencia del ADN mitocondrial estudiada y utilizada (CRS) (*Anderson et al., 1981*), se llevó a cabo una revisión, realizando diversas modificaciones teniendo lugar la aparición de la secuencia revisada (rCRS) (*Andrews et al., 1999*). Aún hoy día se han llevado a cabo propuestas para el reemplazo de esta secuencia por una nueva (RSRS), pero por el momento la mayor parte de grupos prefieren mantener la secuencia rCRS (*Bandelt et al., 2013*).

A partir del análisis de miles de secuencias se ha reconstruido un árbol genealógico de los haplogrupos de ADN mitocondrial existentes (*Van Oven and Kayser, 2008*) (*Figura 1*). Se asume que todos los tipos de ADN mitocondrial del pool genético actual proceden de un único ancestro que vivió hace aproximadamente hace 200.000 años en África (*Behar et al 2008*).

Si buscamos el origen de este árbol, llegamos a la conocida como "*Eva Mitocondrial*", que coincide con el haplogrupo L3 (*Torroni et al, 2006, Van Oven y Kayser, 2008*). A partir de este haplogrupo, se originan el resto. Se cree que este origen tuvo lugar en el Cuerno de África, ya que hoy en día es la región del mundo con una mayor frecuencia de este haplogrupo, en contraste con otras partes del África sub-Sahariana.

A partir de L3 surgen dos ramificaciones que cubren todo el conjunto de ramas no Africanas que se expandieron por el mundo durante el *out of Africa*, las ramas de los macro-haplogrupos M y N. Del mismo modo el haplogrupo N divergió inmediatamente para originar al haplogrupo R. Todos los descendientes de Eurasia, América, Australasia y Oceanía descienden de M, N y R, salvo pequeñas excepciones. Además, cada sub-rama de cada una de estas tres, es más o menos específica de determinas áreas geográficas, observándose las mayores variaciones de los tres grupos fundadores (M, N y R) en el sur de Eurasia, y especialmente en el subcontinente Indio. Todos estos datos sugieren una rápida colonización a lo largo de la costa sur de Asia (hace 60000 años) que iría expandiéndose hacia el norte asiático y hacia Europa (45000 años) (*Torroni et al 2006; Soares et al 2010*).

Además la mayor parte de los linajes europeos parten del haplogrupo R, subdividido a su vez en tres ramas fundamentales: pre-HV, JT y U; y en menor medida de la rama N (con las subdivisiones N1, N2 y X)

(*Torroni et al 2006, Van Oven and Kayser, 2008*) (*Figura 1*). Esas tres ramas europeas principales, parece que ya estaban presentes durante el Paleolítico tardío, pero posteriormente, durante el Neolítico parecen haber aparecido nuevas ramificaciones como J1b1, J2a y T1a, y otras menos comunes, como R1, R2 y N1a.

Los estudios llevados a cabo hasta el momento parecen mostrar que las poblaciones Europeas presentan prácticamente los mismos haplogrupos que las poblaciones de Oriente Próximo, estando ausentes en Europa haplogrupos propios de poblaciones sub-Saharianas y del Este Asiático (*Torroni et al., 2006, Soares et al., 2010*). De hecho en estudios recientes se detecta una vía de comunicación de las poblaciones de Oriente Próximo y las europeas durante el Neolítico a través de las Islas Griegas y Chipre (*Fernández et al., 2014*).

El haplogrupo H, el más frecuente en la Europa actual (45% de la población), parece haber surgido en Oriente próximo hace 18000 años, y su aparición en Europa se estima en 15000 años atrás, supuestamente como una entrada tras el último máximo glaciar; y como causa de un reciente efecto fundador (*Soares et al 2010*). El desarrollo del neolítico ha sido ampliamente estudiado, especialmente en lo que se refiere a la dispersión de la agricultura y la ganadería desde Oriente próximo hacia Europa, y se han llevado a cabo numerosos estudios de ADN antiguo basados en esta transición, aportando diferentes hipótesis de dispersión, que apuntan desde caminos a través de tierra como desplazamientos marítimos desde Oriente hacia Occidente (*Fernández et al 2014*).

En cuanto a los periodos que aquí nos conciernen, es decir, desde los comienzos de la Edad de Cobre y el desarrollo de la cultura cerámica Campaniforme, hasta el final de la Edad del Bronce; en la Península Ibérica, se encuentran pocos trabajos arqueogenéticos en la bibliografía. Habiendo sido publicado el único trabajo sobre caracterización genética de las poblaciones Ibéricas de este periodo en Agosto de 2014 (*Gómez-Sánchez et al., 2014*). Concretamente se publicaron los primeros resultados genéticos sobre los restos Calcolíticos de la Cueva del Mirador, en Atapuerca *(Gómez-Sánchez et al., 2014).* Este trabajo apunta a la existencia de cierta heterogeneidad genética entre los grupos Calcolíticos, y se ha observado que la población de la Cueva del Mirador es única y diferente de lo encontrado en otras poblaciones contemporáneas del periodo campaniforme europeo *(Gómez-Sánchez et al., 2014).* Con el desarrollo de la presente tesis doctoral, será posible completar ampliamente los datos aportados por este trabajo previo.

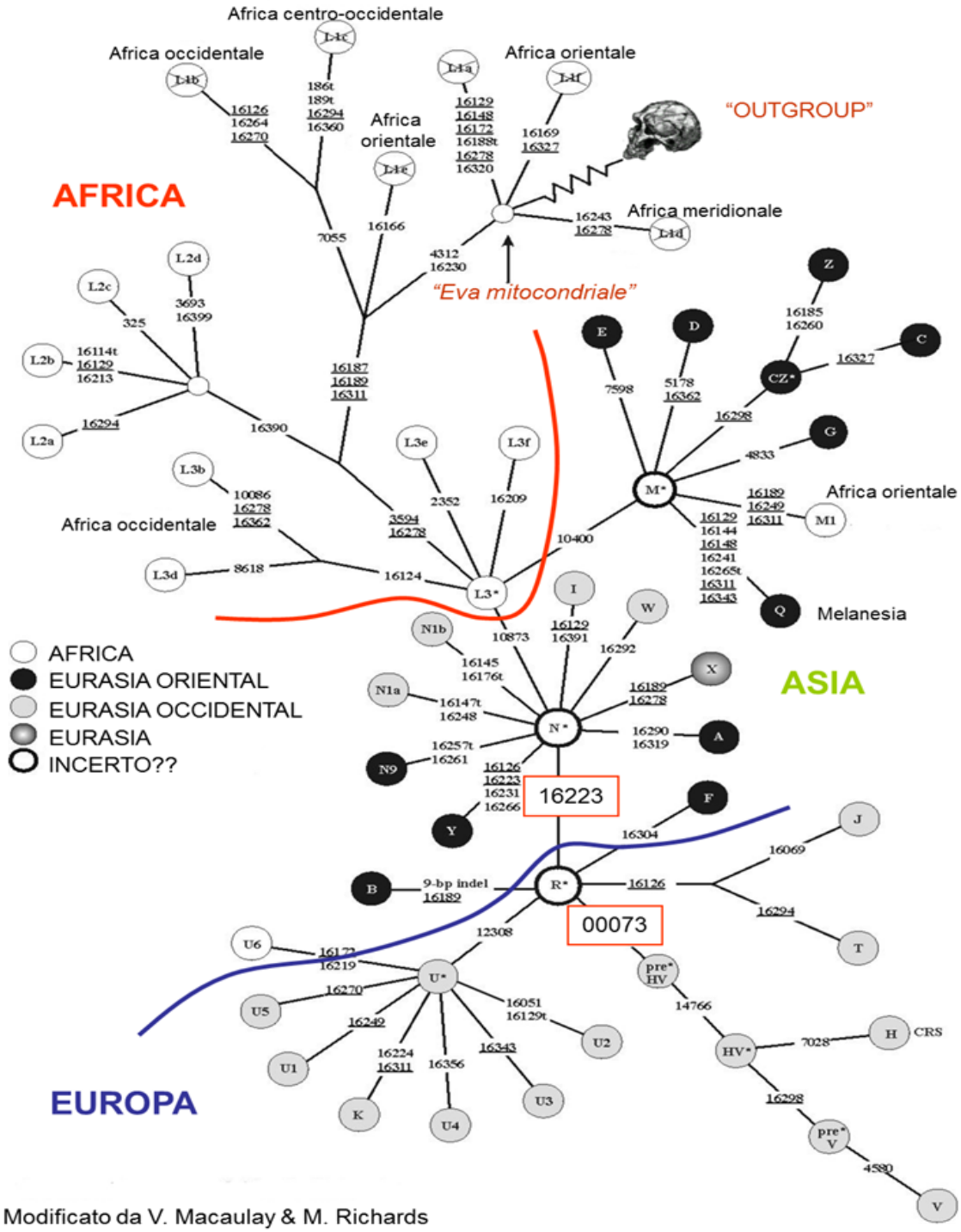


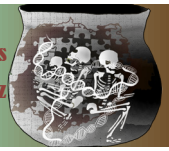
Figura 1. Árbol simplificado de los pincipales haplogrupos mitocondriales correspondientes a cada continente

Contexto histórico y bases arqueológicas

La diferencia entre el pasado, el presente y el futuro es sólo una ilusión persistente.

Albert Einstein

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional



2 CONTEXTO HISTÓRICO Y BASES ARQUEOLÓGICAS

2.1 EL MARCO CULTURAL Y CRONOLÓGICO: LAS EDADES DEL COBRE Y DEL BRONCE DE LA SUBMESETA NORTE

La presente tesis doctoral se centra en las poblaciones humanas que vivieron durante los milenios III y II antes de Cristo en la Cuenca del Duero, especialmente en las zonas más centrales de la misma, donde ha podido reunirse un cierto número de individuos suficientemente bien conservados, caracterizados desde el punto de vista cultural y datados por radiocarbono, como para formar el corpus de una investigación paleogenética.

El marco cronológico de la tesis lo constituyen las denominadas Edades del Cobre y del Bronce, de acuerdo con la terminología tradicional todavía vigente. La primera de estas subdivisiones de la Prehistoria, también conocida como periodo Calcolítico, supone la incorporación del cobre a la cultura material. En la Península Ibérica, la fundición de metal debió de comenzar hacia el 6000 BP., a juzgar por lo observado en el yacimiento almeriense de Cerro Virtud (*Montero-Ruiz y Ruiz-Taboada, 1996*), pero se generalizará en torno al III milenio a.C., cuando ya se documentan varias áreas culturales con numerosos testimonios de metalurgia del cobre. Así, las de los Millares en el Sudeste, la de Vila Nova de Sao Pedro en la Estremadura portuguesa, e incluso en la zona duriense.

El periodo denominado Calcolítico es muy amplio, ya que se desarrolla a lo largo de más de 1000 años, y las formas de enterramiento que ocurren durante este tiempo son muy diversas, debido probablemente a distintas causas (*Aliaga, 2008*). Si nos limitamos al ámbito geográfico de la tesis, el Calcolítico regional va siendo progresivamente conocido y hoy se acepta, no sin matices y problemas, una subdivisión en Calcolítico Inicial o preCampanifome y Calcolítico Campaniforme, distinción que viene marcada en primera instancia por la ausencia/presencia de un tipo particular de cerámica que, como luego se verá, es el signo más visible de un profundo cambio cultural (*Delibes de Castro, 1977b*). El Calcolítico Campaniforme (finales del III milenio a. C. y principios del II) estaría caracterizado por la presencia de la cerámica epónima y por el auge de la metalurgia, si bien, en otras cuestiones no parece representar grandes cambios con respecto a la fase anterior (*Muñoz et al., 1995: 38*).

2.1.1 Calcolítico Inicial – Precampaniforme

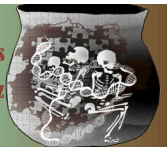
El Calcolítico Inicial o Pre-Campaniforme, que cubre cronológicamente casi todo el Tercer Milenio, presenta algunas diferencias entre unas y otras zonas de la región. Por ejemplo, las comarcas más occidentales de las actuales provincias de Salamanca y Zamora parecen estar culturalmente integradas

con sus vecinas de la actual región portuguesa de Tras-os-Montes. Pero la amplia zona central del valle del Duero, en la que se ha obtenido la mayoría de los restos humanos estudiados en esta tesis, presenta unos rasgos muy homogéneos, seguramente en relación con las características del medio natural. En las llanuras de campiñas y páramos formados sobre terrenos terciarios y cuaternarios, aparecen numerosos yacimientos de tipo aldea, sin fortificar (aunque se han descubierto algunos rodeados por fosos concéntricos), de los cuales apenas se han conservados someros restos de algunas cabañas circulares y sobre todo numerosísimas estructuras subterráneas, parte de las cuales debieron de servir como graneros, y otros para otras funciones de secado, carnicería, etc. , y que terminaron rellenándose con los restos de la propia ocupación de esas aldeas. Tales yacimientos son denominados por ello “campos de hoyos”, conjuntos de silos agotados, de estructuras rellenas de los que a primera vista parece basura doméstica. En tales poblados hay objetos de cobre (hachas planas y sencillos punzones, así como los primeros puñales) y también crisoles y escorias que testimonian que tales artefactos metálicos no eran importados desde otras zonas peninsulares, sino fabricados aquí, con minerales procedentes, eso sí, de las comarcas de los rebordes montañosos. Se sabe también de otros aprovechamientos minerales, como los del sílex y la variscita, pero sobre todo se conoce bien la actividad alfarera, con variadas formas de cerámicas, lisas y también decoradas, con triángulos rellenos de puntos impresos o con “soles” incisos.

De las propias gentes que dejaron esos vestigios y otros de sus actividades agropecuarias -agricultura cerealista, ganadería de vacuno, ovicápridos y suidos, así como una caza complementaria- hay también evidencia, ya que algunos de los hoyos mencionados anteriormente sirvieron como sepulturas de inhumación individual (alguna vez doble), con el individuo colocado en posición replegada y acompañados por una ajuar consistente en cerámica, y a veces algún adorno de piedra o hueso e incluso por algún objeto metálico (*Delibes de Castro, 1987; Garrido Pena, 1999*).

Aunque no bruscamente, ya que los viejos dólmenes y sepulcros de corredor surgidos en el Neolítico continuaron en uso durante el Calcolítico en las zonas de Salamanca o Burgos, en la gran zona central de la Cuenca del Duero se produce con fuerza la aparición de esas tumbas de inhumación individual en fosa, aunque alguna vez, como en Aldeagordillo (Ávila), haya fosas todavía con inhumación colectiva. Este cambio en el rito funerario seguramente está en relación con un cambio en las formas de organización social, habiéndose apuntado que tras las sociedades segmentarias del Neolítico , el Calcolítico Inicial no fue solo la época en la que surgió la novedosa metalurgia del cobre, sino sobre todo el momento en el que empiezan a producirse diferencias sociales, patentes en algunas tumbas en las que se entierra, como ajuar funerario excepcional, algún instrumento metálico (*Delibes de Castro, 1987; Garrido Pena, 1999*).

El progresivo desarrollo de producción a lo largo del Neolítico probablemente alimentó el crecimiento de diferencias sociales. Inicialmente dichas diferencias habían empezado a manifestarse en los distintos rituales colectivos megalíticos. Pero acabarían desembocando en la aparición de líderes durante el Calcolítico, que perseguirían legitimar su posición con la reutilización de los monumentos anteriores.



Además de los enterramientos, otros vestigios atestiguan la importancia de las actividades rituales, como sucede con los depósitos de restos de animales sacrificados, e incluso un caso singular de sacrificios humanos como es el de Los Cercados (Mucientes Valladolid) (*García Barrios, 2007*). Pues bien, algunos de los individuos enterrados en fosas, o las mujeres objetos de aquellas prácticas de violencia (*García Barrios, 2007*), son el objeto de nuestra investigación paleogenética, encaminada a completar la investigación arqueológica con otro tipo de registro que puede arrojar luz en aspectos sobre los que hasta se ha avanzado poco, como son los de la composición social de las comunidades, o la caracterización genética de las poblaciones de la región.

El ritual funerario no es más que la expresión material de un discurso ideológico activo, que interviene en las relaciones sociales y económicas. La clave es averiguar los motivos que impulsaban a aquellos grupos prehistóricos a reunir sus muertos en sepulcros comunes donde sus restos acabarían mezclándose. Por otro lado, una sepultura individual segrega al fallecido del resto del grupo, lo destaca, lo singulariza, frente a los rituales colectivos que tienden a borrar la individualidad del fallecido, a diluirla en el grupo. Otro punto intermedio estaría constituido por los panteones donde hay diversas tumbas individualizadas. En torno a esta cuestión, el estudio paleogenético puede arrojar luz sobre el conocimiento de las interrelaciones entre esos individuos, conociendo la existencia o ausencia de posibles lazos de parentesco cercano, así como su vinculación a través del linaje materno (mediante el estudio del ADN mitocondrial) o paterno (mediante el estudio de marcadores del cromosoma Y).

Dentro de nuestro muestreo vamos a encontrar dos subconjuntos pertenecientes al Calcolítico; individuos pertenecientes aún al periodo previo al a llegada de la cultura Campaniforme, periodo preCampaniforme; y a la cultura Campaniforme como tal. A continuación se desglosan los yacimientos estudiados en la presente tesis organizados en función de los diferentes periodos crono-culturales a los que pertenecen.

2.1.1.1 Yacimientos Seleccionados Del Calcolítico Precampaniforme

De la voluminosa masa de yacimientos arqueológicos del Calcolítico inventariados en la Submeseta Norte, se ha seleccionado un conjunto mucho más reducido. En primer lugar, porque son muy pocos los yacimientos de carácter funerario que han sido objeto de excavación; y en segundo lugar, porque de los excavados solamente algunos han proporcionado restos humanos suficientemente bien conservados y datados como para proceder a su análisis genético. Además, las muestras analizadas, no siempre han proporcionado resultados válidos, por lo que el conjunto muestral de la tesis puede resultar relativamente pequeño en comparación con la población real. Sin embargo, la importancia de este estudio reside en que, además de ser la primera vez que se afrontan objetivos paleogéneticos, se ha podido trabajar con una muestra que cubre los distintos periodos cronológicos y también diversos ámbitos geográficos y tipos de yacimientos.

De acuerdo con lo dicho, los yacimientos seleccionados para su análisis paleogenético en la presente tesis perteneciente al periodo Calcolítico preCampaniforme son los siguientes:

El Tomillar (Bercial De Zapardiel, Ávila)

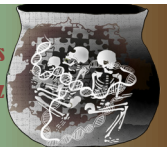
Se trata de un yacimiento de finales del Calcolítico y comienzos de la Edad del Bronce, datado en el 2.000 a.C. En este yacimiento arqueológico, situado en Bercial de Zapardiel (Ávila) y motivo de intervención arqueológica en el año 1999, dirigida por Francisco Fabián, arqueólogo territorial de Ávila, realizamos un muestreo sobre restos osteológicos humanos localizados en dos fosas, la fosa número 13 y la fosa número 1.

En la Fosa número 13 se encontraron restos óseos correspondientes a ocho individuos distintos, tres adultos y cinco infantiles. El análisis antropológico de estos restos, fue llevado a cabo hacia el año 2000 por Beatriz Robledo y Gonzálo J. Trancho (*Robledo y Trancho, 2001*). Las características de cada uno de los individuos, así como de las muestras seleccionadas para el estudio paleogenético, se detallan en el apartado 4.1.1.1.1.1 de Material y Métodos

La Fosa 13 tiene una gran importancia, precisamente por la elevada prevalencia de individuos infantiles. Muchas veces se sugiere la existencia de una elevada mortalidad infantil en las poblaciones antiguas, sin embargo pocas veces se detectan tumbas con restos de niños que corroboren este tipo de hipótesis. Se asume que esta ausencia de restos se puede deber a la mayor fragilidad de las estructuras esqueléticas infantiles, o bien a prácticas funerarias por las que el lugar de enterramiento seleccionado para los individuos infantiles fuera diferente al de los adultos (*González-Martín, 2008*); sin embargo en este caso observamos un claro ejemplo en el que se utiliza el mismo espacio funerario para los niños y los adultos.

La interpretación dada a este enterramiento es de un enterramiento colectivo, realizado mediante rito de inhumación. Existen varias hipótesis en torno a la presencia de 5 niños en la fosa. La primera es que sean fruto de diferentes partos independientes de distintas mujeres del poblado y que hayan sido enterrados en la misma tumba según iba produciéndose su muerte, aunque deberían haber muerto a un mismo tiempo o en un breve periodo de tiempo, ya que la tumba parece simultánea. Alguno de los niños, podría ser hijo de alguna de las mujeres inhumadas de forma conjunta, pero no tendría por qué ser de ese modo en todos los casos, simplemente formarían parte de la misma tumba por haber muerto en un mismo intervalo temporal, no por ningún tipo de vínculo familiar. Otras hipótesis apuntan a que se trate de hijos de alguna de las mujeres inhumadas, pudiendo incluso tratarse de algún parto doble o incluso múltiple (*Robledo y Trancho, 2001; Fabián-García, 2001*). La genética en este caso, puede jugar un importante papel clarificando si existen relaciones de parentesco entre los individuos infantiles y los adultos, arrojando luz sobre esta cuestión. La fosa 13 se ha datado en torno al 3.960±40 BP.

La segunda fosa que hemos analizado del yacimiento de El Tomillar, es la Fosa 1. Las características de



la Fosa 1 son bastante diferentes de la 13. En este caso, a diferencia del anterior, no parece tratarse de un enterramiento simultáneo, en el cual todos los individuos hayan sido inhumados a un tiempo más o menos corto, manteniendo su estructura y la conexión anatómica original, como sucedía en el caso anterior. En el reducido espacio de esta fosa, de 150 cm de diámetro, se depositaron un mínimo de once individuos conforme se produjeron los fallecimientos en diferentes fechas. De este modo serían inhumados los cuerpos ocasionando cierta dispersión de los restos cadavéricos, o en su caso, de los restos esqueléticos, una vez finalizado el proceso de putrefacción. Por esta razón no se han conservado algunos huesos, probablemente por la manipulación post mortem y en la fase esquelética, para poder habilitar espacio para las nuevas inhumaciones; aunque tampoco se puede descartar que las dispersiones y ausencias se deban al efecto de animales, debido a la escasa protección o cubierta que debió de poseer la fosa (*Etxeberría-Gabilondo, 2001, Fabián-García, 2001*).

La fosa 1 de este yacimiento es ligeramente más moderna que la fosa número 13, se ha datado radiocarbónicamente, teniendo una antigüedad de aproximadamente entre 3.780±100 y 3.830 ± 95 BP.

Los Areneros (La Lastrilla, Segovia)

A este yacimiento se le atribuye el nombre completo de "Los Areneros de las Zumaqueras" y se sitúa dentro del término municipal de La Lastrilla (Segovia). Fue un vecino de la región quien informó sobre la existencia de restos esqueléticos humanos en la zona, y como consecuencia se desarrolló una excavación de urgencia, dada la precaria posición de los restos arqueológicos, así como por el interés suscitado por los mismos derivado de la probabilidad de hallarnos ante un depósito funerario colectivo de la Edad del Bronce. Por esta razón dicha actuación fue considerada en el marco el Proyecto del plan Nacional de Investigación (HUM2005/00139) dedicado al estudio del fenómeno funerario Cogotas I en la Submeseta Norte (*Delibes de Castro y Esparza Arroyo, 2007b*).

Tal como se anota en el párrafo anterior, en un principio este yacimiento fue ubicado como perteneciente a la edad del Bronce, los datos que condujeron a esta deducción fueron su ubicación, que lo hacía presumiblemente vinculable con el yacimiento de El Mirador, muy próximo a él y datado en la Edad del Bronce. Además, en el nivel superior a la fosa funeraria se encontraron materiales propios de la cultura Cogotas. Sin embargo, a pesar de estas dos condiciones, se ha demostrado que las características de la fosa funeraria como tal, así como las características de su ajuar, sitúan a este enterramiento en el periodo Calcolítico (*Delibes de Castro y Esparza Arroyo, 2007b*).

La Fosa Funeraria, consiste en un depósito secundario complejo, que a juzgar por la información disponible, se debió producir en un único momento tras el cual se selló la fosa. Es decir, debió haber una fase previa de esqueletización (activa o pasiva), desarrollada en otro lugar diferente. Las evidencias que conducen a interpretar el enterramiento como secundario, son la ausencia generalizada de conexiones o relaciones anatómicas, y además la mayor presencia de huesos largos y cráneos en contraposición de un detrimento

en la cantidad de huesos más pequeños como carpos y tarsos, así como vértebras y costillas (*Delibes de Castro y Esparza Arroyo, 2007b*).

En un principio se estimó un número mínimo de 8 individuos, 7 de los cuales eran adultos y un joven de entre 9 y 11 años. Los individuos eran tanto hombres como mujeres, y no se encontró ningún perinatal ni infantil (*Delibes de Castro y Esparza Arroyo, 2007b*).

El conjunto de restos óseos exhumados en este yacimiento se ha datado entre el 4.240±35 BP y el 4.125±25 BP.

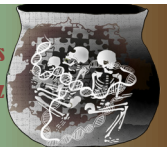
Los Cercados (Mucientes, Valladolid)

El yacimiento de Los Cercados fue excavado a mediados de la década de los 80 por J.I. Herrán, siendo por ello una de las estaciones preCampaniformes más conocidas del centro de la Meseta (*García-Barrios, 2007*).

En este yacimiento se excavaron tres hoyos, de los cuales centra nuestro interés el denominado A2/AS, que constituye un singular ejemplo de fosa ritual calcolítica. Se trata de una hoya de perfil de cubeta, boca circular y unas dimensiones de 85 cm de diámetro por 80 cm de profundidad, subdividida hasta en 11 niveles diferentes. Fue en los niveles más profundos en los que se conservó inalterada la deposición calcolítica objeto de interés para esta tesis doctoral. Este conjunto calcolítico está marcado por una serie de elementos con gran carácter simbólico: dos recipientes cerámicos casi completos con decoración incisa representando sendos rostros; un vaso caliciforme; un pequeño objeto de aspecto zoomorfo elaborado con arcilla cocida; el cráneo de un cánido; un pico de asta de cérvido con punta biselada y una pequeña cornamenta de la misma especie; 4 cráneos de suído, etc. Además de una gran cantidad de fauna, industria lítica y hasta 8.096 fragmentos cerámicos. Pero lo más importante del hallazgo son sin duda tres cráneos y un maxilar superior humanos (*García-Barrios, 2007*).

Los tres cráneos y la maxila fueron enviados al laboratorio de Genética del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Universidad Complutense de Madrid, dónde se llevó a cabo la selección y extracción de las muestras.

El aspecto más llamativo que puede señalarse respecto a estos restos es la existencia de claros traumatismos por impacto localizados siempre en la parte posterior del cráneo. El patrón de los traumas parece apuntar a que los individuos recibieron un golpe por la espalda y cada uno con una posición distinta respecto del agresor. De la morfología de las heridas se deduce que el instrumento empleado para agredir fue también diferente en cada caso. Parece que en unos casos se emplearon objetos punzantes diferentes y en otros por el contrario se observa un hundimiento doble en el cráneo, pero sin atravesar la pared ósea, lo que apunta a una golpe con un objeto grueso, sin filos ni punta (*García-Barrios, 2007*) (Ver *Figura 5* del



apartado 4.1.1.1.1.1 de Material y métodos)

Pese al reducido tamaño de las heridas, desde un punto de vista médico éstas podrían ser perfectamente letales. Quizá no de manera inmediata, pero si generarían una escasa supervivencia del individuo tras el trauma, más aún en aquella época. También cabe plantearse si en alguno de los casos esos golpes fueron infringidos en vida, siendo entonces causa directa de la muerte, o bien fueron efectuados "post mortem". Desafortunadamente no se dispone de datos concluyentes al respecto. En uno de los individuos sí parece que el golpe fue efectuado en vida, ya que se observa cierto crecimiento óseo en la región del trauma. (*García-Barrios, 2007*).

No se puede asegurar que los cráneos fueran depositados en la fosa A2/AS de Los Cercados en el momento de la muerte, ya que no se han observado huellas de decapitación, o si el fallecimiento tuvo lugar en un momento anterior a la deposición en este lugar.

La bibliografía hace escasas referencias al maxilar superior encontrado, dando mayor peso a los tres cráneos. Los antropólogos implicados en el análisis de las muestras no vieron suficientemente clara la estructura mandibular y craneal de los restos como para poder asignar la maxila a alguno de los tres cráneos. En este caso el análisis de ADN a partir de los restos esqueléticos exhumados, no solamente permite contribuir a la composición genética de la población y al establecimiento o descarte de relaciones familiares, sino que además nos permitirá conocer si la maxila se corresponde con alguno de los cráneos, y por lo tanto podremos determinar el número real de individuos de la fosa.

No se han obtenido dataciones radiocarbónicas directamente sobre los restos esqueléticos exhumados, pero el yacimiento se ha datado en torno al 3.970±60 BP.

Camino De Trascabañas (Simancas Y Ciguñuela, Valladolid)

Este yacimiento del camino de Trascabañas se sitúa entre las localidades de Simancas y Ciguñuela (Valladolid). Aquí se halló un hoyo de paredes en cuyo fondo había un hogar de barro, cubierto por un sedimento muy oscuro, ceniciento, que envolvía el enterramiento de una mujer de unos 35-45 años, acompañada por un modesto ajuar (fragmentos de cerámica, una lasca y un objeto de hueso); por encima, una potente capa de bloques calizos y una capa superior de greda que contenía algunos fragmentos cerámicos del calcolítico preCampaniforme (*Delibes de Castro, 1987*). El esqueleto ha sido datado en 4180 ± 35 BP.

2.1.2 Calcolítico – Campaniforme

La denominada cultura Campaniforme, viene definida por la cerámica que porta su mismo nombre, pero al mismo tiempo también va acompañada de un cambio en el ritual funerario. Es un periodo

cronológico restringido aproximadamente entre el 2700/2600 y el 2000 AC (*Aliaga, 2008; Garrido-Pena, 2005*). A esta cultura a la cual se daba una interpretación étnica (*The Beaker Folk*), desde finales del pasado siglo parece claro que se trata de un fenómeno cultural complejo y de enorme alcance geográfico, que desborda completamente las áreas culturales tradicionales. Se trataría esencialmente de un conjunto de manifestaciones culturales de gran contenido simbólico que adoptaron las élites emergentes en zonas de Europa que van desde la península Ibérica a los Países Bajos, desde las Islas Británicas o las del Mediterráneo Occidental hasta Centroeuropa.

En tan amplio espacio se asiste durante la segunda mitad del Tercer Milenio a.C. al despliegue de una serie de elementos materiales: en primer lugar, la cerámica decorada, con el Vaso Campaniforme cuya presencia indica rápidamente el alcance de este fenómeno; ciertos objetos de cobre -puñales y puntas de jabalina-, algunas joyas de oro (diademas, cintas y pendientes), puntas de flecha de sílex minuciosamente retocadas, y los denominados brazales de arquero, todos los cuales aparecen sistemáticamente en tumbas de inhumación individual (*Delibes de Castro, 1977a; Garrido Pena, 1999*).

Parece haber así una gran homogeneidad sociocultural que se manifiesta en la exaltación del varón armado, correspondiendo a la cúspide de unas comunidades donde emerge la desigualdad social, y en la realización por tales comunidades de unas ceremonias que incluían la utilización de cerveza contenida en los vasos campaniformes (*Vázquez Cuesta, 2009*). En efecto, las técnicas analíticas recientes han permitido descubrir que era esa bebida, obtenida por fermentación de cebada u otros cereales, también sidra de pera y otras bebidas fermentadas, lo que contenían los vasos campaniformes, tanto en las ceremonias funerarias como en otras, probablemente banquetes o festines en los que se congregaban comunidades cercanas, o se celebraban alianzas, enlaces matrimoniales, etc. (*Vázquez Cuesta, 2009; Rojo-Guerra, et al; 2008)*).

La cerámica campaniforme (al principio, del estilo Marítimo o Puntillado Internacional, y después, del estilo Ciempozuelos) y los citados objetos de acompañamiento han aparecido en numerosos yacimientos de la Cuenca del Duero, unas veces en sitios funerarios (fosas de inhumación individual o también reutilizando los viejos sepulcros megalíticos) y otras en lo que debieron de ser los poblados de este periodo, mal conocidos por falta de excavaciones amplias y también por coincidir con los propios sitios del Calcolítico preCampaniforme, habiendo así una marcada continuidad entre ambas fases (*Delibes de Castro, 1977a; Delibes de Castro, 1987*).

Desde luego, las bases económicas, el tipo de poblamiento, las cabañas, etc. muestran esa continuidad, destacándose como diferencia la mayor disponibilidad de cobre, que se trabaja con una tecnología más avanzada, y de otros productos como oro, ámbar o marfil, que indicarían la existencia de unas redes de intercambio de gran alcance, y, a juzgar por el destino final de esos productos en ciertas tumbas, una desigualdad social creciente y una probable individualización del poder (*Garrido Pena, 1999*).

Además se consolida el paso de un ritual colectivo en época dolménica, a un ritual individual. El ajuar

característico es la llamada cerámica campaniforme (cuenco, vaso y cazuela), junto con algunas armas (puñal de lengüeta, puntas de jabalina, arco y flechas, y brazaletes de arquero) (*Rojo-Guerra et al, 2006*). En el caso de la Península Ibérica, concretamente la Meseta, las evidencias proporcionadas por el registro arqueológico parecen confirmar la hipótesis de la casi completa generalización de los enterramientos primarios individuales relacionada con la difusión del Campaniforme, y la consiguiente desaparición de los rituales colectivos o integradores. Teniendo lugar la implantación progresiva de estructuras funerarias propias, como con la reutilización de los sepulcros colectivos anteriores, especialmente los megalíticos (*Rojo-Guerra et al, 2006*). En un principio esta ocupación de las culturas Campaniformes en los megalitos, se asumieron como un testimonio de la llegada de un nuevo pueblo que implanta sus fórmulas funerarias y profana las tumbas de los grupos locales. Pero desde hace algunos años, la progresiva multiplicación de hallazgos campaniformes ha modificado esta visión, ya que se demuestra que la reutilización de los megalitos no fue algo ocasional, sino importante e incluso la fórmula funeraria preferida. Pero es importante tener presente, que en la época campaniforme ya no se construían megalitos, sino que únicamente se reutilizaban. Por lo que según los datos arqueológicos, la desaparición de estas grandes empresas colectivas, cabría deducir también la desaparición del orden social que las daba sentido (*Rojo-Guerra et al, 2006*). Ahora bien, ese cambio de orden social es simplemente cultural, ¿O se trataba de poblaciones diferentes provenientes de otras regiones?

En diversos momentos de la historia de la investigación se ha planteado la posibilidad de que los individuos enterrados con los lujosos ajuares campaniformes fuesen una población alóctona, unos braquicéfalos ultrapirenaicos en contraste con la población local, dolicocéfala I (*Delibes de Castro, 1977a*). Así se justificaron inicialmente las similitudes entre decoraciones cerámicas de la Meseta peninsular y de Centroeuropa, pero esta interpretación, basada en consideraciones de una antropología física todavía poco desarrollada, ha caído en el olvido, aceptándose en cambio la mencionada idea de una homogeneización cultural de las élites por encima de las diferencias entre comunidades pertenecientes a poblaciones distintas y alejadas. Sin embargo no puede descartarse, al menos como hipótesis de trabajo, que al menos algunos individuos, especialmente esos personajes emergentes, fuesen de origen alóctono. Recientemente, los análisis de isótopos estables han detectado que algunos de los enterrados en sepulturas campaniformes, por ejemplo el célebre "Arquero de Amesbury" (*Harding and Fokkens, 2013*), hallado en esa localidad de Inglaterra, pudieran haber venido desde tierras lejanas del Continente.

A comienzos del siglo XX varios autores como Montelius (1900), Petrie (1901) o Déchelette (1908) defendieron que las cerámicas campaniformes procedían de Egipto y Asia Menor, con una doble vía de penetración en Europa: insular, a través de Italia y Hungría, y costera, recorriendo el Mediterráneo hasta comunicar con el litoral Atlántico. Pero esta línea de investigación apenas rebasó los primeros años del siglo y pronto sería sustituida por la abrumadora mayoría de autores que defienden un origen local en Occidente (vid. *Garrido-Pena, 1999; vid. Garrido-Pena y Muñoz López-Astilleros, 2000*).

Aunque estas son las dos hipótesis principales, existen otras minoritarias que proponen otras regiones como cuna. Poco después surgirá una nueva tesis que triunfa, y es la que propone a la Península Ibérica

como hogar primigenio del campaniforme. Otras teorías, como la apuntada por la célebre frase de Clarke (1976) (congreso de Oberried): "…yo sólo veo pueblos con Campaniforme, no Pueblos Campaniformes", apuntando a que era la cultura lo que se transmitía entre pueblos de distintas regiones, pero no había una migración de esas poblaciones como tal; o al menos puede caber la duda.

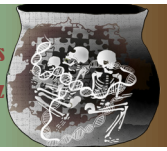
Una de las teorías más aceptadas en los últimos tiempos indica que el Campaniforme nació en la zona del Rin, a partir de tipos cordados locales. Tratándose de cerámicas de uso doméstico fabricadas en el seno familiar humilde. Su extensión se explicaría por la movilidad de los grupos en sus actividades económicas habituales, etc. Sin embargo, algunos años más tarde ha vuelto a surgir la hipótesis de un origen ibérico, situado en la cuenca del Guadalquivir (*Garrido-Pena, 1999*).

Por todo lo expuesto hasta el momento, la investigación arqueogenética adquiere especial relevancia, para valorar una posible homogeneidad de las poblaciones de toda la Edad del Cobre o bien para detectar esos posibles individuos (o grupos) migrantes.

En cualquier caso, aún hoy el origen de esta cultura sigue siendo un enigma, con más preguntas que respuestas (*Garrido-Pena, 2005*). Y aún hoy no se descarta la posibilidad de que se tratara de un pueblo concreto, grupos nómadas de mercaderes y metalúrgicos.

Un dato importante es el aportado por Garrido-Pena en su tesis doctoral (*Garrido-Pena, 1999),* en la cual analiza los diferentes patrones dibujados en la cerámica campaniforme, realizando un análisis estadístico sobre una amplia muestra de ejemplares del interior peninsular. Gracias a este estudio, demostró que tan sólo existen 21 diseños diferentes, que se combinan de acuerdo con esquemas de ordenación regulares; y que además se encuentran en regiones alejadas entre sí por centenares de kilómetros. Es decir, se trata de un corpus de diseños y esquemas estructurales estandarizados que decoran formas cerámicas igualmente estandarizadas, que son compartidas por poblaciones muy distantes geográficamente (*Garrido-Pena, 1999*). Por lo que resulta poco probable que esas estructuras complejas fueran elaboradas por cualquiera; y exigen la existencia de intensos contactos sociales entre esos grupos tan distanciados en el espacio.

Entonces, ¿viajaron las cerámicas o las personas? No se trata de ensalzar teorías migratorias o invasoras, pero no se pueden descartar movimientos de algunos individuos o pequeños grupos entre distintas redes sociales (por ejemplo por intercambios matrimoniales) (*Garrido-Pena, 2005*). Según algunos investigadores, esta difusión de ciertos diseños en las decoraciones cerámicas, se relacionan con las mujeres, que suelen ser además las alfareras en las sociedades preindustriales, que pasarían estos diseños de madres a hijas, de tal forma que cuando son dadas en matrimonio a varones de otras zonas, llevas consigo estos esquemas (*Whallon 1968; Garrido-Pena, 1999*). Este dato es de vital importancia si tenemos en cuenta que el ADN mitocondrial se hereda de manera matrilineal, por lo que sería un marcador idóneo para conocer si esa transmisión de la cultura cerámica está o no ligada a los movimientos poblacionales femeninos.



2.1.2.1 Yacimientos Seleccionados Del Calcolítico Campaniforme

Del conjunto de yacimientos Campaniformes disponibles, fue posible obtener muestras osteológicas óptimas para el desarrollo del análisis genético, a partir de seis yacimientos, que se describen a continuación:

Aldeagordillo (Ávila)

Está situado en el extremo oriental del Valle de Amblés, a escasos 2km de la capital abulense y a unos 1.200 metros sobre el nivel del mar. En el paraje de Aldeagordillo habría un conjunto de once túmulos y dos más posibles, destruidos por acciones furtivas. Nuestro análisis se ha centrado en el Túmulo 1 de Aldeagordillo, que se encuentra situado sobre una pequeña meseta que domina ampliamente toda la zona oriental del valle; queda respaldado en parte por un fuerte afloramiento de aplitas, destruido en parte hace algunas décadas por ser aprovechado como cantera (*Fabián-García, 1973).*

Este yacimiento parece haberse utilizado tanto como lugar de habitación como recinto funerario. Se piensa que la utilidad funeraria tendría lugar después de abandonarlo, ya que en casi medio centenar de yacimientos similares conocidos en el Valle de Amblés no han aparecido rastros de túmulos dentro del poblado, lo que probablemente quiera indicar que no era costumbre mezclar ambas situaciones en un mismo espacio.

Los restos humanos inhumados en el Túmulo I de Aldeagordillo corresponden a cuatro sujetos, tres de ellos infantiles y un adulto. La datación de uno de ellos (el individuo 3ALG) realizada con Carbono 14 sitúa el enterramiento en el 3.690±50 BP (*Fabián-García, 2006: 323).*

El Mirador (La Lastrilla, Segovia)

El Mirador es la plataforma superior del cerro en cuyo borde oriental se ubica el enterramiento de Los Areneros de Las Zumaqueras, en la Lastrilla (Segovia) (ver apartado 2.1.1.1). En esta zona se desarrolló un poblado de larga ocupación, y en una fosa se halló una inhumación individual asignable a la cultura del vaso Campaniforme, que ha sido datada en torno al 3.650 ± 35 BP. (*com. pers. A. Esparza*).

Perro Alto (Fuente Olmedo, Valladolid)

Se trata de un yacimiento arqueológico situado a un kilómetro al sureste de Fuente Olmedo (Valladolid).

Consiste en una tumba en fosa, con estructura tumular a base de cantos rodados de cuarcita que cubría una fosa oval simple de 70 cm de profundidad. Dicho enterramiento fue encontrado de forma casual por un agricultor, en lo alto de una suave loma arenosa.

El cadáver se hallaba tumbado sobre su costado derecho y con las piernas replegadas sobre el abdomen, ocupando el centro de la fosa, que se rellenó con arena y cantos rodados. Además el individuo estaba acompañado de un vaso campaniforme en el borde más septentrional de la fosa, además de un puñal y puntas Palmela en el borde oriental y una diadema de oro en el occidental, ligeramente hacia el centro-sur (*Delibes de Castro, 1977: 67-78*).

La datación radiocarbónica de los restos exhumados en este yacimiento lo sitúa en torno al 3.730±65 BP.

Santa Cruz De Cabezón II (Cabezón De Pisuerga, Valladolid)

A casi tres kilómetros de la estación de ferrocarril de Cabezón de Pisuerga (Valladolid), y próximo al Caserío de Santa Cruz, se encuentra este yacimiento arqueológico. Los materiales allí encontrados podrían relacionarse con los del yacimiento vecino de Santa Cruz (de ahí que a este se le dé el nombre de Santa Cruz II), ubicado a unos 400 metros al sureste. Sin embargo no se han registrado indicios que hagan sospechar sobre la conexión entre ambos enclaves, por lo que los vestigios de Santa Cruz II de Cabezón, analizados en la presente Tesis, se han descrito como un nuevo yacimiento independiente del otro.

Se encontraron una serie de fragmentos cerámicos elaborados a mano, formados por pastas que presentan desgastes calizos, cuarcíticos y micáceos de porte medio y que han sido cocidas en ambientes reductores o mixtos (reductores – oxidantes).

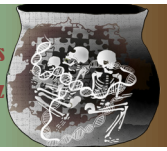
El enclave fue documentado durante la ejecución de los “Trabajos de prospección arqueológica del proyecto de construcción de la Ronda Exterior Este de Valladolid”, cuyo correspondiente informe técnico se encuentra depositado en el Servicio Territorial de Cultura de Valladolid.

Hasta el momento no se dispone de dataciones radiocarbónicas para este yacimiento.

Pago De Valhondo (Pajares De Adaja, Ávila)

Este yacimiento se localiza a un kilómetro al oeste del término municipal de Pajares de Adaja.

Consiste en una necrópolis de tumbas en fosa, en la que se detectaron dos enterramientos relevantes. El primer enterramiento se halló por casualidad durante la realización de trabajos agrícolas a unos 30 cm de profundidad en 1971, y fue publicado por Martín Valls y Delibes (1974). No se conocen datos sobre la orientación del esqueleto y la disposición del ajuar. El segundo enterramiento se halló en 1987, en el mismo lugar, y se localizaron dos nuevas vasijas juntas y rotas en muchos fragmentos que se dispersaban en una



superficie de 2 metros cuadrados. Sin embargo, únicamente se encontraron restos humanos en el primer enterramiento. Concretamente, se trataba de 7 fragmentos correspondientes al cráneo, costillas, falanges y vértebras de un individuo adulto, mayor de 20 años, posiblemente varón. Además el cadáver estaba acompañado de tres recipientes de estilo Ciempozuelos (*Garrido Pena, 1999*). La datación radiocarbónica de los restos exhumados en este yacimiento, lo sitúan hace 3.970 ± 50 años BP.

Terrazas Del Manzanares (Rivas-Vaciamadrid, Madrid)

En un retazo de la terraza baja del Manzanares (Madrid), entre los kilómetros 18 y 20 de la carretera Madrid – Valencia, se realizaron trincheras durante la Guerra Civil que dieron lugar a la aparición de restos paleontológicos y prehistóricos. Concretamente en el nivel 2 de la secuencia litoestratigráfica local, se hallaron restos que se han atribuido a la transición Bronce Final/Edad de Hierro y que se cree pertenecen a la Cultura Cogotas I. En dicho enclave se encontraron restos de fauna (Equus, Bos, Capra y Lepus), tres fondos de cabaña y una estructura en forma de tinaja de metro y medio, dentro de la que se hallaba un esqueleto humano, perteneciente según el estudio antropológico a un varón de unos 25 años de edad. En el fondo de la tumba entre los restos del individuo, también se encontraron un cuenco cerámico, negro y sin tornear, dos prismas de cuarzo hialino y dos puntas de lanza de aspecto broncíneo. La pertenencia de la tumba a Cogotas I parecía estar avalada además por la datación radiocarbónica de una muestra de los huesos del esqueleto (3050 ± 100 BP). (*Gaibar Puertas, 1974)*). Sin embargo, la reciente revisión de todo el hallazgo, y la datación AMS de una muestra del esqueleto, parecen situar el enterramiento en la etapa Campaniforme (3720+-35 BP) (*Esparza et al., 2015; e.p.*).

Tablada Del Rudrón (Burgos)

Tablada del Rudrón es una localidad del municipio de Tubilla del Agua (Burgos). Al norte del pueblo, en un cruce de caminos del páramo que llega a Sargentes de la Lora, Jacinto Campillo excavó hace algunos años una cista campaniforme, de 11,9 metros de diámetro. coordenadas: x:0431508, y: 4732719. Dicho túmulo prehistórico fue retomado por Germán Deibes posteriormente, quien está reestudiándolo en la actualidad. En dicho túmulo prehistórico se exhumaron los restos esqueléticos de 4 individuos que se analizan en la presente tesis. Hasta el momento no se dispone de dataciones radiocarbónicas para este yacimiento.

2.1.3 La Edad De Bronce En La Submeseta Norte

Como su propio nombre indica, la Edad del Bronce es el período de la Prehistoria en el que se desarrolló la metalurgia de este metal, resultado de la aleación del cobre con estaño.

Dentro de la denominada Edad del Bronce, la terminología tradicional distingue tres periodos, Antiguo,

Medio y Final, pero en el caso de la Submeseta Norte, como en algunas otras, seguramente deben hacerse bastantes matices: por una parte, como luego se verá, es posible que se deba intercalar un Bronce Tardío entre el Medio y el Final, y por otro lado, no se veía muy clara la existencia de un Bronce Antiguo. Sin embargo, el avance de la investigación arqueológica en la región del Duero ha permitido reconocer la existencia de ese Bronce Antiguo, todavía no bien definido por la escasez de hallazgos funerarios, y que cuenta con una dificultad añadida, como es un cierto solapamiento de las dataciones radiocarbónicas de estos yacimientos con los Campaniformes, aunque el Bronce Antiguo podría situarse especialmente en los siglos XX y XIX a.C. (*Blasco-Bosqued, 1997a; Rodríguez Marcos, 2007*).

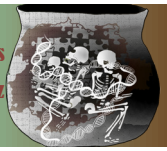
Lo que mejor se conoce hoy por hoy son los poblados, relativamente numerosos en la zona de Soria -allí comenzó a hablarse de un "horizonte Parpantique"- y que van apareciendo con cuentagotas en otras localidades, como Cardeñosa (Ávila), Villafáfila y Carbellino en Zamora, o algunas de la Ribera del Duero, entre Peñafiel y Aranda. El tipo de poblamiento es llamativo, ya que salvo excepciones, como la de Villafáfila por su especialización salinera, se trata de poblados situados en alturas con un acceso dificultado por lo empinado de las laderas, en los que aparecen cabañas circulares, ovales o rectangulares, hechas de ramaje enlucido con barro. Entre los materiales obtenidos, destacan las cerámicas decoradas, escasas pero muy características, por llevar elementos de barro adheridos, como cordones o mamelones, que forman una ornamentación en relieve (*Blasco-Bosqued, 1997a; Rodríguez Marcos, 2007*).

Durante este periodo aparece una mayor complejidad económica de las sociedades, y diferentes tipos de hábitat. Podemos encontrar hábitats en cueva, aunque poco a poco van transformándose en lugares de enterramiento, pero algunas cuevas se utilizan como vivienda; sin embargo el hábitat en cueva se extingue en el Bronce Antiguo, perdurando apenas sólo en el Bronce Medio en Cataluña. Otras formas de hábitat las constituyen los poblados, que pueden aparecer tanto en cerros altos como en llanuras.

El ritual funerario es muy poco conocido, habiendo algunos casos claramente emparentados con las sepulturas campaniformes, como es el caso de la joven inhumada en Santioste (Villafáfila, Zamora), pero también parece haber continuidad con otras tradiciones, como la de los enterramientos colectivos rupestres, como se ha advertido en la Cueva de La Revilla, en Atapuerca (Burgos), de donde proceden algunos esqueletos con los que ha podido contarse para esta tesis.

2.1.3.1 Yacimientos Seleccionados Del Bronce Antiguo

De entre los yacimientos del Bronce Antiguo se han seleccionado muestras procedentes de Santioste y la Cueva de la Revilla (prolongándose la utilización de ésta última más allá del Bronce Antiguo propiamente dicho), tal y como veremos a continuación.



Santioste (Zamora)

Este yacimiento del Bronce antiguo se sitúa en las lagunas de Villafáfila. Se sabe que hace entre 4500 - 3500 años (datación del nivel 3780±50 BP) la región de las lagunas de Villafáfila presentaba una elevada densidad poblacional, dado a la gran concentración de yacimientos encontrados a orillas de las masas de agua y los arroyos. Todos los datos apuntan a que durante esa época ya se realizaba una importante explotación de sal en la región, los datos que así lo indican, además de los vestigios arqueológicos encontrados, son fundamentalmente dos: por un lado, resulta difícil pensar que fueran poblados cuando las condiciones de hábitat son muy poco saludables, por ser espacios inhundados de agua salada casi todo el año; y en segundo lugar, en algunos casos los documentos medievales señalan la existencia de *pausatas* allí. Por lo que se cree que eran regiones de mera explotación salina (*Abarquero-Moras et al, 2012*).

Concretamente, el yacimiento de Santioste (también conocido como Los Pinos) del Bronce Antiguo, se sitúa en Otero de Sariegos. En éste gracias a los trabajos arqueológicos realizados durante los años 90 se descubrieron pozos para la extracción de salmuera, así como hornos excavados en el suelo y áreas de secadero con peanas de barro, que ya se habían observado en otros yacimientos con este tipo de actividad (Briquetage).

Dado el elevado nivel de explotación de la zona, se asume que esta factoría debió tener grandes beneficios económicos, lo que permitió a los habitantes de la zona hacerse con objetos de lujo, como los que se encuentran en el enterramiento funerario estudiado en esta tesis. Concretamente se trata de un enterramiento infantil en el que se encontró un cadáver de una niña de 13 años, con un impresionante ajuar que incluía elementos de marfil africano y plata (documentada por primera vez en todo el valle del Duero en esta ocasión). Todo ello hace pensar que la niña formaría parte de una familia con elevado estatus social, que probablemente hubiera sido logrado gracias a las riquezas obtenidas de la explotación y comercio de la sal (*Abarquero-Moras et al, 2012*).

Cueva De La Revilla (Atapuerca, Burgos)

El descubrimiento de esta cueva tuvo lugar de manera fortuita mientras se realizaba la excavación de un sótano en el interior del patio de una vivienda particular ubicada en el casco urbano de Atapuerca (Burgos). La primera campaña de excavación se realizó hacia 1999 y la segunda en el año 2000. La cueva de La Revilla se localiza en las proximidades de la vega del río Vena, en la terraza del Arlanzón a más de 40 metros sobre el actual cauce, lugar con disponibilidad hídrica y suelos fértiles, lo que hacía de este emplazamiento un lugar de recurrente ocupación humana durante la prehistoria (*Abarquero-Moras et al., 2005b*).

La cueva alcanza 520 cm de longitud de norte a sur, y una anchura de oeste a este similar. En cuanto a su desarrollo vertical, presenta grandes desniveles, con una altura total máxima de 450 cm.

Dentro de la cueva se encuentran dos importantes agrupaciones de restos esqueléticos humanos, cuya característica principal es una clara dispersión de los huesos por toda la cueva. Además los restos no se distribuyen en un solo plano, sino que se acumulan unos sobre otros, superpuestos, entremezclados y con disposiciones y orientaciones diversas. Se pueden agrupar la mayor parte de los huesos en dos sectores individualizados en función de su posición dentro de la cueva; uno de ellos se localiza en el fondo dela cueva y el otro pegado a la pared sur. Existe una última agrupación, más pequeña y sin presencia de cerámicas u otros utensilios.

A rasgos generales, hay que destacar que no se encuentra ningún individuo completo, no está claro que se trate de deposiciones primarias y la mayoría de los restos humanos se localizan en el flanco occidental y suroccidental de la sala (*Abarquero-Moras et al., 2005b*).

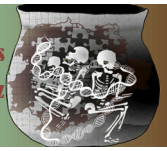
El carácter alterado del osario, parece deberse a dos razones distintas. La primera al carácter colectivo y diacrónico de la cueva como lugar de enterramiento, puesto que la misma parece haber funcionado como un panteón recurrentemente utilizado por uno o varios grupos que visitan la cueva de forma intermitente a lo largo de varias generaciones. La segunda razón a tener en cuenta para entender el desorden del osario está en la simple deposición de los cadáveres sobre el suelo de la cueva, sin cubrir, lo que hacía que el difunto quedara expuesto a procesos postdeposicionales, tales como la acción de animales carroñeros o también la actuación de desprendimientos de las paredes y el techo de la cueva, que provocarían la descomposición, desconexión y dispersión de los cuerpos (*Abarquero-Moras et al., 2005b*).

El número mínimo de individuos estimado según el primer informe era de 8 individuos (*Palomino-Lázaro y Abarquero-Moras, 2000)*. Posteriormente se contabilizaron un mínimo de 11 individuos (6 adultos y 5 infantiles) (*Abarquero-Moras et al., 2005b*) y, finalmente, se ha estimado un número mínimo de 21 individuos, siendo al menos 4 de ellos subadultos (*Palomino-Lázaro y Abarquero-Moras, 2000).*

En cuanto a las cerámicas encontradas, aunque muy fragmentadas hay que decir que todos los fragmentos muestran características técnicas y morfológicas homogéneas y por lo tanto son susceptibles de pertenecer al mismo entramado cultural. Las dataciones radiocarbónicas sitúan la utilización de la cueva y los enterramientos desde 3550±40 a 3325±35 BP, y por la cultura cerámica encontrada parece que la cueva del Barrio de la Revilla de Atapuerca fue un enterramiento colectivo de larga duración, utilizándose durante el Bronce Antiguo y en la fase Protocogotas I.

2.1.4 La Gran Cultura Meseteña De La Edad De Bronce: Cogotas I

Una importante cultura arqueológica llamada de Cogotas I, con aspectos continuistas con respecto a las anteriores, va a desarrollarse por toda la Meseta durante unos ocho siglos, esto es, casi todo el Segundo Milenio a.C. : en primer lugar, el momento Formativo también denominado Protocogotas I, que corresponde al Bronce Medio regional, aproximadamente entre 3800 y 3450 BP.; después, la fase de Plenitud denominada más estrictamente Cogotas I , que constituye el Bronce Tardío regional, previo al



Bronce Final. Su cronología parece más segura entre 3400 y 3000 BP, habiendo una cierta controversia entre los autores que mencionan un momento de Cogotas I Avanzado (*Abarquero, 2005*), y otros autores (*Esparza et al., 2012a: 313*) que sugieren que las cerámicas con decoraciones más complicadas no corresponden a esa supuesta fase más reciente, sino que encajan perfectamente en la de Plenitud, y que se trata de una diferencia de índole funcional.

El punto de partida de la investigación de Cogotas surge precisamente en el castro denominado de Las Cogotas, localizado en Cardeñosa (Ávila), y excavado por Juan Cabré a finales de los años 20 del pasado siglo. De ese hallazgo surgieron característicos materiales cerámicos que por su parecido con algunos asignados al Bronce Final y la Edad del Hierro Centroeuropeos, se pensaba eran testimonio de invasiones desde el centro de Europa (*Bosch, 1932; Pérez de Barradas, 1933-1935*), siendo considerados "célticos". Sin embargo, durante los años 70 las excavaciones más modernas, desvelaron materiales cerámicos Cogotas que iban saliendo a la luz en muchos yacimientos tanto en el interior peninsular, como en el Sureste, y de este modo Cogotas adquirió naturaleza de "Cultura", en el sentido de un "Grupo Arqueológico", y se empezó a defender el carácter indígena de la misma (*Delibes, 1982-1983: 87-89*), y no celta, y su posición en la Edad del Bronce.

En el tipo de poblamiento hay alguna continuidad respecto al Bronce Antiguo, pues algunos yacimientos tienen emplazamientos de altura muy llamativos, pero la gran mayoría son yacimientos a campo abierto, en llano. Debieron de ser pequeñas aldeas compuestas por cabañas de índole vegetal, corrales y numerosos "hoyos", es decir, estructuras excavadas en el suelo, que en su mayoría serían originariamente silos para guardar el grano u otros productos. Una vez vacíos esos hoyos iban siendo cerrados rellenándose con la propia tierra del nivel de ocupación, por lo que el aspecto actual de esos hoyos es el de basureros, con tierra más o menos cenicienta, con restos de fauna, fragmentos cerámicos, etc, es decir, los desechos domésticos arrojados a la basura.

Estos yacimientos, denominados comúnmente "campos de hoyos", son muy numerosos, y a veces bastante próximos, dando la impresión de que el hábitat se va desplazando, tal vez en relación con el agotamiento de la fertilidad del suelo.

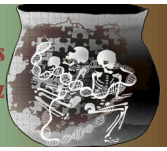
Las industrias reconocidas: lítica, ósea y metálica presentan en general un carácter "tradicionalista". Especialmente llamativa es la persistencia de las técnicas metalúrgicas y las coladas metalúrgicas, que en buena medida siguen siendo de cobre arsenicado, aunque progresivamente se van haciendo de bronce al añadirse el estaño. Los objetos fabricados son también tradicionales, como las hachas planas, los punzones o las puntas de flecha, pero poco a poco se irán incorporando tipos nuevos, reflejando contactos e influencias con otras áreas, como la argárica o la atlántica, de donde procederían las escasas hachas de talón o las espadas.

Las bases económicas no son muy diferentes de las de las etapas anteriores, combinando una agricultura cerealista con una ganadería de vacuno, ovicápridos y cerdos, sin olvidar una caza complementaria.

En realidad, donde más se percibe el cambio con respecto al Bronce Antiguo es en las cerámicas decoradas. Aunque sigue habiendo recipientes lisos o decorados en relieve con digitaciones, difíciles de distinguir de las anteriores, ahora aparecen multitud de vasos abiertos, de perfil carenado y con decoraciones geométricas bien ordenadas a base de espigas, zigzag, etc , que hacen muy reconocible el estilo Protocogotas I. Posteriormente, el estilo que permite hablar de Cogotas I propiamente dicha, se va haciendo más complicado, con una mezcla de técnicas (incisión, impresión de Boquique, excisión) que van ocupando cada vez más superficie en los recipientes; éstos van haciéndose también con formas nuevas, como los vasos troncocónicos (*Abarquero-Moras, 2005a).*

Las diferencias estilísticas que se han citado parecen ser el aspecto más visible de una realidad más compleja. En efecto, ambas sub-fases parecen ofrecer características distintas, como por ejemplo, una mayor importancia de los emplazamientos destacados en Protocogotas I, donde hay incluso algunos poblados que parecen contar con murallas o al menos líneas de cierre a base de tosca mampostería; también en esa fase se registra con cierta frecuencia la realización de depósitos de difícil interpretación, en los que se entierran animales o partes de los mismos, o también recipientes cerámicos completos. Estas manifestaciones parecen disminuir en Cogotas I Pleno, fase en la que aumentarían en cambio los depósitos metálicos, y se haría frecuente el plomo en las aleaciones broncíneas; la mayor abundancia y calidad de los fabricados metálicos justificarían la disminución del utillaje de piedra y de hueso que se advierten también en la fase más reciente. También podría añadirse la disminución de los enterramientos respecto a la fase Formativa.

Pasando al mundo funerario, también se podría continuar con la comparación respecto al Bronce Antiguo, con el que muestra alguna continuidad pero también novedades. Ciertamente, el tipo funerario más característico sigue siendo la inhumación en hoyo, generalmente en decúbito lateral flexionado, y todavía persiste alguna utilización de otras fórmulas, por ejemplo el enterramiento colectivo en cuevas, como la mencionada de La Revilla (Atapuerca, Burgos), en la que hay algunas cerámicas que pertenecen a la fase Protocogotas I. De hecho, algunos de los esqueletos de este yacimiento han sido datados por el radiocarbono en esa fase, ilustrando seguramente una continuidad poblacional que es interesante analizar desde el punto de vista paleogenético. Pero frente a esos aspectos continuistas, las citadas inhumaciones en hoyo, halladas en el interior de los yacimientos de habitación, presentan una llamativa ausencia de ajuar, lo que las distingue muy claramente de las que se mencionaron en el Calcolítico, Campaniforme y Bronce Antiguo. El total de enterramientos hallado, muy escaso en relación al elevado número de yacimientos que se conocen. La mencionada falta de ajuar, y otros argumentos como la sorprendente proporción de enterramientos triples o la estructura demográfica del conjunto de los enterrados han llevado a sugerir recientemente que todo ese conjunto es excepcional, y partir de la observación de dos esqueletos del yacimiento de Tordillos se ha propuesto que el rito habitual de enterramiento de las comunidades de Protocogotas I y Cogotas I fue la exposición de cadáveres (*Esparza-Arroyo et al., 2012*), mientras que se daba sepultura en hoyo solamente a una fracción muy concreta de la población, seguramente aquellas personas que se consideraba que habían tenido una “mala muerte” (por ejemplo por haber fallecido tempranamente en accidentes, de sobreparto, etc.) e incluso individuos socialmente rechazados, a los



que se enterraría en hoyos, pero sin la cuidadosa colocación que se dispensó a los anteriores. Ambos subtipos de enterramientos integran el conjunto de restos humanos que ha podido analizarse en esta tesis, siendo mayoría los pertenecientes al Protocogotas I, y más escasos los de Cogotas I Pleno, pues como ya se dijo una de las características de esta fase es la disminución del número de enterramientos con respecto a la fase Formativa.

Pero las dataciones radiométricas de los inicios de Cogotas I, con la aceptación de una genealogía que alcanzaba el Bronce Medio, conlleva un intervalo temporal muy extenso, y se requirió una acotación en fases. Delibes y Fernández Manzano (1981) definieron una fase de transición entre las cerámicas campaniformes de Ciempozuelos y las de Cogotas I, y a esa fase la denominaron ProtoCogotas I o Cogeces.

Esta fase previa, ProtoCogotas I, (Bronce Medio, 1.850 al 1.450 AC), se caracteriza por la ausencia de decoraciones excisas y de boquique. La definición el estilo ProtoCogotas I tendría lugar en el valle alto del Duero con Los Tolmos de Caracena, Arevalillo de Cega, la Plaza de Cogeces y las Cogotas de Cardeñosa como referentes. Los cuencos profundos, las cazuelas de borde convexo saliente, las fuentes troncocónicas del borde vertical y las fuentes de perfiles en S abiertas serían los recipientes típicos de este momento y en ellos se desarrollarían las decoraciones características de las primeras cerámicas de Cogotas I, entre las que destacan las series de espigas incisas, con un repertorio cerámico compuesto por cuencos globulares y las fuentes o cazuelas carenadas decoradas con las características hileras de espigas, zig-zags y triángulos rellenos de puntos o trazos oblicuos hechos a base de incisiones e impresiones.

En el Bronce final (1400-1100 A.C.) se desarrolla la Fase de “Plenitud” de Cogotas, y durante este periodo la vajilla se caracteriza por vasos troncocónicos decorados a base de grandes bandas de frisos donde se plasman ajedrezados y dientes de lobo excisos, así como guirnaldas y bandas de boquique que a su vez se intercalan con motivos lineales incisos.

Se venía suponiendo que las comunidades Cogotas estaban sujetas a una constante movilidad, con ocupaciones transitorias, motivadas por unas prácticas económicas de condición itinerante (*Delibes et al., 1995; Blasco et al., 1996: 52; Delibes y Fernández Manzano, 2000: 110-111; Jimeno, 2001: 160; Blasco, 2004a: 573; Abarquero, 2005: 433; Abarquero et al. 2009: 297*).

Sin embargo, otros autores vienen modelando, en los últimos años, otra imagen muy distinta a la admitida tradicionalmente de una economía básicamente de subsistencia y unos campamentos provisionales, dadas las restricciones interpretativas que lleva aparejadas como las limitaciones encontradas a la hora de cotejarlo en el registro arqueológico. Así, merced a los estudios paleoambientales que combinan tanto la información arqueobotánica como arqueofaunísitca, se viene constatando la disponibilidad de recursos que permiten conferirle no sólo mayor estabilidad en el territorio a los grupos de Cogotas I, sino también una capacidad de generar excedentes más allá de las necesidades subsistenciales (*Díaz del Río, 2001; López Ambite, 2003; Arnáiz y Montero, 2003-2004)*.

2.1.4.1 Yacimientos Protocogotas I Seleccionados

Carrelasvegas (Santillana De Campos, Palencia)

Los restos esqueléticos humanos hallados en el yacimiento arqueológico de Carrelasvegas se exhumaron concretamente del hoyo D-1 del mismo. Este hoyo estaba colmatado por un relleno homogéneo de tierra gris y textura cenicienta, bastante suelta, excepto sus dos últimos centímetros en los que la tierra era más endurecida. Además parece haber evidencia de fuego, y también presencia de abundante material cerámico. Dicho hoyo tiene un diámetro de 90 centímetros en la boca y 140 centímetros en su base, con una profundidad de 125 cm final (*Martín Carbajo et al., 1993*).

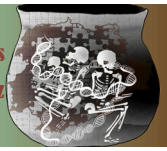
El enterramiento humano apareció a unos 90 cm de la boca del hoyo, y a unos 120 cm del nivel actual. El individuo parecía corresponder con un adulto masculino. Apareció recostado próximo a la pared sur del hoyo, sobre el final del relleno ceniciento, y con una orientación oeste-este. Su posición era de decúbito lateral derecho, mirando hacia el sur. Su posición era forzada, con las extremidades superiores en la espalda, como si hubieran estado atadas, la mano izquierda bajo la cabeza y la derecha a media espalda, por otro lado las extremidades inferiores están flexionadas, la derecha plegada hacia atrás, y la izquierda recogida ante el abdomen. En cualquier caso, no fue posible confirmar si dicha posición fue la establecida durante la deposición del cadáver o fue una consecuencia de la presión ejercida por la tierra que colmataba el hoyo. En efecto, la posición del muerto parece indicar que no fue tratado con gran consideración, siendo depositado sin mucho cuidado, seguramente descolgándolo desde la boca agarrado por las manos y, posteriormente, desplazado hacia suposición final (*Marín Carbajo et al., 1993*).

El cuerpo no va acompañado de ajuar propiamente dicho, solamente presenta una lámina de sílex rosa de sección triangular y una espátula de hueso bastante deteriorada. A los pies del individuo se encontraron dos costillas humanas que no eran suyas, y no se analizan en el presente estudio final (*Martín Carbajo et al., 1993*).

La datación radiocarbónica de los restos exhumados en este yacimiento datan del 3230±80 BP.

El Cementerio (Quintanilla De Onésimo, Valladolid)

Este yacimiento, sobre el cual se halla el cementerio de la localidad, se emplaza en la comarca de La Ribera del Duero, en una vega en la orilla izquierda del río y al pie de un pequeño cerro. En el suelo de tipo arenoso hay abundantes estructuras excavadas u “hoyos” conteniendo material detrítico correspondiente a la Edad del Bronce. Las tradicionales labores de viñedo afectaron al yacimiento, pero no tanto como la construcción del cementerio. Por ello, la construcción de unos panteones en los años 90 conllevó la



realización de excavaciones arqueológicas que permitieron catalogar con precisión el yacimiento en la fase Protocogotas I (*Rodríguez Marcos y Abarquero Moras, 1994*). Otra reciente campaña de excavación, inédita, motivada por una ampliación del cementerio deparó el hallazgo de nuevos hoyos, en uno de los cuales apareció un fragmento de cráneo humano correspondiente a un individuo infantil de unos 6-7 años, del que se ha obtenido datación radocarbónica (Poz-43663: 3480 ± 35 BP) (*A. Esparza, com. pers*.).

El Cerro (La Horra, Burgos)

El yacimiento de El Cerro se sitúa en el término municipal de La Horra (Burgos). Concretamente a unos 800 metros al norte del núcleo urbano y 30-40 metros al oeste de la carretera comarcal que conduce a Burgos. El Cerro ocupa una posición central en la amplia campiña al norte del Duero, entre el valle y la paramera inmediata que da paso al valle del Esgueva (*Palomino-Lázaro, et al 1999*).

Se han excavado un total de 32 estructuras, de las cuales 28 se han considerado prehistóricas, incluida la fosa dónde se encontraba el enterramiento humano analizado en el presente trabajo. Las 4 estructuras restantes se pueden corresponder con época medieval (*Palomino-Lázaro, et al 1999*).

El enterramiento consiste en una fosa excavada en el nivel de abandono de un fondo de cabaña. Esta superposición indica la utilización de un mismo espacio de manera recurrente en distintos momentos cronológicos, aunque es por el mismo grupo cultural, dado a los hallazgos de los mismos tipos de cultura material (*Palomino-Lázaro, et al 1999*).

En el interior del enterramiento se habían inhumado tres individuos. Esto pone de manifiesto la posible utilización de un mismo espacio de manera recurrente en diferentes momentos cronológicos, pero por el mismo grupo cultural, dados los vestigios materiales encontrados. La fosa consiste en una estructura ovalada no regular orientada en dirección norte – sur, de longitud máxima de 230 cm, y anchura de 108 cm. Las paredes descienden rectas y tiene un desarrollo vertical de entre 15 y 20 cm, con el fondo plano. Del primer individuo faltaban los pies, la tibia y el peroné de la pierna derecha y parte del brazo izquierdo, con el cráneo parcialmente cortado por la pala. Este individuo estaba orientado con la cabeza hacia el Sur, con una posición corporal muy forzada, lo que hace pensar en la posibilidad de que el cuerpo pudiera haber estado atado anteriormente, para poder mantener una postura tan antinatural. Este enterramiento habría estado cubierto por un nivel superficial de unos 25 cm. Por debajo de ese individuo, encontramos otros dos, situados ya en la parte inferior de la fosa funeraria. Estos individuos aparecen uno inmediatamente por encima del otro. El primero de ellos está recostado sobre su lado izquierdo, con las piernas flexionadas y los brazos plegados sobre el pecho; le falta la pelvis, parte de las vértebras dorsales y todas las lumbares; tampoco tiene pies, aunque en la pierna izquierda conserva gran parte del tarso. También se encontraron un conjunto de falanges entre las cabezas de ambos individuos, pero no fue posible determinar a cuál de ellos pertenecían. El cráneo se conservaba casi completo y en perfecto

estado, lo que facilitó la selección muestral para el estudio genético. El último individuo se conserva muy parcialmente. Está colocado sobre el lateral derecho y sólo presenta el cráneo, una de sus manos y las extremidades inferiores, que se encuentran flexionadas. De su caja torácica únicamente se conserva una escápula, situado bajo la mandíbula, perdiéndose el resto de su estructura ósea (*Palomino-Lázaro, et al 1999*).

Acompañando los restos humanos, hay diverso material arqueológico, fundamentalmente cerámica elaborada a mano, destacando varios bordes decorados con motivos incisos. La industria lítica es pobre y son restos de talla, tanto en sílex como en cuarcita. También se documentan algunos huesos de fauna de animales de pequeño tamaño. Pero no aparecen verdaderos ajuares (*Palomino-Lázaro, et al 1999*).

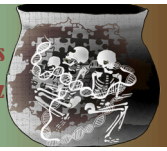
La datación radiocarbónica de los restos humanos exhumados en este yacimiento sugiere una edad de entre 3180±50 BP y 3225±30 BP.

El Juncal (Villaralbo, Zamora)

Esta sepultura fue descubierta en Villaralbo (Zamora); donde se localiza uno de los numerosos "Campos de hoyos" del Calcolítico y la Edad del Bronce regionales. Se han encontrado abundantes estructuras subterráneas con fragmentos cerámicos y desechos faunísticos. Los hoyos parecen pertenecer, a juzgar por los materiales de sus rellenos, al menos a tres momentos diferentes, por lo que se ha estudiado con el máximo detalle el relleno funerario, que se ha determinado como perteneciente a la fase Protocogotas (Bronce Medio), cronología que se corroboró con la datación radiocarbónica (3.335±35 BP) (*Esparza et al., 2008*).

En uno de los hoyos, se encontró un enterramiento primario, en el cual yacía un varón joven. El hoyo sepulcral apareció cubierto por tierra vegetal, con una planta casi circular, paredes verticales y aproximadamente 1,30 m de diámetro. Los huesos no se encontraban a más de medio metro de la superficie y consistían en los restos de un varón que yacía sobre el costado izquierdo, con las extremidades flexionadas, y con orientación Sur-Norte, vuelta la cara hacia el Oeste. La datación radiocarbónica directa del individuo no fue posible, ya que el grado de degradación del colágeno era muy avanzado, por lo que la datación se realizó a partir de una muestra de carbón vegetal que estaba en contacto directo con el esqueleto.

En cuanto a las cerámicas que acompañaban al esqueleto, se hallaron algunas decoradas, comunes en yacimientos de todo el desarrollo de Cogotas I. Sin embargo, resulta inequívoco un fragmento claramente Protocogotas I, por su paralelismo con otros hallados en otros yacimientos (*Esparza et al., 2008*). Junto con la datación obtenida por radiocarbono, parece que esta tumba encaja mejor en la fase Protocogotas I. Esta cronología cuenta con el apoyo además de la propia ubicación de la tumba en un sector donde se concentran la mayoría de los hoyos del Juncal asignados al Protocogotas I (*Esparza et al., 2008*).



Fuente De La Mora (Valladolid)

En las inmediaciones de Valladolid, sobre la primera terraza del río Esgueva, se localiza un amplio yacimiento en el que, según los materiales encontrados y estructuras reconocidas en prospecciones y excavaciones, se superponen ocupaciones desde el Neolítico hasta la Primera Edad del Hierro, con una serie de hoyos que han deparado materiales de Protocogotas I, destacando tres de ellos por contener restos humanos (*Strato, S.L., 2009*).

Los tres hoyos que presentaban restos humanos se encontraban muy próximos unos de otros, estando los hoyos 31 y 32 más próximos y el 33/37 a unos cuantos metros más al este de los anteriores. Los individuos de las fosas 31 y 32 tienen la cabeza orientada hacia el oeste, mientras que el del 33/37 está orientado hacia el norte, presentando además otra serie de peculiaridades (*Strato, S.L., 2009a*).

El individuo 1, correspondiente al hoyo 31, es un varón adulto fallecido en torno a los 20-25 años de edad. Se le dispuso ocupando la zona central del hoyo, con el torso y el cráneo en decúbito supino con ambos húmeros en paralelo al cuerpo y los antebrazos aparentemente flexionados hacia su cuerpo. Su representación anatómica es bastante parcial. Como característica peculiar, este individuo presenta un defecto en la osificación del arco posterior del atlas, se trata de una anomalía congénita que no se ha observado en ningún otro sujeto del yacimiento (*Strato, S.L., 2009a*).

El segundo individuo, exhumado del hoyo 32, es un individuo infantil que fue colocado en decúbito lateral flexionado sobre el lado derecho. El cuerpo estaba rodeado de un conjunto de piedras en contacto directo con él, que probablemente se colocaron en el momento del depósito inicial, pues parecen haber provocado cierta compresión lateral; y han favorecido el mantenimiento de las piezas óseas de la mitad superior del cuerpo en posición primaria. En la mitad inferior el cuerpo no se encuentran piedras por lo que los huesos de esta región han sufrido mayor desplazamiento. Gracias a los patrones de desarrollo de la dentición ha sido posible estimar la edad de este individuo, que se encuentra entre los 3 y 4 años de vida (quizás más próximo a los 4 años por el desarrollo de los incisivos definitivos). Por la robustez de la mandíbula, se ha considerado que pudiera tratarse de un varón. No se han observado lesiones paleopatológicas (*Strato, S.L., 2009a*).

El tercer y último individuo, ubicado en el hoyo 33/37, corresponde a una mujer, dispuesta en decúbito dorsal extendido, al menos en su parte inferior que es la que se ha podido recuperar mejor. Gracias a la conservación de su cintura pélvica fue posible determinar el sexo de esa mujer con precisión, y su edad se estableció entre los 25 y los 29 años. No se observaron lesiones ni anomalías, tratándose eso sí de una mujer bastante robusta (*Strato, S.L., 2009a*).

La Huelga (Dueñas, Palencia)

El yacimiento arqueológico de La Huelga se localiza en la zona de vega de los páramos del Cerrato palentino, en la actual segunda terraza del Pisuerga. Fue descubierto en 1991, y consiste en un típico "campo de hoyos" de la Edad del Bronce de la Meseta, dadas las características de la gran mayoría de las cerámicas allí encontradas. La técnica decorativa de las cerámicas que destaca es la incisión, con motivos de espigas simples o múltiples líneas horizontales enmarcando trazos horizontales u oblicuos, triángulos rellenos de trazos incisos, zig-zag simples o múltiples y retículas oblicuas (*Misiego-Tejada et al, 1992*).

El yacimiento se extiende aproximadamente en unas 4 hectáreas y en él se ha realizado la exhumación de un total de 96 estructuras, de los cuales 92 parecen ser hoyos-silos y 4 parecen corresponder a hoyos de poste (*Misiego-Tejada et al, 1992*).

En este yacimiento llama la atención el hallazgo de frecuentes depósitos con restos de fauna articulados, entre ellos, algunos de perros. En algunos de ellos los perros presentan una exhaustiva desarticulación y despiece, acompañados por piezas óseas de vacuno, que se atribuyen a diferentes tipos de sacrificios (*Liseau von Lettow-Vorbeck et al, 2014*).

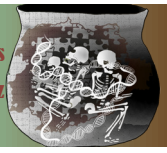
La situación geográfica del yacimiento, además hace pensar que se trataría de un lugar con un gran potencial agrícola, ganadero y cinegético (*Pérez Rodríguez et al., 1994*).

Además, en las escombreras de los sectores 3 y 4 de este yacimiento se recogió parte de un puñal de sección hexagonal, probablemente de bronce. Y Muy próximo a este hallazgo se encontró el fragmento de calota craneal de un individuo joven (*Pérez Rodríguez et al., 1994*) que se ha analizado en el contexto de esta tesis, y que testifica una inhumación de la que se desconocen sus características (3290±35 BP) (*com. pers. Esparza A.*).

Los Rompizales (Quintanadueñas, Burgos)

La excavación arqueológica de Los Rompizales se localiza en el término municipal de Quintanadueñas (Burgos). Los trabajos de excavación se desarrollaron sobre una extensión de 2400 m2, sin embargo este terreno solamente supuso una pequeña parte de lo que es el yacimiento real. Por ello el registro resulta incompleto (*Antequem, 2009*).

En el pago de "Los Rompizales" encontramos un típico "campo de hoyos", formado por un amplio número de estructuras excavadas en el sustrato geológico, que en su mayoría se identificaron como silos, espacios de almacenaje de provisiones, junto a un número mucho menor de estructuras dedicadas a otras funciones (hornos, basureros, enteramientos, etc.). Sin embargo, no se encontraron vestigios de presencia de hábitat asociado a estos silos, ni tampoco se hallaron fondos de cabañas, ni estructuras constructivas, ni hoyos de postes que dibujasen el sustrato de la planta de las viviendas. Esto puede deberse a que fueron



destruidos. Pero en cualquier caso, la existencia del campo de hoyos denota que existió un poblado, ya que los silos se asocian directamente a una explotación agrícola como actividad principal, y no como algo secundario (*Antequem, 2009.).*

El modelo de asentamiento de esta población presenta las características propias de las sociedades del Bronce Medio, con una economía de vocación claramente agraria, que además de por los silos queda patente por el hallazgo de abundantes fragmentos de cerámica de almacenaje (*Antequem, 2009).*

Se encontraron cerámcas que parecen hacer de puente entre el horizonte Parpantique, del Bronce antiguo, y el horizonte de Cogotas I, es la llamada también Horizonte de Cogeces, y se define por la preponderancia de decoraciones incisas y ausencia de boquique y excisión. Los motivos son espigas y zig-zag, trazos oblicuos, zonas angulares y triángulos rellenos de paralelas y puntillado. Se trata de composiciones sencillas y sobrias (*Antequem, 2009.).*

En los Rompizales encontramos un enterramiento individual, tomando el concepto de individual como un enterramiento puntual en un sitio concreto apartado de los lugares comunes de enterramientos de la comunidad, y no utilizado de nuevo, independientemente del número de individuos que se depositen en él (no hay que confundir múltiple con colectivo). De modo que el número de individuos enterrados responde a una cuestión accidental y no está determinado por una planificación previa. Con estas indicaciones previas, en el contexto 640 de Los Rompizales encontramos un enterramiento individual pero múltiple, en el que se inhumaron cuatro cadáveres dentro de una fosa circular sin estructuras ni indicadores externos, que pudo tratarse de un silo reutilizado después como sepultura (*Antequem, 2009).*

En este enterramiento se halló una posición poco típica de los cuerpos, de modo que el individuo depositado en el centro de la fosa pertenecía a una mujer adulta joven según el estudio antropológico, mientras que uno de los cuerpos en el borde de la fosa era un individuo infantil (dada la ligereza de su estructura ósea y su estatura de entre 130 y 135 cm), los otros dos individuos se determinaron como dos varones adultos jóvenes. Todos estos datos hacen pensar que pudiera tratarse de miembros de una misma familia, cuyo fallecimiento acaecería al mismo tiempo, por lo cual se les enterraría de manera simultánea en la misma tumba. La causa de muerte no queda clara, pero se cree que pudo tratarse de un hecho violento que les llevó a ser enterrados en el mismo lugar. Gracias al análisis genético de los restos osteológicos en este trabajo, será posible determinar si realmente se trata de miembros emparentados por lazos familiares cercanos. Llama la atención el hecho de que no se encontró ningún elemento de ajuar junto a los cuerpos, ni tampoco restos de ofrendas en forma de animales (*ANTEQUEM S.L.) (Jimeno, 1984; Jimeno y Fernández-Moreno, 1991).*

La datación radiocarbónica de los restos de los Rompizales, los sitúa entre 3.165±30 B.P. y 3.250±35 B.P.

Las Cañamonas (San Cristobal de Entreviñas, Zamora)

El pago de Las Cañamonas, se localiza en el término municipal de San Cristóbal de Entreviñas, Zamora. Los restos prehistóricos hallados se reducen a una muestra de cerámica y un hachita pulimentada, labrada sobre una placa de esquisto oscuro. En la decoración cerámica abundan las formas esféricas, que entre otras características, apuntan a situar este yacimiento en la segunda mitad del Tercer Milenio (*Larrén y Val, 1993: 339-349*).

Los restos esqueléticos humanos exhumados a partir de este yacimiento, corresponden a un único individuo; definido tras el estudio antropológico como una mujer de entre 35 y 45 años de edad; al cual se asignó la nomenclatura 1CÑ, y a las dos muestras seleccionadas: 1CÑ1 y 1CÑ2. Su datación radiocarbónica los sitúa en el 3205 B.P.

Los Tolmos (Caracena, Soria)

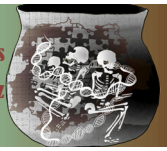
Los Tolmos es un pequeño asentamiento en un meandro del río Caracena (Soria). Fue excavado en 1979, y es un asentamiento estacional ProtoCogotas I o de la primera fase de la cultura Cogotas I, Bronce Medio (circa 3600-3.200 B.P.). Nuestro estudio se ha centrado en dos enterramientos ubicados en este enclave, el primero de ellos consistía en una tumba individual; el segundo, contenía restos esqueléticos correspondientes a tres individuos enterrados de manera simultánea.

En la primera tumba, se hallaron dos esqueletos adultos, el primero fue identificado como una mujer de entre 20 y 25 años que descansaba sobre su costado izquierdo (el sexo se determinó a juzgar por las características morfológicas de su cráneo y pelvis, y la edad por el grado de osificación de los extremos esternales de ambas clavículas, el aspecto de la sínfisis púbica y el desgaste oclusal de la superficie de sus molares), y el segundo sobre su costado derecho y se estimó que tendría entre 30 y 40 años de edad, siendo el sexo indeterminable. El tercer individuo se hallaba entre los dos adultos, más próximo al primero, y consistía en una pequeño conjunto de huesos pertenecientes a un individuo perinatal (recién nacido o feto a término), siendo estimada su muerte entre las 37 y las 39 semanas de gestación.

Por otro lado, en la otra tumba, se encontraron restos esqueléticos pertenecientes a un individuo masculino de entre 14 y 16 años de edad, al que denominamos LTA4.

Tordillos (Aldeaseca De La Frontera, Salamanca)

El yacimiento de Tordillos se localiza en Aldeaseca de la Frontera, provincia de Salamanca. Es un yacimiento ubicado en arenas fangosas de la llanura, sobre una zona de suave alomamiento junto al arroyo Vallelargo, afluente del Tormes. Allí se halló una ocupación con abundantes hoyos y cubetas, algunas



asignables al grupo Cogotas I, siendo excavado hacia el año 2007. Se detectaron unas 300 estructuras negativas, nueve de ellas de carácter funerario, nunca antes se habían hallado tantas estructuras funerarias en un yacimiento cogotense. Se hallaron más de veinte individuos repartidos en depósitos múltiples.

El yacimiento de Tordillos brinda una oportunidad única, para replantear el estudio de las prácticas sociales de Cogotas. Es algo excepcional atendiendo al número de hoyos y de restos humanos (*Esparza et al., 2012*).

La duración de este yacimiento se extiende por los periodos Protocogotas I y Cogotas I pleno, y está conformado mayoritariamente por restos esqueléticos en posición secundaria y sin vínculos anatómicos directos, aunque existen tres hoyos que acogen depósitos primarios (*Esparza et al., 2012*).

En los nueve hoyos funerarios de Tordillos se exhumaron los restos óseos correspondientes a un número mínimo de 22 individuos.

La datación radiocarbónica realizada sobre el individuo 7TOR de este yacimiento, lo sitúa entorno al 3205±35 BP

2.1.4.2 Yacimientos Seleccionados De Cogotas I

De este periodo únicamente fue posible disponer de muestras procedentes de tres yacimientos para el estudio arqueogenético. En este caso se trató de los yacimientos de La Requejada, Cantoblanco y el Cerro de la Cabeza.

La Requejada (San Román De Hornija, Valladolid)

En el sur del término municipal de San Román de Hornija (Valladolid) nos encontramos con el yacimiento de La Requejada, asentado sobre la margen derecha del río Duero. Este yacimiento fue descubierto en 1972, y se realizaron dos intervenciones arqueológicas, una en 1973 y la segunda en el año siguiente, 1974; ambas dirigidas por Germán Delibes de Castro (*Delibes de Castro, 1978*).

En este lugar se encontraron una serie de hoyos, también conocidos como silos o basureros, entre los que se halló una fosa de enterramiento múltiple.

En el campo de hoyos se recuperaron diversos restos arqueológicos con mayor o menor grado de deterioro, entre ellos abundaban las cerámicas, vestigios de fauna, piezas líticas y punzones de hueso, siendo mucho más escasos los elementos metálicos, en su mayoría de bronce.

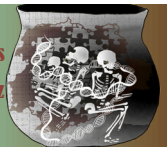
En lo que refiere al enterramiento, se detectó en una fosa similar a las demás, y en él se hallaron restos correspondientes a tres personas. El primer individuo, era una mujer joven de gran estatura, yacía de espaldas con los brazos recogidos sobre el pecho y las piernas replegadas hacia la izquierda. Este individuo tenía entre las manos y cerca de cuello un pequeño prisma de plata, con aspecto de colgante, y sobre la cabeza un esqueleto completo de conejo. El segundo individuo también era de gran estatura, en este caso un varón de edad avanzada, y reposaba sobre el costado derecho, con la mano izquierda sobre el regazo y la derecha flexionada algo más arriba; tenía las piernas replegadas pero orientadas en la línea del tronco. Finalmente, el tercero, se encontraba en idéntica postura que el segundo, y consistía en un individuo más grácil, concretamente se trataba de un individuo infantil de sexo indeterminable que reposaba con las manos recogidas sobre la cabeza (*Delibes de Castro, 1978*).

Las dataciones radiocarbónicas han situado este yacimiento entre 3020±35 BP y 3120±30 BP (*Esparza et al, 2012*).

El Cerro De La Cabeza (Ávila)

El yacimiento del Cerro de la Cabeza se sitúa en un promontorio granítico en la cara Sur del reborde Norte del Valle de Amblés (Ávila). F.J. Sanz dirigió la excavación, que surgió como consecuencia de la construcción de una carretera de circunvalación en Ávila en 1997. Allí hallaron una estratigrafía muy revuelta, con tres niveles arqueológicos en los que se mezclaban materiales de cinco momentos consecutivos desde el final del Neolítico hasta el Hierro I, con intensa utilización. Lo más llamativo fue la documentación de 385 estructuras negativas (*Fabián-García y Blanco-González, 2012*). En 5 de esas fosas aparecieron enterramientos, 4 de ellos de época calcolítica y uno correspondiente al Bronce Final – Hierro I.

El primero de los enterramientos Calcolíticos era colectivo, conteniendo 6 individuos enterrados de manera simultánea en una fosa ligeramente ovalada (1,83 x 2,05 m) excavada en roca granítica. Entre los restos quedaban algunos fragmentos cerámicos representativos de la época en que se produjo el enterramiento, pero ningún recipiente completo, todos con características propias del Calcolítico de la zona. En cuanto a los restos humanos, se trataba de 5 varones de edades entre los 15 y los 35 años y una mujer con entre 18 y 20 años de edad. 4 de los varones mostraban signos de haber muerto por causas violentas, con flechas clavadas en el cuerpo de 2 de los inhumados. El segundo enterramiento era individual, constando de un individuo masculino de entre 40 y 45 años, aunque con la presencia de una falange proximal del dedo II de la mano derecha correspondiente a otro individuo (*Fabián-García y Blanco-González, 2012*). El tercer enterramiento, consiste en una fosa prácticamente circular, que contenía un enterramiento individual en el que se inhumó un individuo masculino de 15 o 16 años en una postura forzada y violenta, con el tronco en decúbito supino orientado de Este a Oeste (cabeza al Este) y la piernas flexionadas y paralelas en una posición lateral, indicando un evidente forzamiento del cadáver. El cuarto enterramiento también era una



fosa circular, que contenía un cadáver masculino de unos 40-45 años, cubierto por piedras directamente colocadas sobre el cuerpo. Presentaba lesiones traumáticas en los pies, además de una fractura de costilla y artrosis en cintura escapular y manos; al lado izquierdo del cadáver, apareció el cuerpo prácticamente completo de un perro. Las dataciones radiocarbónicas de estos restos son de entre 4.860-4.430 BP el más antiguo a 4.460-4.050 BP el más reciente (*Fabián-García y Blanco-González, 2012).*

Hasta aquí nos hemos centrado en los hallazgos correspondientes al final del Calcolítico, de los cuales no ha sido posible recopilar muestras para el estudio genético, pero dentro del yacimiento del Cerro de la Cabeza, una de las fosas encontradas se correspondía con un periodo más avanzado, hacia el Final del Bronce comienzo del Hierro I. Esta última fosa era prácticamente circular (1,41 x 1,31 m) con una profundidad de 1,02 m. las paredes eran verticales, y el fondo plano. Entre las cerámicas halladas hay que destacar dos pequeños fragmentos, uno con decoración incisa de tipo campaniforme y la otra impresa con técnica de boquique, claramente asociable a la cultura de Cogotas I. El resto de los fragmentos eran lisos e informes. Las inhumaciones se encontraban en el fondo de la fosa, y consistían en 2 individuos que ocupaban el centro del fondo de la fosa, en contacto el uno con el otro, pero con orientaciones opuestas. El primer inhumado, varón adolescente (*Robledo et al. 1999*) se orientaba de este a oeste, el otro, una mujer adulta joven, se disponía en sentido contrario. El primero se hallaba en decúbito supino con las piernas flexionadas. La mujer fue dispuesta en decúbito prono, con el brazo izquierdo flexionado a la altura del pecho, en ángulo recto debajo del tronco (*Fabián-García y Blanco-González, 2012*). El enterramiento tuvo una secuencia de al menos dos momentos: uno para cada individuo inhumado. Se enterró primero al individuo masculino y posteriormente al femenino, pero es difícil saber cuánto tiempo medió entre una y otra deposición, aunque parece probable que no fuese demasiado; ya que se observa una clara intención de enterrar juntos a los dos individuos (*Fabián-García y Blanco-González, 2012*). La falta de algunos miembros apunta a la posibilidad de que los cuerpos podrían haber estado expuestos en alguna parte antes de ser definitivamente inhumados en la fosa. Con el peroné derecho del individuo femenino se llevó a cabo la datación C-14, obteniendo una datación de 2.160 ± 50 BP, calibración 2.345 a 2.045 BP, que no se correspondía con el material del relleno del hoyo. Pero la reciente datación AMS de sendas muestras de los dos esqueletos (3095 ± 30 y 3050 ± 35 BP) vienen a corroborar la pertenencia del joven y la mujer a Cogotas I (*Esparza, com. pers.).*

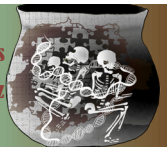
Canto Blanco (Sahagún, León)

El yacimiento de Canto Blanco se encuentra a medio camino entre los términos municipales de Sahagún y Calzada del Coto (ambos leoneses). Concretamente se ubica en un terreno levemente elvado sobre la vega de la margen derecha del río Cea y fue descubierto en el año 1994. Pero no se estudiaría más a fondo hasta el año 2007, debido a la construcción de un subtramo de Alta Velocidad. En esta ocasión, se documentó una falange humana entre un conjunto de vestigios conformados por piedras calizas, rejas curvas y ladrillos macizos (*Strato, 2008*) (*Martín-Carbajo et al, 2012).* Se encontraron vestigios de

diferentes periodos, pero los primeros indicios de una ocupación prehistórica en este espacio no fue posible hasta la ejecución de la fase de control arqueológico del desbroce de la zona afectada del enclave, en el año 2009, cuando se comprobó la aparición de distintos materiales cerámicos con decoraciones típicas de la Edad del Bronce. Además también se recuperó un puñal de lengüeta de cobre arsenicazo, cuya adscripción cronológica se remontaría al Campaniforme, señalando la posibilidad de la existencia de restos de este periodo. El asentamiento prehistórico se extiende por los dos sectores del yacimiento, siendo el periodo mejor representado numéricamente, con 122 hoyos, pero solamente 43 de estos hoyos pueden asignarse con seguridad a este periodo, gracias a los materiales recuperados. Casi todos los hoyos que fueron adscritos a Cogotas I, parecían haberse realizado para el almacenamiento de alimentos (silos), aunque en su gran mayoría han llegado hasta nuestros días amortizados como contenedores de las basuras generadas por la vida cotidiana de los habitantes del poblado prehistórico (*Martín Carbajo et al, 2012*). De este conjunto de hoyos, la fosa 79-N es el centro de interés de esta tesis, ya que su exhumación ha deparado el esqueleto parcial de un varón adulto, de entre 25 y 35 años, datado en 3123 ±30 B.P. Las características del hoyo parecen indicar que en un principio pudo haberse utilizado como silo de almacenamiento. Además, al constatarse sólo una porción del cuerpo (parte del cráneo, del tórax y de las extremidades superiores), con desconexión anatómica, podría interpretarse que su último uso fue el de basurero, recibiendo los restos humanos el mismo tratamiento que las demás basuras depositadas en el hoyo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que es frecuente la observación de restos humanos parciales y en desconexión anatómica cubiertos por vertidos en las fosas del Bronce final, lo cual habla a favor de un ritual propio de inhumación (*Martín Carbajo et al, 2012; Strato, S.L., 2009b*).

2.1.5 El Bronce Final: Los Comienzos De La Cultura Del Soto De Medinilla

Casi coincidiendo con el cambio del II milenio al I AC parece haberse producido un cambio cultural sobre el que hay todavía bastante controversia, habiéndose señalado la posible incidencia del cambio climático operado en Europa con el periodo más templado y húmedo denominado Subatlántico, y también se ha apuntado la importancia de los influjos externos, algunos del área atlántica y otros del Suroeste peninsular, pero también se han subrayado ciertos rasgos de continuidad con Cogotas I. Sea como fuere, lo cierto es que tras la cultura de Cogotas I se registrará en la Submeseta Norte, especialmente en las zonas sedimentarias, una importante cultura denominada del Soto de Medinilla, por el poblado vallisoletano donde las excavaciones permitieron su reconocimiento. Esta cultura ha sido definida cada



vez con más precisión, habiéndose reconocido en su desarrollo dos fases, llamadas Soto Formativo y Soto Pleno. La mejor conocida es la última, que tuvo lugar entre aprox. 800 y 400 AC, y se corresponde ya con la Primera Edad del Hierro regional, pues se da en esta fase la incorporación, todavía bastante restringida, de ese metal a la cultura material. En cambio, todavía no se ha avanzado mucho en la caracterización del Soto Formativo, en buena parte, porque sus restos se hallan bajo los del Soto Pleno, lo que dificulta las excavaciones (*Delibes de Castro et al, 1995*).

Si el Soto Pleno es conocido especialmente por sus poblados con una notable "arquitectura de barro" (cabañas, e incluso murallas, hechas de adobe y tapial), el Soto Formativo tenía cabañas de materiales vegetales. Si el más reciente conoce algunos objetos de hierro, el Formativo presenta una metalurgia característica del Bronce Final. Por estos rasgos metalúrgicos, y por las dataciones radiocarbónicas, el Soto Formativo es considerado como el epílogo de la larga secuencia de la Edad del Bronce Regional. Este Bronce Final posterior a Cogotas I se fecharía aproximadamente entre 1100 y 800 AC (*Delibes de Castro y Herran Martínez, 2007; Delibes de Castor y Romero, 2011*).

2.1.5.1 Yacimientos Seleccionados Del Soto Formativo

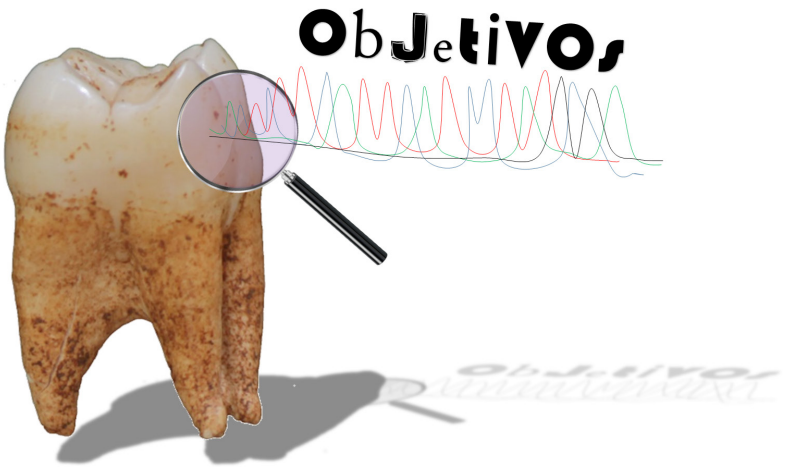
Respecto al mundo funerario del Soto hay un enorme desconocimiento, pues no se conoce prácticamente ningún enterramiento a no ser los de unos pocos individuos infantiles inhumados en el interior de los poblados. Por eso, en el proyecto en el que se encuadra esta tesis se consideró muy importante incluir una mandíbula, la de San Pelayo (Martinamor, Salamanca), hallada en un contexto del Soto Formativo, para la que se ha sugerido que se correspondería a una sepultura tumular prácticamente destruida por el desarrollo de poblado. Al tratarse del único individuo adulto disponible para esta cultura, parecía necesario analizarlo desde el punto de vista paleogenético, con vistas a enriquecer la discusión sobre las posibles relaciones entre Cogotas I y el Soto.

El Cerro De San Pelayo (Salamanca)

Este yacimiento es conocido en la bibliografía por la aparición de un cuenco pintado, entre otros materiales publicados por su excavador. El Cerro de San Pelayo en la provincia de Salamanca, se sitúa en el margen occidental de la llanura aluvial del Tormes, se trata de un "monte-isla" de una altura total de 958 m, en cuya cumbre se encuentra este yacimiento (*López-Jiménez y Benet, 2004*).

Dentro de la cata B5 Nivel VII se halló un conjunto de numerosos restos óseos animales, entre los cuales se identificaron algunos restos humanos muy fragmentados y mal conservados. Entre los restos humanos hallados destaca una mandíbula. Se trata de la parte derecha de una mandíbula fracturada a la altura del

mentón y tras el segundo molar, lo que ha impedido una posible identificación del sexo o una más acertada aproximación de la edad del individuo, aunque podemos asumir que se trata de un adulto, que por la abrasión dental del molar conservado parece que podría situarse entre los 35 y los 45 años. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el desgaste dental no es un buen método para estimar la edad, ya que puede variar en función de la dieta, especialmente en las sociedades agrícolas consumidoras de harinas. Se encontraron algunos fragmentos óseos más, pero muy insuficientes para hacer una reconstrucción del esqueleto (*López-Jiménez y Benet, 2004*). La datación radiocarbónica, y la cerámica hallada, sitúan este yacimiento a finales de la Edad del Bronce. Concretamente la datación radiocarbónica a partir de carbón del mismo nivel en el que se encontraba el individuo es de 2715 ± 30 BP.



Si no sabes donde vas, acabarás en otra parte

Laurence J. Peter

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

3 OBJETIVOS

De acuerdo con lo expuesto en la introducción anterior, en cuanto al conocimiento de la problemática arqueológica e histórica de los periodos que conciernen a este trabajo, así como las capacidades de las técnicas del ADN antiguo aquí empleadas; se exponen a continuación los objetivos planteados en esta tesis. El objetivo primordial de la misma, tal como apunta el título, es la caracterización genética de las poblaciones de las Edades del Cobre y del Bronce en la Submeseta Norte de la Península Ibérica y, tomando este objetivo como eje central, a continuación se explican desglosados cuatro grandes bloques de objetivos menores.

3.1 OBJETIVOS METODOLÓGICOS

3.1.1 Objetivo 1:

Evaluar la obtención de ADN a partir de muestras antiguas en función de distintas características de la muestra y el individuo: edad del individuo, tipo de tejido (óseo o dental), antigüedad, coloración de la muestra, presencia de consolidantes y/o tintas, etc. Así como en función de la técnica empleada: Amplificación de ADN mitocondrial, amplificación de marcadores autosómicos o marcadores para la determinación del sexo.

3.1.2 Objetivo 2:

Comparar la eficiencia de dos metodologías diferentes para la extracción de ADN antiguo y su adecuación para el estudio de muestras críticas de origen arqueológico o forense. Del mismo modo se evaluará la eficiencia de un protocolo de extracción no destructivo.

3.1.1 Objetivo 3:

Definir un criterio específico para el establecimiento de perfiles consenso sólidos de STRs autosómicos a partir de perfiles parciales obtenidos tras el análisis de muestras antiguas o críticas.

3.1.4 Objetivo 4:

Evaluación de los diferentes métodos para la determinación del sexo molecular de los individuos.

3.2 OBJETIVOS DE ÍNDOLE POBLACIONAL - CULTURAL

3.2.1 Objetivo 5:

Estimar la continuidad/discontinuidad genética entre los pobladores de la Submeseta norte de la Península Ibérica a lo largo de los periodos estudiados; desde el Precampaniforme (4000 B.P), hasta el final de la Edad del Bronce (2700 B.P).

3.2.2 Objetivo 6:

Establecer si las variaciones en el ritual funerario y la cultura material observadas a lo largo de los periodos estudiados consisten en simples cambios culturales que no implican un cambio en la población real de la región; o si por el contrario se detecta la llegada de contingentes humanos que contribuyan a tales cambios.

3.2.3 Objetivo 7:

Determinar si la transmisión de la cultura, especialmente en cuanto a la cerámica, sigue un patrón femenino. Teniendo en cuenta que las mujeres transmiten su ADN mitocondrial, los cambios en los patrones de trabajo de la cerámica podrían reflejar cambios en la población femenina.

3.2.4 Objetivo 8:

Valorar en función de los resultados obtenidos dónde se sitúan con mayor probabilidad los orígenes de las culturas Campaniforme y Cogotas I.

3.3 OBJETIVOS RELACIONADOS CON EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES DE PARENTESCO

3.3.1 Objetivo 9:

Verificar las hipótesis de parentesco formuladas a partir de otras disciplinas (arqueología y antropología), mediante el análisis genético de marcadores nucleares STR en los distintos conjuntos de enterramientos colectivos.

3.3.2 Objetivo 10:

Establecer la existencia (o no) de diferentes patrones de enterramiento a lo largo de los periodos crono-culturales estudiados; en función de la observación o no de lazos familiares cercanos en enterramientos colectivos o múltiples.

3.4 OBJETIVOS RELACIONADOS CON LA DETERMINACIÓN DEL SEXO

3.4.1 Objetivo 11:

Determinación del sexo molecular de los individuos, para poder establecer la estructura de la población en lo referido al sexo.

3.4.2 Objetivo 12:

Valorar la existencia de diferencias culturales (posición del cuerpo en el enterramiento, diferenciación en la cultura material, etc.) en función del sexo del individuo.

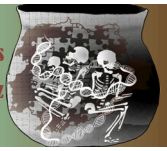
Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

Caminando en línea recta, uno no puede llegar muy lejos.

(El principito)

Antoine de Saint- Exupéry

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional



4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Selección Muestral Y Registo Fotográfico

En el conjunto de muestras de esta tesis, la gran mayoría fueron seleccionadas por el bioarqueólogo del Departamento de Ciencias Históricas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, responsable de los estudios antropológicos del proyecto (HAR-10105-2009), en colaboración con el equipo del Departamento de Prehistoria, Historia Antigua y Arqueología de la Facultad de Geografía e Historia de la Universidad de Salamanca. Únicamente en el caso de las muestras correspondientes a los yacimientos de Aldeagordillo, El Tomillar, Santioste y Rivas-Vaciamadrid, fue en los únicos en los que la selección muestral fue llevada a cabo directamente por el investigador que suscribe esta tesis. Una vez seleccionadas, las muestras se enviaron al Laboratorio de Genética de Poblaciones y Genética Forense del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, dónde se llevaría a cabo el procesamiento experimental para su análisis genético.

La distribución del muestreo se extiende sobre toda la Submeseta Norte de la Península Ibérica, concretamente dentro de la Comunidad Autónoma de Castilla y León y en un único caso (Yacimiento de Terrazas del Manzanares, en Rivas Vaciamadrid) en la Comunidad de Madrid.

Se han muestreado 28 yacimientos de 4 periodos temporales diferentes (Precampaniforme, Campaniforme, Cultura Protocogotas I y Cultura Cogotas I) que se extienden desde finales del Calcolítico (Precampaniforme y Campaniforme) hasta plena Edad del Bronce (Cultura Cogotas I). Además se seleccionaron dos muestras correspondientes a un único individuo del Soto formativo (Bronce Final). Se tomó un total de 208 muestras pertenecientes a 94 individuos. Tratando de seleccionar al menos 2 muestras diferentes por cada individuo, siempre que fue posible. En la Figura 1 observamos la distribución de los yacimientos.

En la *Figura 2* se muestra la localización de los yacimientos estudiados en la presente tesis, aparecen en color verde los yacimientos correspondientes al periodo Precampaniforme (Los Cercados, Trascabañas, El Tomillar y Areneros); en azul turquesa claro se representan los yacimientos Campaniformes (Tablada de Rudrón, Santa Cruz de Cabezón, Los Retajones, El Mirador, Pajares de adaja, Rivas Vaciamadrid, Aldeagordillo y Perro Alto); en azul los yacimientos correspondientes al Bronce Antiguo (Santioste y Cueva de la Revilla), en violeta podemos localizar los yacimientos Protocototas I (Carrelasvegas, La Huelga, Los Rompizales, El Cerro, Fuente de la Mora, El Cementerio, Los Tolmos, Tordillos, El Juncal, Cañamonas y de nuevo se incorpora el yacimiento de la Cueva de la Revilla, por utilizarse como lugar de enterramiento a lo largo de un extenso periodo de tiempo, que va desde el Bronce Antiguo hasta este periodo Protocogotas

I); en rosa se representan los yacimientos pertenecientes a Cogotas I (Cantoblanco, La Requejada y el Cerro de la Cabeza), finalmente en negro se encuentra indicado el único yacimiento del Soto Formativo (El Cerro de San Pelayo).

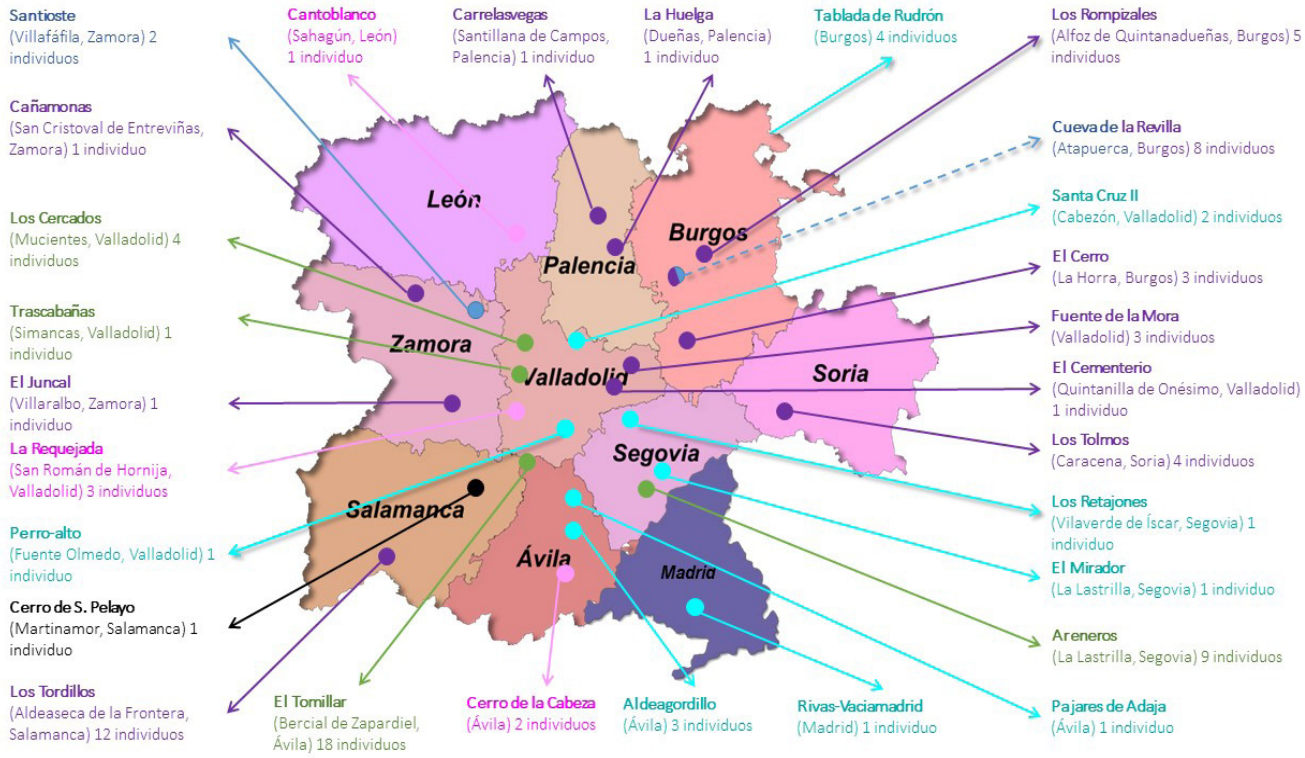


Figura 2. Localización geográfica de los yacimientos estudiados.

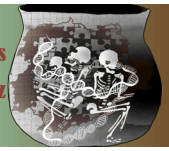
4.1.1.1 Características De Los Individuos Y Muestras Seleccionadas

4.1.1.1.1 Calcolítico

Dentro del periodo Calcolítico se han seleccionado muestras correspondientes a individuos que vivieron durante el Precampaniforme y el Campaniforme. A continuación se enuncian las características principales de los mismos, así como de las muestras seleccionadas.

4.1.1.1.1.1 Yacimientos Del Precampaniforme Estudiados

Perteneciente a este periodo hemos seleccionado muestras de 4 yacimientos: El Tomillar, Los Areneros, Los Cercados y Trascabañas (*Figura 1*).



El Tomillar

En este yacimiento localizado en Bercial de Zapardiel (Ávila), se ha llevado a cabo el muestreo sobre restos osteológicos humanos localizados en 2 Fosas, la fosa número 13 y la fosa número 1. La selección muestral fue llevada a cabo por quien suscribe esta tesis.

Los individuos pertenecientes a la Fosa número 13, han sido denominados con la nomenclatura ATOM. En dicha fosa se encontraron restos óseos correspondientes a 8 individuos distintos, 3 adultos y 5 infantiles. El análisis antropológico de estos restos, fue llevado a cabo hacia el año 2000 por Beatriz Robledo y Gonzálo J. Trancho (*Robledo y Trancho, 2001*). El estudio antropológico de los restos de la Fosa 13, corroboró la presencia de 8 individuos; los 2 primeros (1ATOM y 2ATOM) fueron determinados como 2 mujeres utilizando parámetros cualitativos como la morfología del cráneo, la mandíbula y el coxal (*Brothwell, 1987; Ubelaker, 1989*). La mujer 1ATOM cuenta con unos 45 años, siendo la segunda mujer (2ATOM) no mayor de 25 años. Ambas mujeres se localizaban en posición flexionada de cúbito lateral derecho, y sobre ellas dispusieron los 4 niños más pequeños (de entre 1 y 2 meses de edad). En cuanto al tercer individuo, 3ATOM, se trata de un varón de no más de 35 años (edad estimada mediante las técnicas antropológicas tradicionales (*Suchey et al., 1988 y Lovejoy et al., 2005*) (*Robledo y Trancho, 2001)*. Este individuo se encontró con las piernas flexionadas en posición lateral y el resto del cuerpo de cúbito prono con los brazos extendidos, sobre su cadera se depositó al niño de mayor edad (7ATOM). En cuanto a los individuos infantiles, se estimó su edad mediante las tablas de *Fazekas y Kosa (1978),* siendo el de mayor edad el individuo 7ATOM, con un máximo de 6 meses, el resto no superaban los 2 meses de edad; aunque aseguran que en todos los casos habían superado el parto *(Robledo y Trancho, 2001*). Esta Fosa 13 tiene una gran importancia, precisamente por la elevada prevalencia de individuos infantiles.

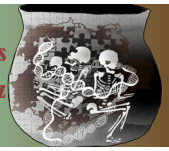
La segunda fosa que hemos analizado del yacimiento de El Tomillar, es la Fosa 1, a cuyos individuos hemos nombrado con las siglas BTOM. En la Fosa 1 encontramos un enterramiento colectivo no simultáneo (*Etxeberría, 2001*).

El análisis antropológico de la Fosa 1 fue llevado a cabo por Francisco Etxeberría, que determinó la presencia de un número mínimo de 11 individuos, de los que 4 son adultos, uno es juvenil y 6 son infantiles. De estos últimos, 2 son menores de 2 años, uno es de 6, otros 2 de 8 y uno más de 10 años (*Etxeberría-Gabilondo, 2001*). Para el análisis genético, hemos seleccionado muestras de 9 de los individuos, concretamente de 2 adultos jóvenes varones (Individuos 1BTOM y 3BTOM), un varón adulto maduro (2BTOM) y un individuo infantil (4BTOM). Siendo estos 4 individuos los mejor conservados dentro de la tumba. El resto de muestras analizadas corresponden a un conjunto de restos sueltos de diferente entidad, concretamente 2 cráneos y una mandíbula y otros restos esqueléticos que se especifican en la *Tabla 1.* En la tumba 1 el individuo 1BTOM fue el primero en aparecer, por lo que debe tratarse del último de los enterramientos realizados. Se trata de un individuo masculino de entre 20 y 40 años; su esqueleto está completo, a excepción de las extremidades inferiores. El resto se conservaba en conexión anatómica en posición decúbito supino con

la pierna derecha semiextendida y la izquierda flexionada. El individuo 2BTOM apareció por debajo de 1BTOM, se trata de un esqueleto prácticamente completo de un varón de entre 40 y 60 años; se situaba en decúbito prono, con los brazos extendidos y cruzados. 3BTOM sin embargo no presentaba más del 50% del esqueleto, tan solo los hombros completos y los brazos plegados simétricamente sobre el pecho del individuo se conservan, además de una tibia y su peroné unidos a la zona distal del fémur correspondiente; no presentaba restos de columna vertebral, aunque sí de algunas costillas; se identificó como un varón de entre 20 y 40 años. Finalmente el individuo 4BTOM estaba cubierto en buena parte por huesos del 3BTOM de un modo claramente intencionado, lo que hacía pensar en un posible parentesco; de este cuarto individuo se conservó el cráneo completo con las 3 primeras vértebras y los 2 brazos además de la escápula y clavícula de uno de ellos. Por otro lado estaba el coxal, 2 fémures y la tibia y peroné izquierdos, todos ellos en decúbito prono, con los fémures cruzados hacia sus zonas centrales. Este individuo 4BTOM fue identificado como un varón infantil, con una edad, según F. Etxeberría, en torno a los 8 años de edad (*Etxeberría, 2001*). Además de estos 4 individuos más o menos conexos, se hallaron un conjunto de restos sueltos de distinta entidad que se corresponden con los individuos que en el laboratorio de genética fueron denominados: 5BTOM, 6BTOM, 7BTOM, 8BTOM y 9BTOM.

En la *Tabla 4* podemos observar las características de las muestras seleccionadas para el análisis de ADN de cada uno de los individuos del Yacimiento Campaniforme de El Tomillar; y sus respectivas fotografías en la *Figura 3*.

INDV	MUESTRA	DATACIÓN BP	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1ATOM	1ATOM1	3960±40	Cráneo (esfenoides)	Fragmento óseo. Coloración clara. Suciedad adherida. Alta cantidad de hueso esponjoso.
1ATOM	1ATOM2	3960±40	Cráneo (reborde del foramen magnum)	La pieza se fragmentó durante su recogida. Color claro. Suciedad. Aspecto relativamente bueno.
2ATOM	2ATOM1	3960±40	calota craneal. Parietal.	Color claro. Suciedad adherida. Pieza rota y siglada con rotulador permanente.
2ATOM	2ATOM2	3960±40	calota craneal. Parietal.	Color claro. Suciedad adherida. Pieza rota y siglada con rotulador permanente.
3ATOM	3ATOM1	3960±40	3ª falante	Pieza completa. Sin fisuras ni roturas. Color claro, con suciedad adherida. Siglada con rotulador permanente.
3ATOM	3ATOM2	3960±40	calota craneal. Parietal.	Pieza rota. Color claro, con suciedad adherida. Pieza siglada con rotulador permanente.
4ATOM	4ATOM1	3960±40	húmero derecho	Pieza completa. Ligeramente rasgado en el extremo distal, pero bien conservado. Suciedad adherida y siglada con rotulador permanente.
4ATOM	4ATOM2	3960±40	costilla izquierda	Pieza completa, ligeramente rasgada en un extremo, pero bien conservada. Color claro.
5ATOM	5ATOM1	3960±40	húmero derecho	Pieza completa. Extremos epifisarios sin fusionar, con exposición de hueso esponjoso. Suciedad adherida. La pieza está siglada con rotulador permanente.
5ATOM	5ATOM2	3960±40	calota craneal	Hueso fragmentado. Lámina ósea muy fina. Suciedad adherida y hueso siglado con rotulador permanente.
6ATOM	6ATOM1	3960±40	húmero izquierdo	Pieza completa. Expuesto hueso esponjoso en los extremos. Presenta consolidantes. Algo de suciedad y está siglada con rotulador permanente.
6ATOM	6ATOM2	3960±40	calota craneal	Fragmento de calota craneal,muy fina (recién nacido o feto a término). Coloración clara. Bastante limpio.



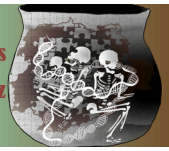
7ATOM	7ATOM1	3960±40	húmero derecho	Epífisis fragmentadas. Parece parcialmente hueco y presenta una grieta a lo largo de toda su longitud. Color beige claro, con suciedad adherida. Pieza siglada con rotulador permanente.
7ATOM	7ATOM2	3960±40	calota craneal	Siglado con rotulador permanente.
8ATOM	8ATOM1	3960±40	húmero derecho	Pieza completa, sin fisuras ni roturas. Algo de suciedad adherida. Siglado con rotulador permanente.
8ATOM	8ATOM2	3960±40	clavícula izquierda	Pieza completa, algo erosionada en los extremos. Con suciedad adherida. Siglado con lápiz.
1BTOM	1BTOM1	3780 ± 100	peroné izquierdo	Fragmento de la epífisis distal del peroné izquierdo. Roto en su extremo distal, con exposición del hueso esponjoso. Color claro, con suciedad adherida. Presenta consolidantes.
1BTOM	1BTOM2	3780 ± 100	radio derecho	Bastante fragmentado en uno de los extremos. Color claro.
2BTOM	2BTOM1	3780 ± 100	tibia derecha	Color claro, bastante limpio. Sin consolidantes.
2BTOM	2BTOM2	3780 ± 100	radio izquierdo	Erosionado en la epífisis, con exposición de hueso esponjoso. Con consolidantes.
3BTOM	3BTOM1	3780 ± 100	diáfisis radio	Color beige oscuro, sin suciedad adherida.
3BTOM	3BTOM2	3780 ± 100	diáfisis peroné	Presenta consolidantes en el orificio medular. Color claro y con poca suciedad.
4BTOM	4BTOM1	3780 ± 100	primer incisivo inferior derecho	Pieza completa sin fisuras ni caries, pero ligeramente rasgado en la parte apical de la raíz. Presenta desgaste en la corona, exponiendo la dentina. Color claro, corona blanca y raíz beige
4BTOM	4BTOM2	3780 ± 100	canino inferior izquierdo	Raíz completamente rota, fragmentada en 2 partes. Desgaste avanzado de la corona con exposición de la dentina. Corona bastante sucia y raíz clara y limpia.
5BTOM	5BTOM1	3780 ± 100	canino inferior derecho	Pieza completa, ligeramente rota por la raíz. Sin caries. Minúscula fisura en la raíz. Color claro, corona blanca y raíz beige. Algo de suciedad adherida.
5BTOM	5BTOM2	3780 ± 100	primer molar inferior derecho	Raíz se rompió al extraer la pieza. Bien conservado, salvo la raíz, el resto de la pieza es completa, sin roturas, fisuras ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Sin consolidantes.
6BTOM	6BTOM1	3780 ± 100	primer incisivo superior derecho	Pieza completa pero con una fisura que corta longitudinalmente toda la corona. Sin caries ni roturas. Color claro, corona blanca y raíz beige claro. Sin consolidantes.
6BTOM	6BTOM2	3780 ± 100	fragmento de calota craneal	Color claro, con algo de suciedad adherida. No parece presentar consolidantes.
7BTOM	7BTOM1	3780 ± 100	fragmento de calota craneal	Coloración clara pero algo sucio. No parece presentar consolidantes.
7BTOM	7BTOM2	3780 ± 100	fragmento de calota craneal	Color claro, con algo de suciedad en su cara interna. Presenta algo de consolidante adherido en uno de sus bordes.
8BTOM	8BTOM1	3780 ± 100	tercer molar	Pieza completa, sin roturas, fisuras ni caries. Muy adecuada. Color claro, corona blanca y raíz beige claro. Sin suciedad, muy limpio.
8BTOM	8BTOM2	3780 ± 100	premolar	Pieza completa, pero con una fisuras que parte la corona en 2 mitades. Coloración clara, blanca en la corona y beige en la raíz. Muy limpio, aunque con alguna adherencia. No parece presentar consolidantes.
9BTOM	9BTOM1	3780 ± 100	calota craneal	Cortical relativamente fina. Con bastante suciedad adherida. No parece presentar consolidantes.
9BTOM	9BTOM2	3780 ± 100	calota craneal	Consolidantes adheridos a los bordes. Color adecuado con algo de suciedad.

***Tabla 1**. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Tomillar. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.*

***Figura 3**. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Tomillar.*

Los Areneros

Dentro de este yacimiento segoviano (localizado en La Lastrilla) hemos seleccionado muestras correspondientes a 9 individuos inhumados en un mismo hoyo colectivo. Los restos esqueléticos se caracterizaban por la ausencia de conexiones anatómicas, formando un conjunto de huesos entremezclados, mayoritariamente huesos largos y cráneos. En la *Tabla 2* se recoge la nomenclatura dada a cada individuo así como a cada una de sus muestras seleccionadas y sus características y datación. Del mismo modo, es posible observar las características de las muestras en las fotografías de la *Figura 4*.



INDV	MUESTR.	DATACIÓN	TIPO MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1ARE	1ARE1	4240 ± 35	canino inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas, ni caries. Corona blanca y raíz de beige claro a oscuro. Suciedad adherida.
1ARE	1ARE2	4240 ± 35	segundo molar inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries, raíz erosionada. Corona blanca y raíz amarilla-beige. Tiene suciedad adherida.
2ARE	2ARE1	4240 ± 35	primer premolar inferior derecho	Pieza completa, sin fisuras roturas ni caries. Color claro en general, blanco en la corona y beige en raíz.
2ARE	2ARE2	4240 ± 35	tercer molar inferior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Corona blanca y raíz beige oscura. Suciedad adherida.
5ARE	5ARE1	4240 ± 35	primer molar inferior izquierdo	Pieza rota en los extremos de la raíz (quizá al extraerlo, ya que presenta restos de hueso anclados a la raíz). Coloración clara, blanca en la corona y beige claro en la raíz. Avanzado desgaste de la corona, con exposición de la dentina.
5ARE	5ARE2	4240 ± 35	segundo molar inferior izquierdo	Pieza con la raíz rota. Coloración clara en general, corona blanca y raíz beige. Algo de suciedad adherida.
6ARE	6ARE1	4240 ± 35	primer premolar inferior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Corona blanca y raíz beige claro. Suciedad adherida.
6ARE	6ARE2	4240 ± 35	tercer molar inferior derecho	Pieza rota por la raíz. Sin fisuras ni caries, pero con algo de desgaste en la corona. Corona blanca y raíz beige claro. Suciedad adherida.
7ARE	7ARE1	4240 ± 35	canino inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Corona con desgaste y exposición de la dentina. No se distingue color de la corona por la cantidad de suciedad adherida. Raíz beige.
7ARE	7ARE	4240 ± 35	tercer molar inferior derecho	Pieza rota por la raíz. Color claro. Suciedad adherida. Corona blanca, raíz beige. Inapropiada, muy rota la raíz.
8ARE	8ARE1	4240 ± 35	segundo incisivo superior izquierdo	Pieza completa, sin roturas, pero fisurada en el ápice de la raíz. Color claro en general, beige claro en toda su superficie (corona y raíz). Presenta desgaste con exposición de la dentina.
8ARE	8ARE2	4240 ± 35	primer premolar inferior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Aunque algo erosionada la raíz. Corona ligeramente oscura y raíz beige oscuro-anaranjado. Suciedad adherida en el cuello y la corona.
9ARE	9ARE1	4240 ± 35	canino inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries, aunque algo erosionada la raíz. Coloración muy clara, corona blanca y raíz beige muy claro. Buen aspecto general. Presenta desgaste con exposición de la dentina.
20ARE	20ARE1	4240 ± 35	segundo premolar superior derecho	La raíz no ha finalizado su crecimiento y se encuentra bastante abierta. Color claro, corona beige claro-blanco y raíz beige claro-amarillo.
20ARE	20ARE2	4240 ± 35	primer molar superior izquierdo	Pieza completa sin roturas, fisuras ni caries, pero las raíces no han finalizado su crecimiento. Restos de hueso adheridos y suciedad adherida. Color claro, raíz beige claro y corona blanca.
24ARE	24ARE1	4240 ± 35	segundo incisivo superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Ligero desgaste de la corona, muy leve. Color claro. Corona blanca y raíz beige claro.
24ARE	24ARE2	4240 ± 35	primer molar decidual superior derecho	Pieza completa, sin roturas, fisuras ni caries. Color claro. Corona blanca y raíz beige muy claro. Corona desgastada y con suciedad adherida.

Tabla 2. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Areneros. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

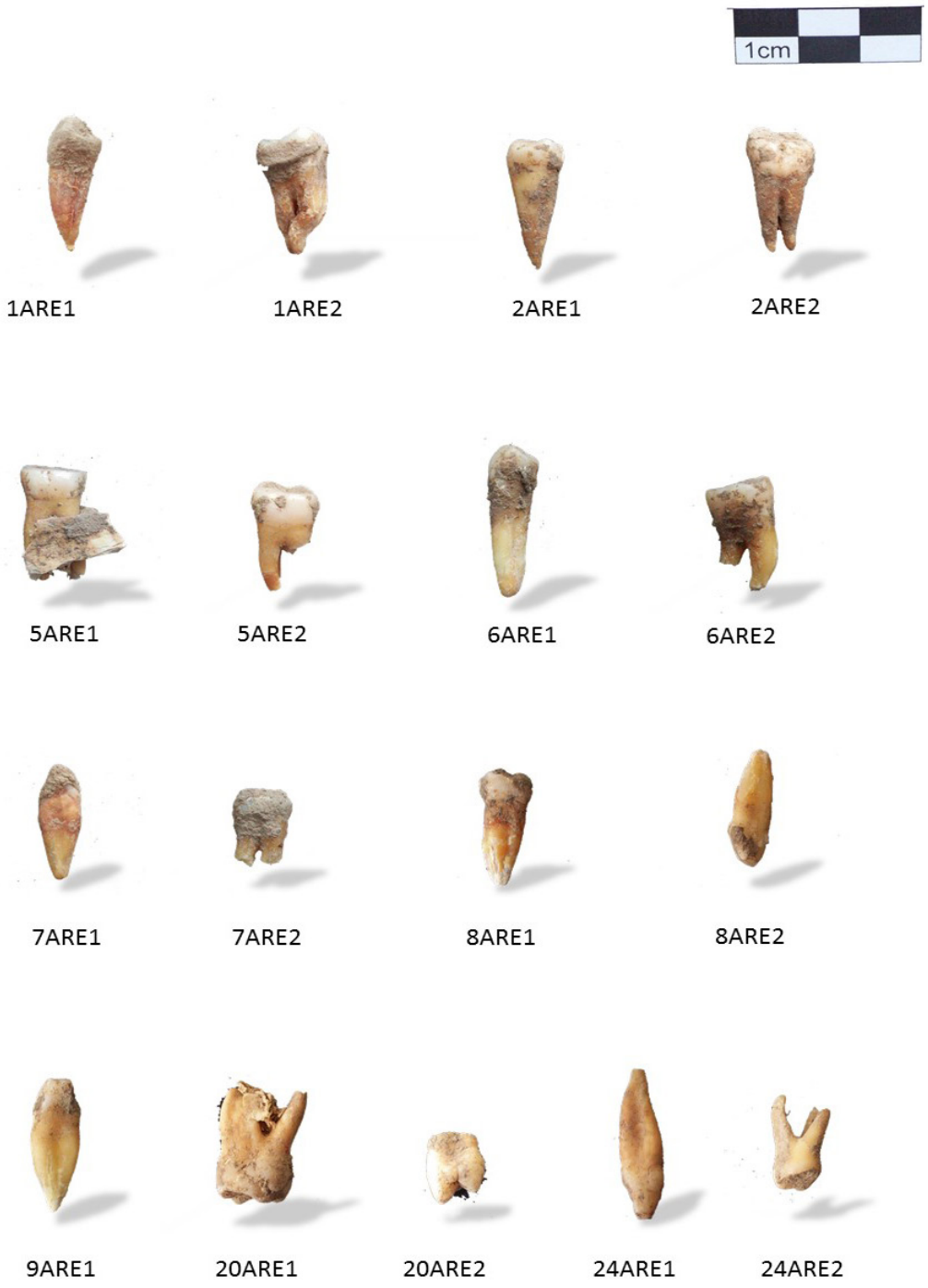


Figura 4. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Areneros.

Los Cercados

En este yacimiento, localizado en Mucientes (Valladolid), se excavaron 3 hoyos, pero nuestro interés se ha centrado en el denominado A2/AS; que constituye un singular ejemplo de fosa ritual calcolítica. Se trata de una hoya de perfil de cubeta, boca circular y unas dimensiones de 85 cm de diámetro por 80 cm de profundidad, subdividida hasta en 11 niveles diferentes. Fue en los niveles más profundos en los que se ha conservado inalterada la deposición calcolítica objeto de interés para esta tesis doctoral. El hallazgo más importante que ocupa este enterramiento lo constituyen 3 cráneos y un maxilar superior humanos (*García-Barrios, 2007*). Estos 3 cráneos y la maxila fueron enviados al Laboratorio de Genética Forense y Genética de Poblaciones del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Universidad Complutense de Madrid, dónde se llevó a cabo la selección y extracción de las muestras. Los 3 cráneos fueron denominados: 1CER, 2CER y 3CER; dando a la maxila la denominación 4CER. El estado de conservación de los restos osteológicos humanos hallados en la tumba deja bastante que desear, dado que eran incompletos y 2 de ellos (2CER y 3CER) presentaban un estado altamente fragmentario. Ninguno de los 3 (1CER, 2CER y 3CER) conservaba el esplecnocráneo. Excepto 1CER que conservaba el neurocráneo más o menos completo, los demás ejemplares aparecieron sustancialmente incompletos. Según los primeros estudios, se estimó que los restos correspondían a 3 individuos femeninos con edades oscilantes entre los 35 y los 50 años, y con traumatismos generados por impacto, localizados en la parte posterior del cráneo (*García-Barrios, 2007*) (*Figura 5*).

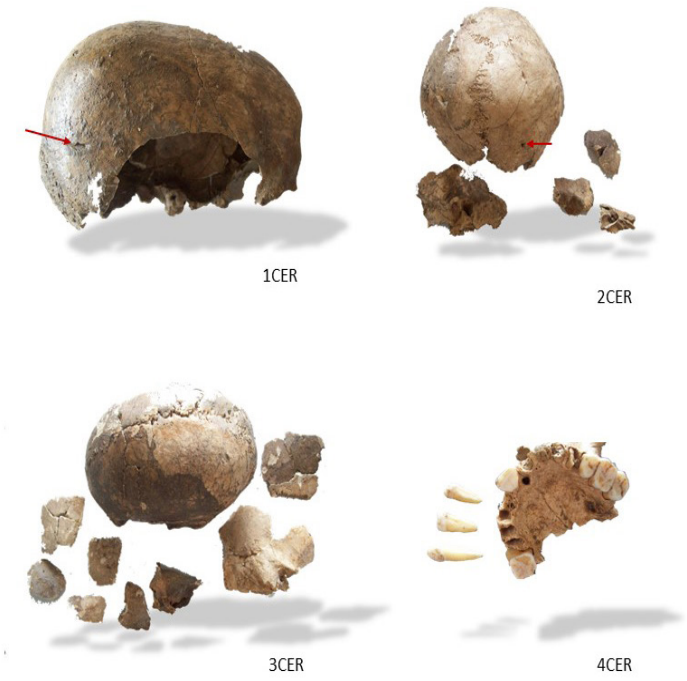


Figura 5. Restos óseos de los individuos del yacimiento de Los Cercados. Se indican con una flecha roja los traumas perimortem.

En la *Tabla 3* podemos observar las muestras seleccionadas para el estudio genético de los individuos exhumados en este yacimiento, además de otra información acerca de las características de cada muestra.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1CER	1CER1	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Coloración clara
1CER	1CER2	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Coloración clara
1CER	1CER3	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Coloración clara
2CER	2CER1	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Coloración clara
2CER	2CER2	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Coloración clara
2CER	2CER3	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Coloración clara
3CER	3CER1	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Suciedad adherida y coloración oscura
3CER	3CER2	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Suciedad adherida y coloración oscura
3CER	3CER3	3970 ± 60	Calota craneal	Fragmento de cráneo con consolidantes. Suciedad adherida y coloración oscura
4CER	4CER1	3970 ± 60	Canino superior derecho	Pieza dental completa, sin fisuras ni caries. Coloración clara y limpia
4CER	4CER2	3970 ± 60	Premolar 1 superior derecho	Pieza dental completa, sin fisuras ni caries. Coloración clara y limpia
4CER	4CER3	3970 ± 60	Premolar 2 superior derecho	Pieza dental completa, sin fisuras ni caries. Coloración clara y limpia

Tabla 3. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Cercados. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

En la *Figura 6* es posible ver las fotografías correspondientes a cada una de las muestras analizadas para el estudio de los restos esqueléticos.

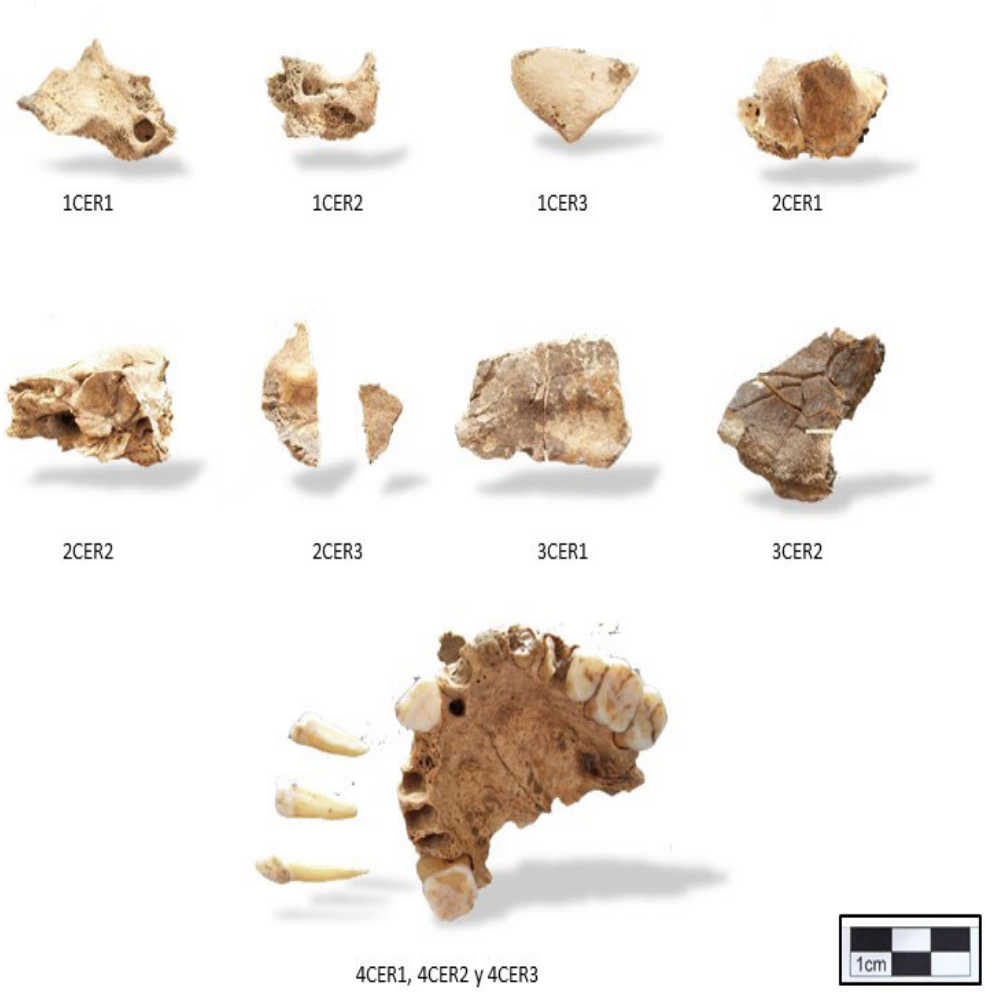


Figura 6. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Cercados

Trascabañas

En este yacimiento vallisoletano se hallaron los restos de una mujer de entre 35-45 años de edad (a la que denominamos 1TC). Las características fundamentales de las muestras seleccionadas a partir de sus restos se encuentran resumidas en la *Tabla 4*, así como las fotografías correspondientes a cada una de sus muestras, que son observables en la *Figura 7*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1TC	1TC1	4180 ± 35	Primer premolar superior derecho	Pieza completa, con coloración clara.
1TC	1TC2	4180 ± 35	primer incisivo superior derecho	Pieza completa, con coloración clara.
1TC	1TC3	4180 ± 35	segundo incisivo superior derecho	Pieza completa, presenta una fisura entre la corona y la raíz. Coloración clara.

Tabla 4. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Trascabañas. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 7. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Camino de Trascabañas

4.1.1.1.1.2 Yacimientos Del Campaniforme Estudiados

Los yacimientos Campaniformes estudiados en esta tesis, han sido: Aldeagordillo, El Mirador, Perro Alto, Santa Cruz II, Valhondo y Terrazas del Manzanares (Rivas Vaciamadrid) (Ver en color turquesa en la *Figura 1*).

Aldeagordillo

En el túmulo 1 de Aldeagordillo (Ávila) se exhumaron restos esqueléticos correspondientes a 4 sujetos, 3 de ellos infantiles y un adulto. La datación realizada con Carbono 14 sitúa la necrópolis en el 1.700 a.C. (*Fabián-García, 1973*). Las muestras correspondientes a este yacimiento fueron seleccionadas por el investigador que suscribe esta tesis en el museo regional de Ávila, dónde se encuentran los restos.

El individuo 1, al cual denominamos tras su llegada al laboratorio 1ALG, es un varón adulto. Las características masculinas se dejan ver en la prominencia del arco supraorbitario, con un borde romo y grueso, la apófisis

mastoidea izquierda (única que conserva) es grande y con una notable cresta supra mastoidea; además el desgaste de la superficie oclusal de la dentición determina unos 32-36 años de edad (*Fabián-García, 1973*). El segundo individuo, 2ALG, está constituido por un esqueleto bastante bien preservado, y pertenece a un sujeto infantil de unos 10 años ± 30 meses según el estado de erupción dentaria (*Ubelaker, 1978*). 3ALG, es el individuo que presenta el esqueleto más completo y mejor conservado, para él se han estimado unos 8 años ± 24 meses de edad según el estado de erupción dentaria (*Ubelaker, 1978*) y por la longitud diafisaria de la tibia (209mm) tendría unos 8 ó 9 años (*Stloukal e Hanakova, 1978*). La edad proporcionada por la longitud fibular es algo inferior, 6,5 – 7,5 años (*Moorrees et al., 1963*). Existe un cuarto individuo, del que no ha sido posible obtener muestra para llevar a cabo el estudio genético, debido al mal estado de preservación de los restos, del que solamente se ha conservado un fragmento de la concha del occipital y la eminencia mentoniana con los alveolos de los incisivos inferiores. Por estos pequeños indicios se sabe que los restos pertenecían a un sujeto infantil que no superaría los 6 años de edad (*Ubelaker, 1978*), pero no se puede obtener mucha más información al respecto. En la *Tabla 5* podemos observar las principales características de las muestras seleccionadas para el análisis de ADN. Además de las fotografías de las mismas muestras en la *Figura 8*.

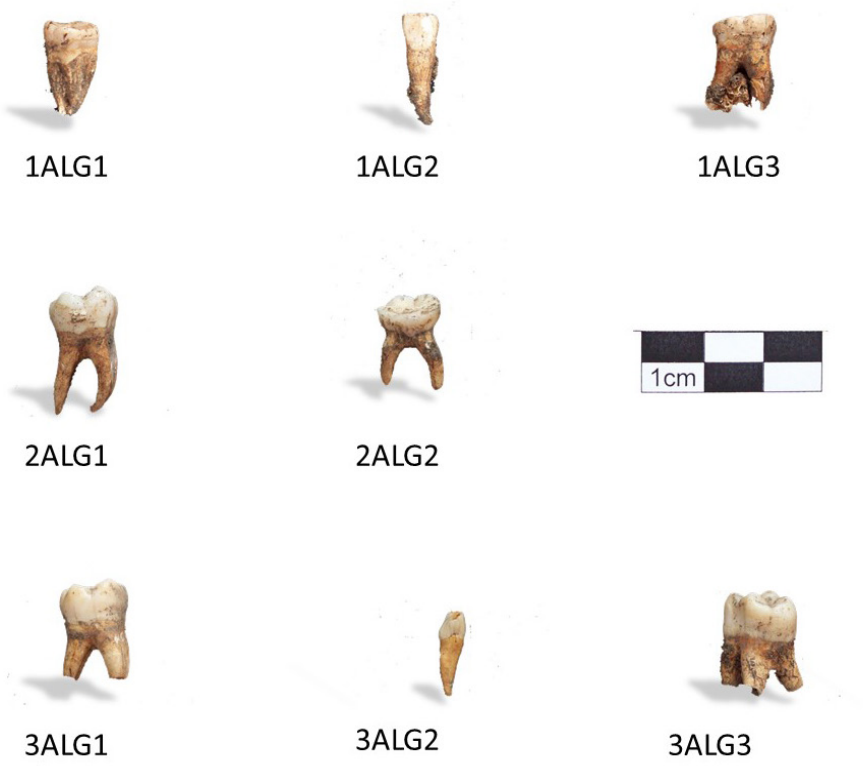


Figura 8. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Aldeagordillo.

INDIVID-UO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1ALG	1ALG1	-	Tercer molar superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras ni caries. Corona blanca y raíz beige, pero con suciedad oscura adherida.
1ALG	1ALG2	-	Segundo incisivo superior derecho	Pieza completa, sin fisuras ni caries. Con algo de desgaste en la cúspide de la corona. Corona blanca y raíz beige. Con tierra adherida. Presencia de consolidantes.
1ALG	1ALG3	-	Segundo molar inferior izquierdo	Presenta rota la raíz (rota al extraerlo). Corona con leve desgaste. Corona blanca y raíz beige oscuro. Algo de suciedad adherida.
2ALG	2ALG1	-	Primer molar inferior izquierdo.	Pieza completa, con pequeña grieta en el cuello. Corona blanca y raíz beige. Algo de suciedad adherida. La raíz tiene un pequeño orificio por no haber completado su crecimiento.
2ALG	2ALG2	-	Segundo molar decidual inferior derecho.	Pieza decidual completa, sin fisuras ni caries, con buen aspecto. Corona blanca y raíz beige. Con suciedad adherida.
3ALG	3ALG1	3690 ± 50	Segundo molar inferior izquierdo	Raíz sin finalizar crecimiento, abierta. Pieza sin fisuras ni caries, con muy buen aspecto. Color claro y poca suciedad.
3ALG	3ALG2	3690 ± 50	Segundo incisivo superior.	Pieza decidual completa, sin fisuras ni caries pero con desgaste de la corona. Color claro. Limpio.
3ALG	3ALG3	3690 ± 50	Segundo molar superior derecho definitivo.	Pieza completa, aunque no ha terminado su crecimiento en la raíz (raíz abierta). Corona blanca y raíz beige. Con poca suciedad.

Tabla 5. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Aldeagordillo. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

El Mirador

Procedente de este yacimiento localizado en La Lastrilla (Segovia), se han seleccionado 2 muestras correspondientes a un único individuo inhumado de forma individual, cuyas muestras y características podemos observarla a continuación en la *Tabla 6.* Las fotografías correspondientes a cada una de las muestras seleccionadas están recogidas en la *Figura 9.*

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1MIR	1MIR1	3650 ± 35	Primer molar superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras roturas ni caries. Con desgaste en la corona, no se diferencia la dentina, pero puede que esté expuesta. Corona clara y raíz beige oscuro-marrón claro. Suciedad adherida de color oscuro, marrón.
1MIR	1MIR2	3650 ± 35	Segundo molar superior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. La raíz muestra un minúsculo orificio. Raíz blanca y raíz beige oscura-marrón. Sin desgaste. Bastante suciedad adherida, de color marrón.

Tabla 6. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Mirador. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 9.Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Mirador

Perro Alto

Este yacimiento, situado en Fuente Olmedo (Valladolid) proporcionó restos osteológicos de un individuo del cual se seleccionaron 2 muestras para analizar genéticamente dentro del contexto de esta tesis doctoral. Las características de dichas muestras se resumen en la *Tabla 7*. Podemos observar las fotografías de las muestras seleccionadas en la *Figura 10*.

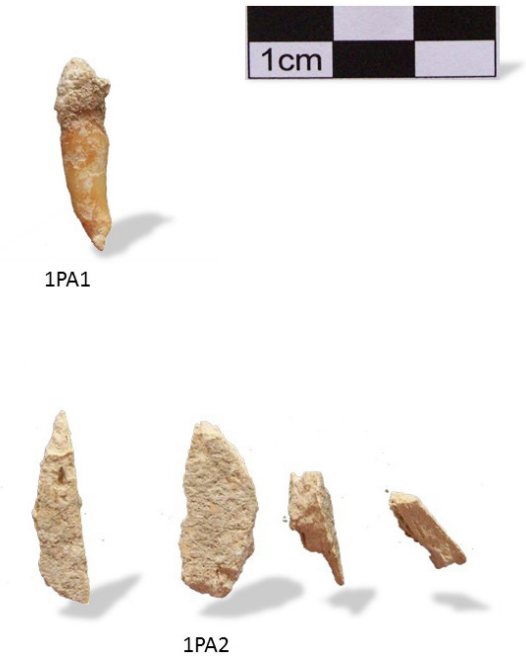


Figura 10. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Perro Alto

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1PA	1PA1	3730 ± 65	Primer premolar superior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Coloración clara.
1PA	1PA2	3730 ± 65	Fragmento de fémur	4 fragmentos de cortical de fémur. Coloración blanquecina y relativamente limpio.

Tabla 7. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Perro Alto (Fuente Olmedo, Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Santa Cruz II

De este yacimiento vallisoletano se seleccionaron muestras a partir de los restos esqueléticos de 2 individuos, denominados respectivamente 1CAB y 2CAB. Del primero de ellos fue posible la selección de 2 muestras, mientras que del segundo únicamente pudimos seleccionar una muestra de calota craneal. Las características macroscópicas así como la nomenclatura empleada de las muestras seleccionadas en este caso, se recogen en la *Tabla 8*, así como sus respectivas fotografías en la *Figura 11*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1CAB	1CAB1	-	Tercer molar superior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Coloración clara, corona blanca y raíz beige-amarilla.
1CAB	1CAB2	-	Segundo molar superior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Coloración clara, corona blanca y raíz beige-amarilla.
2CAB	2CAB1	-	Fragmento de calota craneal. Hueso parietal.	Color beige claro. Presenta bastante porosidad, no sé si por causa tafonómica o patológica. Algo de suciedad adherida en la parte interna.

Tabla 8. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Santa Cruz II. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

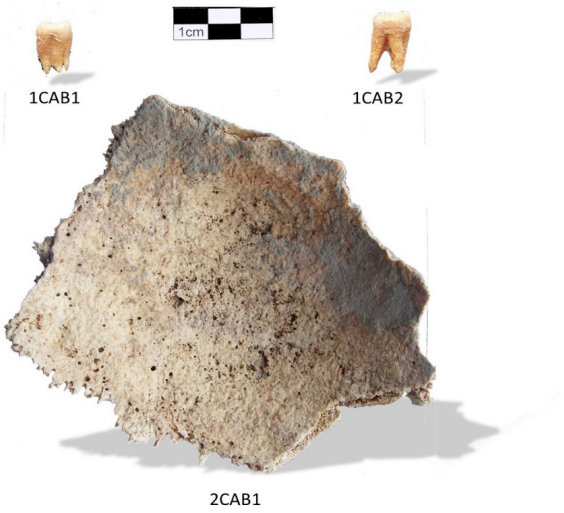


Figura 11. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Santa Cruz II (Cabezón).

Valhondo - Pajares de Adaja

Procedentes del abulense yacimiento de Pajares de Adaja se seleccionaron 2 muestras óseas correspondientes a un único individuo, cuyas características se recogen en la *Tabla 9*, y sus fotografías correspondientes en la *Figura 12*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1PAD	1PAD1	3970 ± 50	costilla	Pieza ósea fragmentada. Coloración clara
1PAD	1PAD2	3970 ± 50	costilla	Pieza ósea fragmentada. Coloración clara

Tabla 9. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Valhondo-Parajes de Adaja. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

***Figura 12**. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Pajares de Adaja*

Rivas Vaciamadrid

Quien suscribe esta tesis recogió en el Museo de Ciencias Naturales de Madrid un fragmento de calota craneal correspondiente a un único individuo de este yacimiento. El esqueleto humano exhumado corresponde a un varón de unos 25 años de edad. En la siguiente tabla (*Tabla 10*) podemos ver las características fundamentales de la muestra aportada para el estudio del individuo encontrado en Rivas-Vaciamadrid (*Figura 13*).

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1RV	1RV1	3720 ± 35	Fragmento calota craneal	Fragmento de occipital. Coloración beige muy claro. Aspecto duro, parece tener una mineralización muy avanzada. Presenta adherido algún tipo de consolidante en los bordes. Una pequeña anotación con tinta, sobre pintura blanca en uno de los bordes y alguna marca de lápiz.

Tabla 10. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Rivas-Vaciamadrid (Madrid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 13. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Rivas Vaciamadrid

Tablada del Rudrón (Burgos)

Procedentes de este yacimiento se han seleccionado 8 muestras correspondientes a 4 individuos diferentes, 2 muestras por cada uno de ellos. Concretamente se trata de tres individuos adultos y un cuarto de edad no determindada, siendo los tres primeros un varón y una mujer y el tercero y el cuatro de sexo indeterminable. Las características de cada una de las muestras seleccionadas, así como sus correspondientes fotografías, pueden observarse respectivamente en la *Tabla 11* y en la *Figura 14*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1TR	1TR1	-	Canino inferior izquierdo	Buen estado de conservación
1TR	1TR2	-	Tercer molar inferior derecho	Buen estado de conservación
2TR	2TR1	-	Segundo molar superior derecho	Presenta restos de pegamento adheridos a la raíz. El ápice de las raíces presenta pequeños orificios.
2TR	2TR2	-	Tercer molar superior derecho	Buen aspecto general aunque con diminutos orificios en el ápice de las raíces.
3TR	3TR1	-	Segundo molar superior derecho	Pieza rota, raíces partidas. Coloración oscura, poco apropiada.
3TR	3TR2	-	Segundo premolar inferior izquierdo	Buen estado de conservación.
4TR	4TR1	-	Pimer incisivo superior izquierdo	Presenta una pequeña fisura en la corona y una inscripción con tinta permanente.
4TR	4TR2	-	Pimer molar superior izquierdo	Pieza sucia y rota por las raíces. Además presenta una inscripción con tinta permanente.

Tabla 11. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Tablada del Rudrón (Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 14. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Tablada del Rudrón (Burgos).

4.1.1.1.2 Edad De Bronce

En la Edad del Bronce se desarrollan tres grandes culturas: la de Parpantique en el Bronce Antiguo (1900-1800 AC); la de Cogotas I con una primera fase Formativa, también llamada Protocogotas I (Bronce Medio, 1800-1450 AC) y otra de esplendor, denominada Cogotas I Pleno (Bronce Tardío, 1400-1150 AC); y por último, la del Soto de Medinilla, concretamente su fase Soto Formativo(Bronce Final, 1100-800 AC).

A continuación se describen las muestras tomadas de cada uno de los periodos analizados correspondientes a la Edad del Bronce

4.1.1.1.2.1 Yacimientos Del Bronce Antiguo Estudiados

De este periodo temporal, disponemos muestras procedentes de 2 yacimientos distintos, Santioste (localizado en la provincia de Zamora) y la Cueva de la Revilla (Atapuerca, Burgos).

Santioste

De este yacimiento se seleccionaron muestras correspondientes a 2 individuos, el primero de ellos (1ST) es una mujer joven, y el segundo (2ST) un individuo infantil. Las muestras correspondientes al individuo 1ST fueron seleccionadas por quien suscribe esta tesis en el área de Paleontología y Evolución Humana del Instituto Carlos III de Madrid. Por otro lado las muestras pertenecientes al individuo 2ST fueron seleccionadas por el antropólogo responsable del análisis antropológico y enviadas al Laboratorio de Genética Forense y Genética de Poblaciones del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. En la *Tabla 12* podemos observar las características fundamentales de las muestras seleccionadas a partir de los restos esqueléticos pertenecientes a 2 individuos (denominados respectivamente 1ST y 2ST) hallados en este yacimiento. De estos 2 individuos solamente el primero (1ST) está formado por un esqueleto relativamente completo; sin embargo el segundo (2ST) únicamente viene dado por una pieza ósea aislada. Las fotografías

correspondientes a estas muestras se muestran en la *Figura 15*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1ST	1ST1	3780 ± 50	Premolar 3º o 4º inferior izquierdo	Buen estado
1ST	1ST2	3780 ± 50	Canino inferior derecho	Buen estado
2ST	2ST1	3780 ± 50	Fragmento de diáfisis de húmero	Diáfisis rota por los 2 extremos. Parece haber sido limpiada al menos con agua, ya que la superficie está muy limpia. La cortical está muy erosionada.

Tabla 12. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Santioste (Otero de Sariegos, Villafáfila, Zamora). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

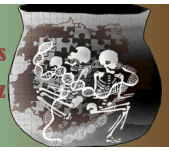
Figura 15. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Santioste

Cueva de la Revilla

Dentro de esta cueva, excavada en Atapuerca, se encontraron 2 importantes agrupaciones de restos esqueléticos humanos; cuya característica principal era la desconexión anatómica, que se traduce en una clara dispersión de los huesos por toda la cueva. Además los restos no se distribuyen en un solo plano, sino que se acumular unos sobre otros, superpuestos, entremezclados y con disposiciones y orientaciones diversas.

El primero de los conjuntos óseos es el osario general de la cueva, dónde está la práctica totalidad de los huesos que forman el esqueleto humano y donde destacan al menos 3 cráneos, uno de los cuales es infantil. Pero sin embargo, no se ha rescatado ningún individuo completo *in situ*. Los restos humanos están entremezclados del mismo modo con restos faunísticos.

El segundo conjunto de huesos humanos presenta 3 cráneos completos de adulto (sin mandíbula en ningún caso) y un fragmento de frontal infantil. También se hallaron restos de una mandíbula, de otro



cráneo adulto, un sacro y una escápula, además de algunos huesos largos infantiles y varias costillas y vértebras. Existe una última agrupación, más pequeña y sin presencia de cerámicas u otros utensilios.

A rasgos generales, hay que destacar que no se encuentra ningún individuo completo. No está claro que se trate de deposiciones primarias y la mayoría de los restos humanos se localizan en el flanco occidental y suroccidental de la sala (*Abarquero-Moras et al., 2005*).

A pesar de la dispersión y fragmentación de los restos óseos, cada componente esquelético presenta un grado óptimo de preservación. El número mínimo de individuos estimado es de 21 individuos, siendo al menos 4 de ellos subadultos (*Palomino-Lázaro y Abarquero-Moras, 2000).* En la *Tabla 13* se detallan las características de las muestras tomadas a partir de los individuos seleccionados para análisis genético. Del mismo modo se pueden observar las fotografías de las muestras seleccionadas en la *Figura 16*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1REV	1REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Primer molar	Pieza completa, sin fisuras ni caries. Coloración blanca en la corona y amarillent en la raíz. Limpio.
1REV	1REV2	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Segundo molar	Pieza completa, sin fisuras ni caries. Coloración blanca en la corona y amarillent en la raíz. Limpio.
2REV	2REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Primer molar	Pieza completa, sin fisuras ni caries, pero con desgaste avanzado de la corona. Coloración amarillenta. Bastante limpio.
2REV	2REV2	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Segundo molar	Pieza completa, sin fisuras ni caries, pero con desgaste avanzado de la corona. Coloración amarillenta. Bastante limpio.
3REV	3REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Primer molar	Pieza completa, pero con desgaste avanzado. Coloración clara. Limpio.
4REV	4REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Segundo molar	Presenta una de las raíces rota. Coloración clara. Bastante sucio.
4REV	4REV2	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Canino	Pieza completa, ligeramente rasgado en la raíz. Coloración clara, pero bastante sucio.
5REV	5REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Primer molar	Pieza completa, sin fisuras ni caries, pero las raíces no han completado su crecimiento dejando minúsculos orificios en sus extremos. Coloración clara, bastante limpio.
5REV	5REV2	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Segundo molar decidual	Pieza completa, sin fisuras ni caries. Coloración clara y bastante limpio.
6REV	6REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Tercer molar	Pieza completa, sin fisuras ni caries. Coloración clara. Bastante tierra adherida.
6REV	6REV2	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Segundo premolar	Pieza completa, sin fisuras ni caries. Coloración clara, pero con bastante tierra adherida.
7REV	7REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Segundo molar decidual	Raíces incompletas. Color claro.
7REV	7REV2	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Primer molar decidual	Raíces rotas. Color claro.
8REV	8REV1	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Primer molar	No se han terminado de formar las raices por lo que está abierto. Coloración clara.
8REV	8REV2	3550 ± 40 - 3325 ± 35	Primer molar decidual	Tiene una raíz rota. Coloración clara. Sin fisuras ni caries.

Tabla 13. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Cueva de la Revilla (Atapuerca, Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

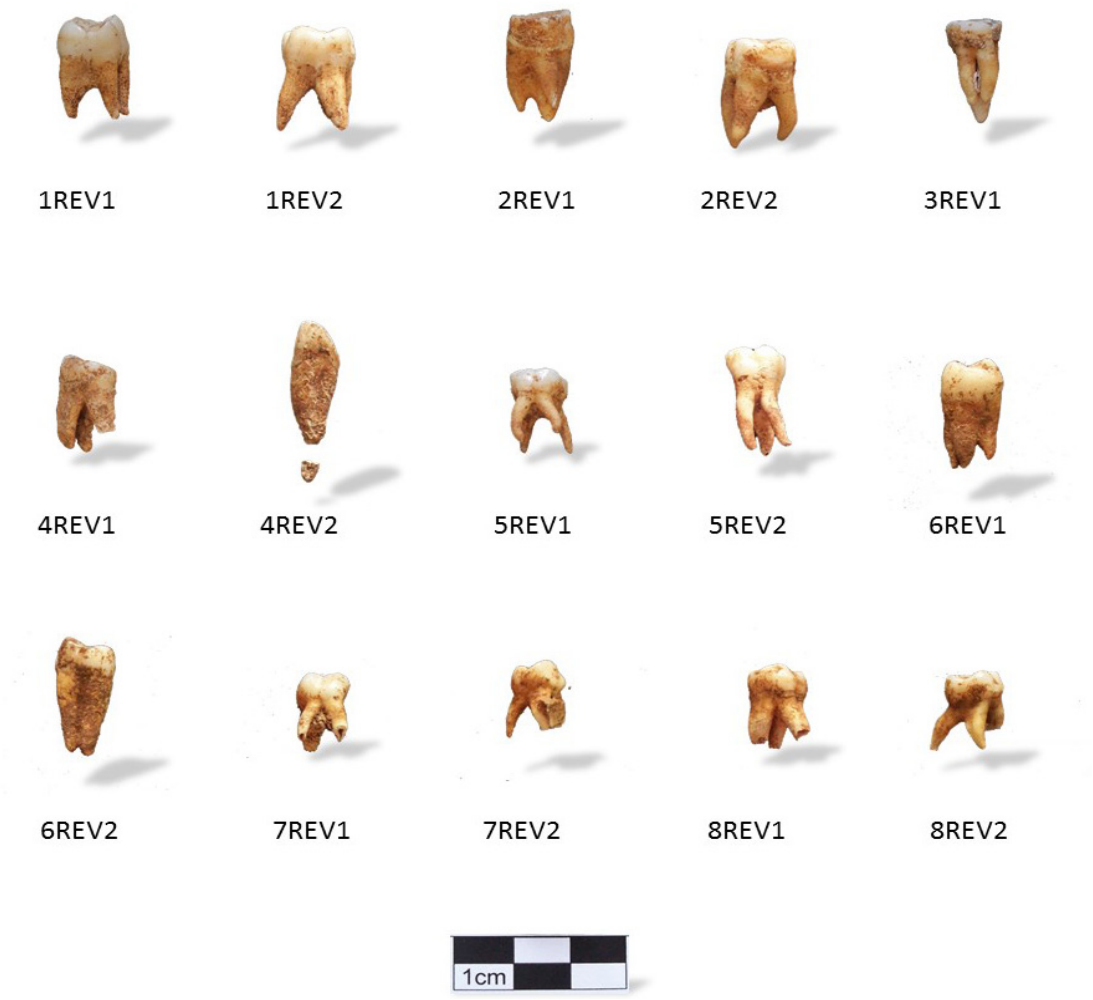


Figura 16. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Cueva de la Revilla

4.1.1.1.2.2 Yacimientos Protocogotas I Estudiados

Dentro de los yacimientos Protocogotas analizados en la presente tesis se encuentran los siguientes: Carrelasvegas (Santillana de Campos, Palencia), Cueva de la Revilla (Atapuerca, Burgos) (Este yacimiento ya aparecía en el periodo anterior, pero debería incluirse también en este periodo, por tratarse de una cueva empleada como enterramiento a lo largo de un gran periodo temporal, prolongándose su utilización también durante el desarrollo de la cultura Protocogotas), El Cementerio (Quintanilla de Onésimo, Valladolid), El Cerro (La Horra, Burgos), El Juncal (Villaralbo, Zamora), Fuente de la Mora (Valladolid), La Huelga (Dueñas, Palencia), Los Rompizales (Quintanadueñas, Burgos), Las Cañamonas (San Cristobal de Entreviñas, Zamora), Los Tolmos (Caracena, Soria) y Tordillos (Aldeaseca de la Frontera, Salamanca).

Carrelasvegas

De este yacimiento palentino (localizado en Santillana de Campos, Palencia) se pudo seleccionar únicamente una muestra a partir de un individuo adulto y masculino, al que denominamos 1CRV. Las características de dicha muestra se exponen en la *Tabla 14*, así como la fotografía de la muestra seleccionada en la *Figura 17*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1CRV	1CRV1	3230 ± 80	Primer molar superior derecho	Molar con la corona blanca y limpia, sin caries ni fisuras. La raíz está muy sucia y abierta (no se distingue si se trata de una rotura o falta de formación).

Tabla 14. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Carrelasvegas (Santillana de Campos, Palencia). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 17. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Carrelasvegas

El Cementerio

El yacimiento de El Cementerio se localiza en Quintanilla de Onésimo, provincia de Valladolid. Al igual que en el caso anterior, los restos esqueléticos analizados procedentes de este yacimiento también corresponden a un único individuo (denominado 1QUO). Sin embargo, en este caso fue posible la selección de 2 piezas dentales para su análisis genético. Las características de dichas muestras, así como sus fotografías, se encuentran en la *Tabla 15* y en la *Figura 18* respectivamente.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1QUO	1QUO1	3480 ± 35	Primer molar superior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries, pero no ha finalizado el crecimiento de la raíz y presenta orificios en las 3 raíces. Color claro.
1QUO	1QUO2	3480 ± 35	Primer molar superior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries, pero no ha finalizado el crecimiento de la raíz y presenta orificios en las 3 raíces. Color claro.

Tabla 15. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cementerio (Quintanilla de Onésimo, Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 18. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cementerio

El Cerro de la Horra

En El Cerro de la Horra (Burgos) se encontraron restos esqueléticos correspondientes a 3 individuos jóvenes (apartado 2.1.4.1 de la introducción). El análisis genético de las muestras seleccionadas se llevó a cabo en 2 fases diferentes, una primera fase anterior a la realización de esta tesis y una segunda fase durante la misma. Durante el primer análisis genético se analizaron únicamente STRs autosómicos con el fin de establecer relaciones de parentesco; en la segunda fase (correspondiente a esta tesis) se replicó el procedimiento de análisis de STRs y se analizó también el ADN mitocondrial.

Las características de las muestras seleccionadas se recogen en la *Tabla 16*, y la fotografía de una de las muestras procesadas en presente tesis se encuentra en la *Figura 19*. No se dispone de fotografías correspondientes al resto de muestras dado que fueron pulverizadas de manera previa al desarrollo de esta tesis.

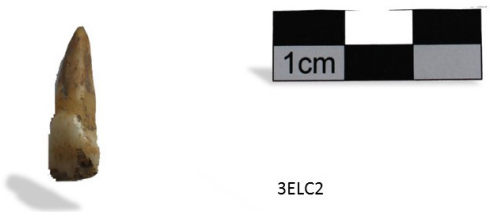


Figura 19. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cerro de la Horra

INDV	MUESTR.	DATACIÓN	TIPO MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1ELC	1ELC1	3225 ± 30	Canino derecho	Sin descripción
1ELC	1ELC2	3225 ± 30	Segundo incisivo	Sin descripción
1ELC	1ELC3	3225 ± 30	Primer incisivo superior derecho	Pieza completa sin fisuras roturas ni caries. Corona blanca y raíz entre amarilla y marrón.
2ELC	2ELC1	3180 ± 50	Primer incisivo	Sin descripción
2ELC	2ELC2	3180 ± 50	Canino derecho decidual	Sin descripción
2ELC	2ELC3	3180 ± 50	Segundo molar inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Raíz sin terminar de formarse, abiertas en su parte más apical. Corona blanca y raíz beige claro. Suciedad adherida.
3ELC	3ELC1	3210 ± 35	Segundo molar derecho	Sin descripción
3ELC	3ELC2	3210 ± 35	Primer incisivo superior izquierdo	Pieza completa, pero algo rota en la corona. Sin fisuras. Corona clara, blanca, y raíz beige-amarillo.

Tabla 16. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cerro de la Horra (Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

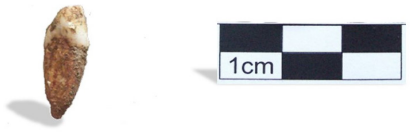
El Juncal

Esta sepultura fue descubierta en Villaralbo (Zamora); y nuestro interés se centra en una de las múltiples estructuras subterráneas halladas, la cual contenía un enterramiento primario, de inhumación individual (apartado 2.1.4.1 de la introducción). El esqueleto fue sometido a análisis antropológico, y se determinó como un varón joven de entre 17 y 19 años de edad (*Buikstra y Ubelaker, 1994; Cox y Mays, 2000*) (*Esparza et al., 2008*).

Las características de la única muestra disponible para el análisis genético se recogen en la *Tabla 17,* así como su fotografía en la *Figura 20.*

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1JUN	1JUN1	3335 ± 35	Canino superior derecho	Coloración blanca en la corona y con la raíz marrón. Un poco sucio. Sin roturas, ni fisuras, ni caries.

Tabla 17. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Juncal (Villaralbo, Burgos). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.



1JUN1

Figura 20. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Juncal

Fuente de la Mora

En este yacimiento, localizado en Valladolid, se seleccionaron muestras correspondientes a 3 individuos distintos, cuyas características se muestran en la *Tabla 18*, así como las fotografías de las muestras seleccionadas en la *Figura 21*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1FM	1FM1	3295 ± 35	Tercer molar superior izquierdo	Pieza completa. El crecimiento de la raíz no está completamente finalizado. Corona clara. Mucha suciedad adherida. Raíz amarilla-anaranjada, clara.
1FM	1FM2	3295 ± 35	Segundo molar superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Crecimiento completo. Corona blanca y raíz beige claro, pero con mucha suciedad adherdia.
2FM	2FM1	3290 ± 35	Primer incisivo superior derecho decidual	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Corona beige claro y raíz beige-amarillenta. Algo de suciedad adherida.
2FM	2FM2	3290 ± 35	Primer molar decidual superior derecho	Pieza completa, aunque 2 raíces aún están ligeramente abiertas en sus extremos, por pequeños orificios, el crecimiento aún no ha finalizado. Corona blanca y raíz beige-amarillenta. Con bastante suciedad adherida.
3FM	3FM1	3340 ± 35	Fragmento de peroné izquierdo	Fragmento cortado por 2 extremos. Diáfisis. Coloración marrón clara. Algo de suciedad adherida.

Tabla 18. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Fuente de la Mora (Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

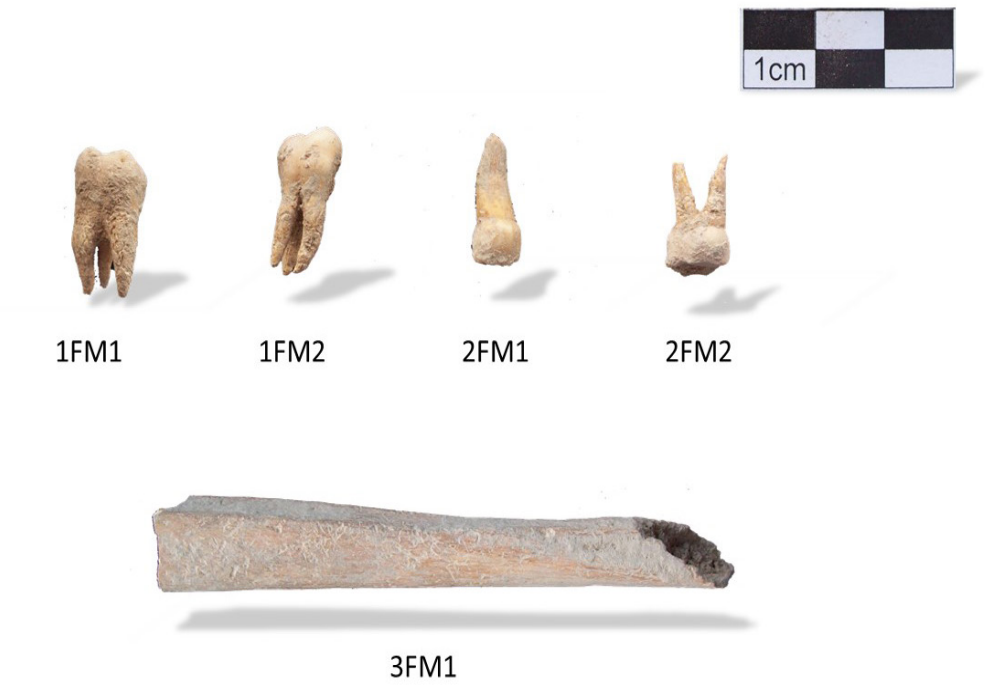


Figura 21. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Fuente de la Mora

La Huelga

El yacimiento de La Huelga se localiza en Dueñas, Palencia, y ha sido intervenido a lo largo de sucesivas campañas a principios de la década de los 90. Pero nos hemos centrado en el Sector 1 (apartado 2.1.4.1 de la introducción). De este yacimiento se ha llevado a cabo el análisis genético de un único individuo, las características de las muestras seleccionadas, su datación y sus fotografías, se recogen en la *Tabla 19* y en la *figura 22*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1HU	1HU1	3290 ± 35	Segundo molar superior izquierdo definitivo	Se trata de un germen dental no completo. Sucio
1HU	1HU2	3290 ± 35	Segundo molar superior derecho definitivo	Se trata de un germen dental no completo. Sucio

***Tabla 19**. Detalle de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de La Huelga (Dueñas, Palencia). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.*

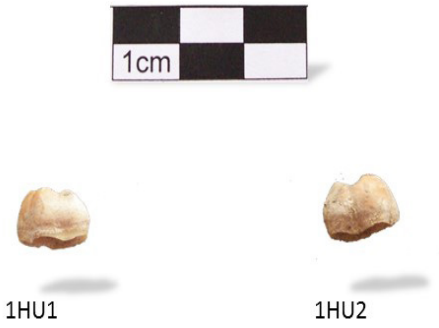


***Figura 22**. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de La Huelga*

Los Rompizales

Del burgalés yacimiento de Los Rompizales se recogieron 10 muestras correspondientes a 5 individuos muy jóvenes (apartado 2.1.4.1 de la introducción), 2 muestras por cada uno de ellos. Las características de las muestras seleccionadas a partir de cada uno de ellos se muestran en la *Tabla 20*, así como las fotografías de cada una de las muestras seleccionadas pueden observarse en la *Figura 23*.

Figura 23. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Rompizales

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1RPZ	1RPZ1	3250 ± 35	Primer molar inferior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Alguna suciedad adherida.
1RPZ	1RPZ2	3250 ± 35	Segundo premolar superior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Alguna suciedad adherida.
2RPZ	2RPZ1	3195 ± 30	Tercer molar superior derecho	Presenta rota la raíz. Coloración clara, blanco en la corona y beige en la raíz. Alguna suciedad adherida.
2RPZ	2RPZ2	3195 ± 30	Segundo premolar inferior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Alguna suciedad adherida.
3RPZ	3RPZ1	3185 ± 30	Primer incisivo inferior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Alguna suciedad adherida.
3RPZ	3RPZ2	3185 ± 30	Segundo incisivo inferior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Alguna suciedad adherida.
4RPZ	4RPZ1	3165 ± 30	Primer premolar superior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Alguna suciedad adherida.
4RPZ	4RPZ2	3165 ± 30	Segundo incisivo superior izquierdo	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro, corona blanca y raíz beige. Alguna suciedad adherida.
5RPZ	5RPZ1	3215 ± 35	Primer molar decidual superior derecho	Pieza de pequeño tamaño, es decidual. Con mucha suciedad adherida a la superficie. La raíz está rota.
5RPZ	5RPZ2	3215 ± 35	Segundo molar decidual superior derecho	Pieza bastante completa, solo tiene una pequeña rotura en el ápice de una de las raíces. Buen estado de conservación. Suciedad adherida a la superficie.

Tabla 20. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Rompizales. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Las Cañamonas

Los restos esqueléticos humanos exhumados a partir de este yacimiento localizado en San Cristobal de Entreviñas (Zamora), corresponden a un único individuo; definido tras el estudio antropológico como una mujer de entre 35 y 45 años de edad; al cual se asignó la nomenclatura 1CÑ, y a las 2 muestras seleccionadas: 1CÑ1 y 1CÑ2.

En la *Tabla 21* y las *Figura 24* podemos observar las características de las muestras del individuo de Las Cañamonas y su selección.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1CÑ	1CÑ1	3170 ± 50	Primer molar superior derecho	Molar limpio, sin fisuras, caries ni roturas. Coloración blanca en la corona y beige en la raíz.
1CÑ	1CÑ2	3170 ± 50	Primer molar inferior derecho	la extracción se ha realizado a partir de polvo de la misma muestra 1CÑ1

Tabla 21. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Las Cañamonas. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

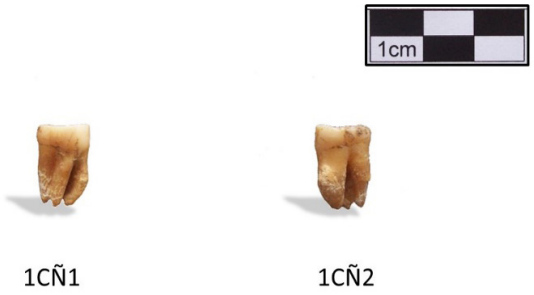


Figura 24. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Las Cañamonas

Los Tolmos

Dentro de este yacimiento, nuestro estudio se ha centrado en 2 enterramientos ubicados en este enclave: el primero de ellos fue denominado LTA, y consiste en una tumba individual; el segundo (llamado LTB), contenía restos esqueléticos correspondientes a 3 individuos enterrados de manera simultánea. En la tumba LTB, se hallaron 2 esqueletos adultos, el primero (LTB1) descansaba sobre su costado izquierdo y fue identificado como una mujer de entre 20 y 25 años. El segundo (LTB2) reposaba sobre su costado derecho, y se estableció que tenía una edad entre 30 y 40 años, su sexo no fue determinable. El tercer individuo se hallaba entre los 2 adultos y consistía en una pequeño conjunto de huesos pertenecientes a un individuo perinatal (recién nacido o feto a término) al que denominamos LTB3. Por otro lado, en la otra tumba, se encontraron restos esqueléticos pertenecientes a un individuo masculino de entre 14 y 16 años de edad, al que denominamos LTA4 (apartado 2.1.4.1). En la *Tabla 22* hallamos las características fundamentales de las muestras seleccionadas para llevar a cabo el estudio genético de estos 4 individuos. Sus fotografías se muestran en la *Figura 25*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
LTB1	LTB1A	3520 ±35	Canino superior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro.
LTB1	LTB1B	3520 ±35	Segundo premolar	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro.
LTB2	LTB2A	3500 ± 35	diente	Pieza completa con caries en el cuello. Color claro.
LTB2	LTB2B	3500 ± 35	diente	Pieza completa con caries en el cuello. Color claro.
LTB3	LTB3A	3550 ± 35	húmero derecho	Pieza completa con coloración clara.
LTB3	LTB3B	3550 ± 35	húmero derecho	Pieza completa con coloración clara.
LTA4	LTA4A	3660 ± 35	Segundo premolar superior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro.
LTA4	LTA4B	3660 ± 35	Primer premolar superior derecho	Pieza completa sin fisuras, roturas ni caries. Color claro.

Tabla 22. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Los Tolmos (Caracena, Soria). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

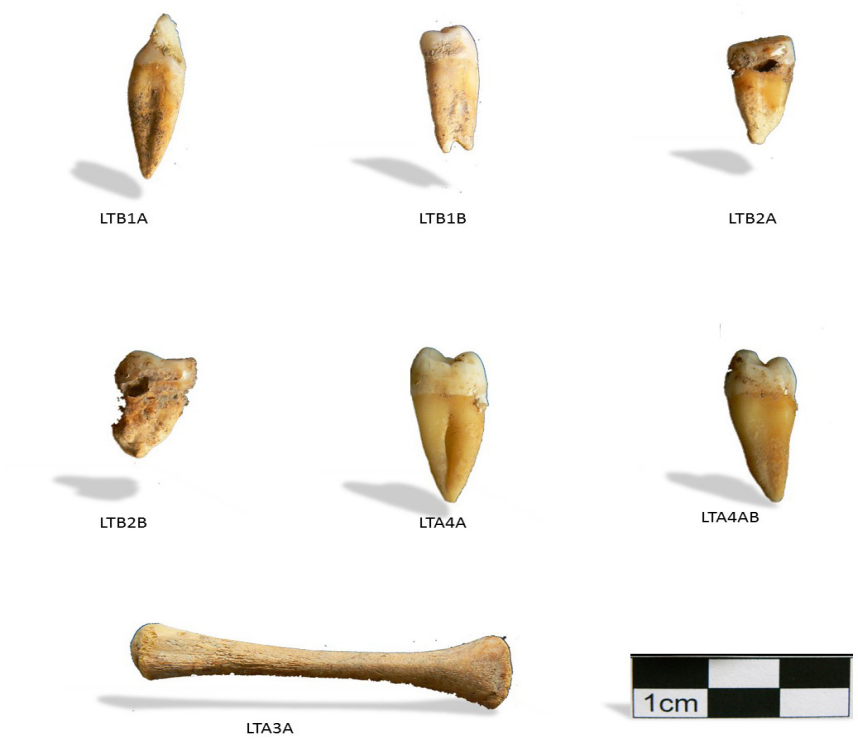


Figura 25. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Los Tolmos

Tordillos

En los 9 hoyos funerarios de Tordillos se exhumaron los restos óseos correspondientes a un número mínimo de 22 individuos. De los cuales se ha tomado muestra a 12 de ellos para llevar a cabo análisis genético. 5 de los hoyos proporcionan evidencias de un único sujeto, y otro de 2, mientras que los 3 restantes aportan vestigios esqueléticos de 4, 5 y 6 individuos. Dentro de algunos de estos hoyos los huesos se encontraban mezclados, y era difícil su individualización; pero para el análisis genético se han seleccionado aquellos aparentemente más indvidualizados. Concretamente, para el análisis genético se han utilizado 12 individuos repartidos en 4 hoyos diferentes. La distribución es la siguiente:

- Hoyo AN-AV/41-50/VI:
  - Contiene los restos de un único individuo infantil de entre 6-7 años de edad, el individuo 1TOR.
- Hoyo AN-AV/41-50/IX:
  - Contiene los restos de 5 individuos:
    - 2TOR: determinado antropológicamente como un individuo de entre 25 y 35 años de sexo indeterminable.

- 3TOR: Determinado antropológicamente como un varón de más de 45 años.
- 4TOR: Determinado como un varón mayor de 45 años.
- 5TOR: Determinado antropológicamente como un varón adulto de entre 30 y 40 años de edad.
- 6TOR: Individuo infantil de sexo indeterminable antropológicamente de 7 años de edad.

o Hoyo AN-AV/41-50/X:

◊ Contiene los restos de 3 individuos:

- 7TOR: Individuo determinado antropológicamente como un varón de entre 25 y 35 años de edad.
- 8TOR: Determinado como una mujer adulta de entre 45 y 50 años.
- 9TOR: Antropológicamente determinada como una mujer joven de entre 17 y 25 años.

o Hoyo AN-AV/121-130/V:

- 10TOR: Determinada como mujer de entre 18 y 25 años.

o Hoyo T-AC/51-60/XI:

- 11TOR: Individuo infantil de 3-4 años.
- 12TOR: Varón mayor de 45 años.

Para el estudio genético se han seleccionado muestras de 12 individuos repartidos en 4 hoyos diferentes de los 9 encontrados. En la *Tabla 23* se pueden ver las características macroscópicas de las muestras seleccionadas para el análisis de ADN. Del mismo modo, en la *Figura 26* es posible visualizar las fotografías correspondientes a cada una de las muestras.

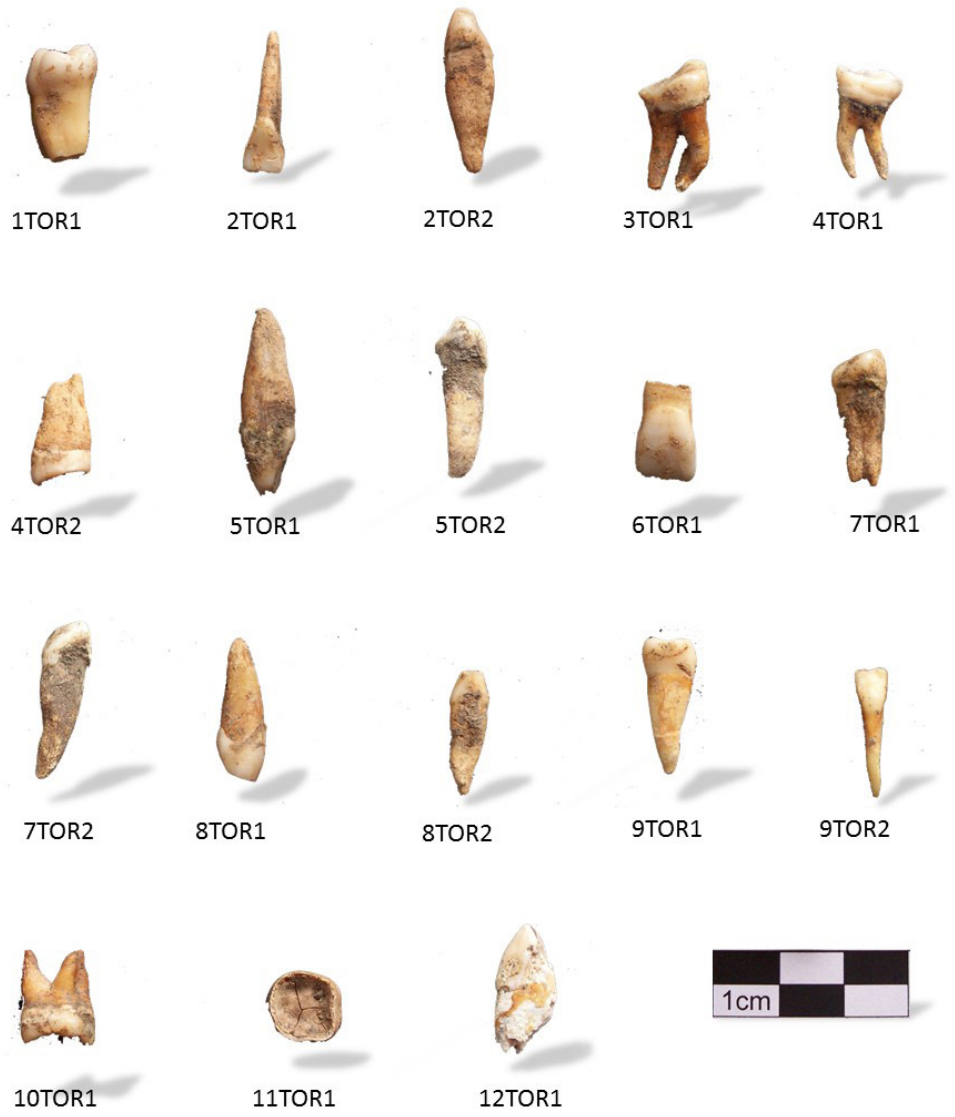


Figura 26. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Tordillos.

INDVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1TOR	1TOR1	-	Primer molar inferior izquierdo definitivo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Pero la raíz está en crecimiento, abierta en la región apical. Color muy claro, corona blanca y raíz beige claro. Bastante limpio. Sin consolidantes ni rotulación.
2TOR	2TOR1	-	Segundo incisivo inferior izquierdo	Pieza completa, sin roturas, con una minúscula fisura en la raíz y un pequeño raspado en la corona. Buen aspecto. Coro beige en la raíz y blanco en la corona. Algo de suciedad adherida.
2TOR	2TOR2	-	Canino inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Ligero desgaste en la corona que deja ver ligeramente la dentina. Color blanco en la corona y beige en la raíz, suciedad adherida en toda su superficie.
3TOR	3TOR1	-	Primer molar inferior izquierdo definitivo	Pieza completa, con una fisura a lo largo de la corona y una caries además de un avanzado desgaste de la misma. Las 2 raíces están erosionadas. Color de la raíz beige oscuro y corona clara. Con suciedad adherida.
4TOR	4TOR1	-	Primer molar inferior izquierdo definitivo	Pieza completa. Fisura en la raíz. Raíz ligeramente rota en su extremo y erosionada. Color beige raíz y beige-blanco en corona.
4TOR	4TOR2	-	Segundo premolar superior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Desgaste avanzado en la corona y suciedad adherida.
5TOR	5TOR1	-	Canino inferior izquierdo	Pieza completa. Sin roturas ni caries, con una delgadísima fisura a lo largo de la corona. Color claro. Beige claro en la raíz y blanco en la corona.
5TOR	5TOR2	-	Primer premolar inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Color claro en general. Corona blanca y raíz beige claro. Algo de suciedad adherida.
6TOR	6TOR1	-	Primer incisivo superior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries, pero la raíz está en formación y completamente abierta.
7TOR	7TOR1	3205 ± 35	Canino superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Muy sucio.
7TOR	7TOR2	3205 ± 35	primer premolar superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Muy sucio.
8TOR	8TOR1	-	Canino superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries, pero con desgaste avanzado de la corona, y exposición de la dentina por el mismo. Coloración clara.
8TOR	8TOR2	-	Segundo incisivo inferior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries, pero con desgaste en la corona. Suciedad adherida a la raíz. Color claro en general.
9TOR	9TOR1	-	Segundo premolar inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Color claro.
9TOR	9TOR2	-	primer incisivo inferior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas, ni caries. Exposición de la dentina por desgaste de la corona. Color claro.
10TOR	10TOR1	-	Tercer molar superior derecho	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Color oscuro en general. Corona beige oscuro y raíz casi marrón.

10TOR	10TOR2	-	Primer premolar inferior derecho	Corona rota. Coloración oscura, tanto raíz como corona. Suciedad adherida.
11TOR	11TOR1	-	Germen primer molar superior derecho definitivo	Germen dental, sólo está formada la corona y la parte inferior de la misma está muy agrietada. Color claro pero con mucha suciedad adherida.
12TOR	12TOR1	-	Canino superior derecho	Muy deteriorado, pieza con la corona rota y degradada, parece "deshacerse". Corona completa, sin fisuras ni caries y color claro.

Tabla 23. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Tordillos. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

4.1.1.1.2.3 Yacimientos De La Cultura Cogotas I Estudiados

Son 3 los yacimientos de la Cultura Cogotas I estudiados en esta tesis: La Requejada (San Román de Hornija, Valladolid), Cantoblanco (Sahagún, León) y El Cerro de la Cabeza (Ávila).

La Requejada

En el yacimiento Cogotas I de La Requejada se localizó un hoyo en el que se hallaron restos correspondientes a 3 personas. El primer individuo (al que denominamos 1LR), era de gran estatura, yacía de espaldas con los brazos recogidos sobre el pecho y las piernas replegadas hacia la izquierda. El número 2 (Al cual nosotros denominamos 2LR) también era de gran estatura, y reposaba sobre el costado derecho, con la mano izquierda sobre el regazo y la derecha flexionada algo más arriba; tenía las piernas replegadas pero orientadas en la línea del tronco. Finalmente, el número 3 (3LR), se encontraba en idéntica postura que el segundo, y consistía en un individuo más grácil, con las manos recogidas sobre la cabeza (*Delibes de* Castro, 1978*)*. Tras el análisis antropológico de los restos se determinó que los individuos 1LR y 2LR eran adultos, siendo el primero una mujer joven y el segundo un varón de edad avanzada, y el tercer individuo (3LR) un infantil de sexo indeterminable. En la *Tabla 24* y en la *Figura 27* podemos observar las principales características de las muestras seleccionadas para cada uno de estos individuos.

INDVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1LR	1LR1	3020 ± 35	Segundo incisivo	Sin descripción
1LR	1LR2	3020 ± 35	Primer molar superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas,ni caries. Anclada al maxilar. Corona con coloración blanca o beige claro. Sin desgaste. Bastante limpio. El maxilar tiene consolidantes, pero la pieza parece no tener.
1LR	1LR3	3020 ± 35	Segundo premolar superior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas,ni caries. Anclada al maxilar. Corona con coloración blanca o beige claro. Sin desgaste. Bastante limpio. El maxilar tiene consolidantes, pero la pieza parece no tener.
2LR	2LR1	3120 ± 53	Primer molar	Sin descripción
2LR	2LR2	3120 ± 53	sin descripción	Sin descripción
3LR	3LR1	2985 ± 30	Primer molar	Sin descripción
3LR	3LR2	2985 ± 30	mitad proximal de la tibia izquierda	Tibia partida por el centro de la diáfisis y cortada por la epífisis proximal. Color óptimo. Algo deshecha. Sin consolidantes ni tinta.

Tabla 24. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de La Requejada (San Román de Hornija, Valladolid). Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Únicamente las muestras que aparecen en la *Figura 27* fueron las procesadas en el desarrollo de esta tesis. El resto de muestras mencionadas en la *tabla 24*, fueron seleccionadas y procesadas anteriormente a la realización de esta tesis, por lo que no se dispone de fotografías ni información completa.

Figura 27. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de La Requejada.

El Cerro de la Cabeza

En el yacimiento del Cerro de la Cabeza (Ávila) se documentaron hasta 385 estructuras negativas (*Fabián-García y Blanco-González, 2012*) (Apartado 2.1.4.2). En 5 de esas fosas aparecieron enterramientos, 4 de ellos de época calcolítica y uno correspondiente al Bronce Final – Hierro I. De todos los restos hallados en el Cerro de la cabeza, únicamente hemos seleccionado muestras correspondientes a 2 individuos de la fosa correspondiente a la cultura Cogotas I. En la *Tabla 25* se recoge la información relativa a la selección muestral. Las fotografías correspondientes a cada muestra analizada se pueden observar en *Figura 28*.

INDVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1CC	1CC1	3050 ± 35	Tercer molar superior derecho	Pieza completa, sin fisuras roturas ni caries. El esmalte se rompió al extraer la muestra de la maxila. Raíz beige-amarilla y corona blanca. Suciedad adherida a la corona.
1CC	1CC2	3050 ± 35	Tercer molar inferior izquierdo	Pieza completa, sin roturas ni caries. Con una pequeña fisura a lo largo de la raíz. Raíz beige y corona blanca. Algo de suciedad adherida.
1CC	1CC3	3050 ± 35	Primer molar inferior izquierdo	Pieza completa, sin roturas, fisuras ni caries. El esmalte saltó al extraer la pieza. Pieza con algo de desgaste en la cara oclusal de la corona. Tierra adherida a la raíz.
2CC	2CC1	3095 ± 30	Primer molar inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas ni caries. Sin desgaste. Raíz beige oscuro y corona blanca, con algunas manchas oscuras-negras. Suciedad adherida.
2CC	2CC2	3095 ± 30	Segundo molar superior izquierdo	Pieza sin fisuras roturas ni caries. Con la raíz en crecimiento, abierta en la parte apical (en las 3 raíces no ha completado crecimiento. Raíz beige-amarilla y corona blanca.
2CC	2CC3	3095 ± 30	Incisivo superior izquierdo	Pieza completa con una fisura longitudinal en la corona y con la raíz abierta por no haber completado su crecimiento. Hay tierra incrustada en el hueco de la raíz. Presenta anotaciones en tinta.

Tabla 25. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cerro de la Cabeza. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

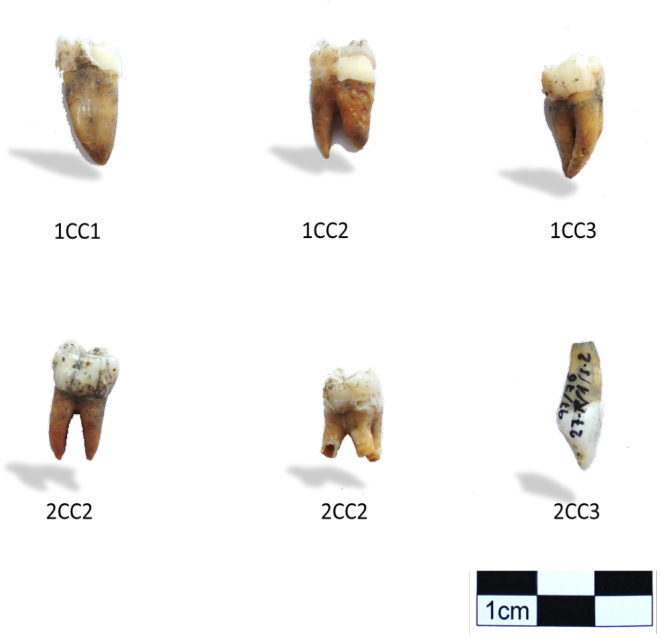


Figura 28. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cerro de la Cabeza.

Cantoblanco

El yacimiento de Cantoblanco (León) se sitúa dentro del horizonte cronológico y geográfico de la cultura de Cogotas I. Dentro de este yacimiento se recogieron muestras correspondientes a un único individuo. Las características de dichas muestras se recogen en la *Tabla 26* y en las fotografías de la *Figura 29*.

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1CB	1CB1	3123 ± 30	Tercer molar superior izquierdo	Pieza completa. Sin fisuras, roturas ni caries. Presenta un orificio minúsculo en el ápice de la raíz. Corona de color blanco y raíz beige claro. Bastante limpio. Sin consolidantes, ni siglado.
1CB	1CB2	3123 ± 30	Canino inferior izquierdo	Pieza completa, sin fisuras, roturas,ni caries. Coloración clara, beige claro-blanco en la corona y beige en la raíz. Presenta hipoplasia del esmalte. Bastante limpio. Presenta un cálculo adherido en la parte lingual de la corona. Sin consolidantes ni siglado.

Tabla 26. Detalle de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de Canto Blanco. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 29. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de Cantoblanco.

4.2.2.2.2 Edad Del Bronce Final – Transición Edad De Hierro

4.1.1.1.3.1 Yacimientos Del Soto Formativo Estudiados

Cerro de San Pelayo

Dentro de la cata B5 Nivel VII de este yacimiento salamantino se halló un conjunto de numerosos restos óseos animales, entre los cuales se identificaron algunos restos humanos muy fragmentados y mal conservados. Entre los restos humanos hallados destaca un fragmento mandibular, correspondiente a un individuo adulto de entre 35 y 45 años, de sexo indeterminable. Se encontraron algunos fragmentos óseos más, pero muy insuficientes para hacer una reconstrucción del esqueleto (*López-Jiménez y Benet, 2004*). Contando con esta escasez y mala conservación de los restos en este yacimiento, en la *Tabla 27* se resumen las características de la muestra seleccionada para llevar a cabo el análisis genético del individuo del Cerro de San Pelayo (En la *figura 30* se observan las fotografías de la muestra seleccionada).

INDIVIDUO	MUESTRA	DATACIÓN	TIPO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA
1SP	1SP1	2715 ± 30	Primer molar inferior derecho	Muy mala conservación. Muestra rota por la raíz. Presenta un avanzado desgaste de la corona, con exposición de la dentina, y alguna grieta leve. Mucha suciedad adherida, de color oscuro-marrón. La corona parece blanca, pero está muy desgastada. Raíz beige-clara.

Tabla 27. Relación de las muestras seleccionadas para análisis genético a partir de los restos hallados en el yacimiento de El Cerro de San Pelayo. Dataciones y características macroscópicas de cada muestra.

Figura 30. Fotografías de las muestras seleccionadas del yacimiento de El Cerro de San Pelayo

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Proceso Experimental Y Criterios De Autenticidad

Se seleccionaron 208 muestras correspondientes a 95 individuos diferentes procedentes de los 28 yacimientos descritos; de las que fueron analizadas 172. En todos los casos se trató de seleccionar al menos dos muestras a partir de cada individuo, pero esto no fue posible en todos los casos. Cuando no fue posible, se realizaron dos extracciones de ADN independientes a partir de fracciones diferentes de la misma muestra. En otros casos fue posible la obtención de más de tres muestras que se tomaron como posible reserva, ahí la causa de que se llevara a cabo el análisis de 172 muestras de las 208 iniciales.

Una vez seleccionada la muestra, el primer paso fundamental es llevar a cabo un adecuado registro de las características de la misma, así como su fotografiado. Hay que tener en cuenta que los protocolos más eficientes empleados para obtener ADN a partir de cualquier muestra ósea antigua, en la actualidad, son generalmente métodos destructivos (*Palomo-Díez et al, 2014*). De ahí la importancia de obtener toda la información morfológica, paleopatológica, antropológica, etc. necesaria, previa al análisis genético. Existen, no obstante, algunos métodos de procesamiento no destructivo para el análisis de ADN antiguo (*Hofreiter, 2012; Molhandesan et al., 2012*). Dentro de esta misma Tesis se ha probado alguna de estas metodologías por lo que las aportaciones sobre este tema se apuntarán más adelante (apartado 4.2.2.4.1.1).

Una vez seleccionadas las 2 muestras por cada individuo, se ha llevado a cabo el procesamiento independiente de cada una de ellas, para impedir la contaminación cruzada y hacer más sólido el resultado. La principal idea de la selección doble de muestras consiste precisamente en eso: en realizar el proceso experimental por duplicado de manera independiente, de modo que al final del proceso se toman como válidos únicamente aquellos resultados que sean idénticos en las 2 muestras procesadas para cada individuo, cumpliendo así uno de los criterios de autentificación de los resultados (*Pääbo et al, 2004*) (apartado 1.1.3 de la introducción). No solamente se ha llevado a cabo el análisis por duplicado de cada individuo en el mismo laboratorio y por la misma persona, sino que además un amplio número de las segundas muestras seleccionadas (concretamente de 31 individuos), fueron procesadas en un laboratorio diferente y por la misma persona. El laboratorio principal fue el Laboratorio de Genética Forense y Genética de Poblaciones del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid (denominado también a partir de ahora Laboratorio 1). El segundo laboratorio, dónde la investigadora principal que opta al grado de Doctor, realizó una estancia de 3 meses y medio durante el desarrollo de su Tesis, fue el Laboratorio para el Estudio del ADN antiguo de la Facultad de Biología en la Universita degli estudi di Roma Tor Vergata (al que llamaremos Laboratorio 2).

El proceso experimental fue llevado a cabo por duplicado en todos los individuos estudiados. Para ello, siempre que fue posible disponer de suficientes muestras, se realizó a partir de 2 muestras diferentes del mismo individuo. Sin embargo, en algunos casos el registro osteológico era limitado y únicamente se pudo seleccionar una muestra para realizar el análisis genético; en estos casos, se replicó el proceso experimental a partir de 2 fracciones diferentes de la misma muestra.

En la *Figura 31* se muestra un esquema general del proceso experimental llevado a cabo, en el cual se señala la realización de todo el proceso experimental por duplicado con cada una de sus fases (*Figura 30*).

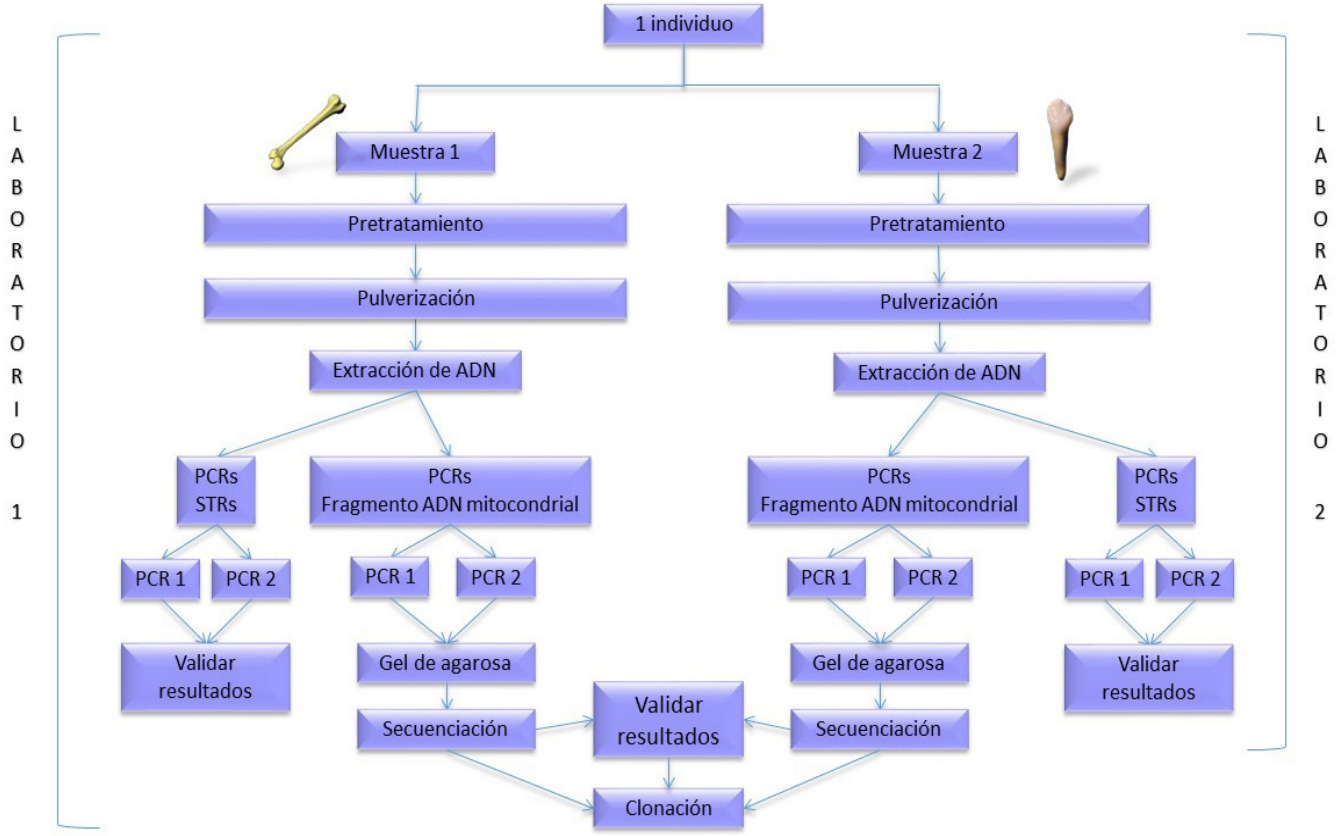


Figura 31. Esquema del proceso experimental completo llevado a cabo en los 2 laboratorios implicados.

Existen una serie de criterios de trabajo que se han cumplido en ambos laboratorios a lo largo de todo el proceso, cuya principal misión es la de evitar la contaminación de la muestra, ya que el ADN antiguo es muy susceptible de ser contaminado. Los criterios de autenticidad que se han cumplido en la realización de esta tesis son los siguientes (*Pääbo et al, 2004; Hummel, 2003; Fulton, 2012*).

1. Relativos a las instalaciones e infraestructura: En las *figuras 31 y 32* es posible observar la distribución de los 2 laboratorios con sus diferentes espacios.

    a) Los laboratorios dónde se realiza el pretratamiento de la muestra y la trituración; así como el laboratorio de extracción de ADN antiguo y el de amplificación; están formados en los 3 casos por salas aisladas e independientes. Los procesos post-PCR se realizan en un laboratorio físicamente separado de los 3 anteriores.

    b) Las salas aisladas son exclusivas para el análisis de ADN crítico, no trabajando bajo ningún concepto y en ningún caso con muestras modernas dentro de esos laboratorios.

    c) Las 3 salas son de acceso restringido a un número mínimo de personas, de las que se dispone del perfil genético.

    d) Las salas aisladas están dotadas de radiación Ultravioleta, que se conecta siempre antes y después de cada tratamiento realizado.

2. Relativos a la metodología empleada:

    a) Antes y después de cualquier intervención en cualquiera de las salas, tanto las superficies, aparatos como el material empleado es limpiado con lejía y etanol diluidos al 70%.

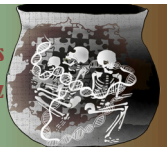
    b) Se realiza un tratamiento de eliminación de la capa superficial de la muestra para su posterior procesamiento. De este modo se eliminan posibles sustancias contaminantes adheridas a la superficie de la muestra. Este proceso se realizó de manera diferente en cada uno de los laboratorios, y se explica con mayor precisión posteriormente (apartado 4.2.2.2).

    c) Los laboratorios asilados disponen de una antesala en la que el investigador se cubre con buzo, calzas, guantes, mascarilla, gorro y gafas. Utilizando el vestuario adecuado y específico para cada sala siempre que se acceda a ella, y jamás la ropa de la calle.

    d) El flujo de trabajo siempre se ejerce desde la sala de pretratamiento-trituración, hacia la de extracción y finalmente la de amplificación; jamás en sentido contrario. Por ejemplo, una vez realizada cualquier actividad que implique acceder a la sala de PCR, el investigador no accederá a ninguna de las otras salas. El resto de actividades (secuenciación, clonación bacteriana, etc.) que se llevan a cabo en el laboratorio "general" de ADN moderno no podrán realizarse nunca antes de acceder a los laboratorios aislados.

    e) Empleo de controles o blancos: Durante la extracción y la amplificación de ADN siempre se han utilizado blancos. En cada extracción un blanco, y en cada amplificación por PCR hasta 3 blancos.

    f) El material empleado en cada sala es exclusivo de la sala en cuestión. Siempre que es posible se utiliza material desechable y cuando no lo es, el material se limpia con lejía y etanol al 70% y se



radia con luz UV.

g) Utilización de material estéril libre de ADNasas y ARNasas.

h) Durante la amplificación de ADN se han empleado diferentes parejas de cebadores. Es decir para la amplificación de un mismo fragmento se han utilizado distintos primers que amplifiquen fragmentos más cortos solapantes entre sí. De este modo se detecta y evita la amplificación de pseudogenes insertados en el ADN nuclear (NUMTs) (*Cooper y Poinar, 2000*), así como posibles haplotipos quiméricoso contaminaciones.

i) El proceso experimental completo es llevado a cabo por un único investigador, de este modo se minimizan las fuentes de contaminación.

1. Relativos a la interpretación de los resultados:

   a) Se han comparado los perfiles genéticos obtenidos con los del personal del laboratorio y personal implicado en los trabajos arqueológicos y antropológicos, así como con los blancos. De este modo se excluyen posibles contaminaciones.

2. Relativos a la reproducibilidad de los resultados:

   a) Se han realizado al menos 2 extracciones independientes de 2 muestras de cada uno de los individuos estudiados. Y al menos 2 PCRs por marcador analizado a partir de cada extracto. Únicamente se han considerado válidos los resultados reproducibles.

   b) Se han replicado los experimentos dentro del mismo laboratorio.

   c) Atendiendo a los recursos y el tiempo de que se disponía, ha sido posible llevar a cabo la replicación de un total de 31 individuos en 2 laboratorios diferentes.

A continuación se especifican los protocolos experimentales realizados en cada uno de los laboratorios.

4.2.2 Protocolos Empleados En Los Dos Laboratorios

4.2.2.1 Características Generales De Los Laboratorios

4.2.2.1.1 El Laboratorio De Genética Forense Y Genética De Poblaciones De La Universidad Complutense De Madrid (Laboratorio I)

Este laboratorio se ubica en el Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina, en la Universidad Complutense de Madrid. Consta de 2 salas independientes asiladas y de acceso restringido, destinadas a la extracción y amplificación de ADN antiguo de manera exclusiva. Así como de un tercer laboratorio en el cual se llevan a cabo las fases experimentales posteriores a la PCR. En la *Figura 32* podemos observar un esquema básico de la distribución de salas de este laboratorio.

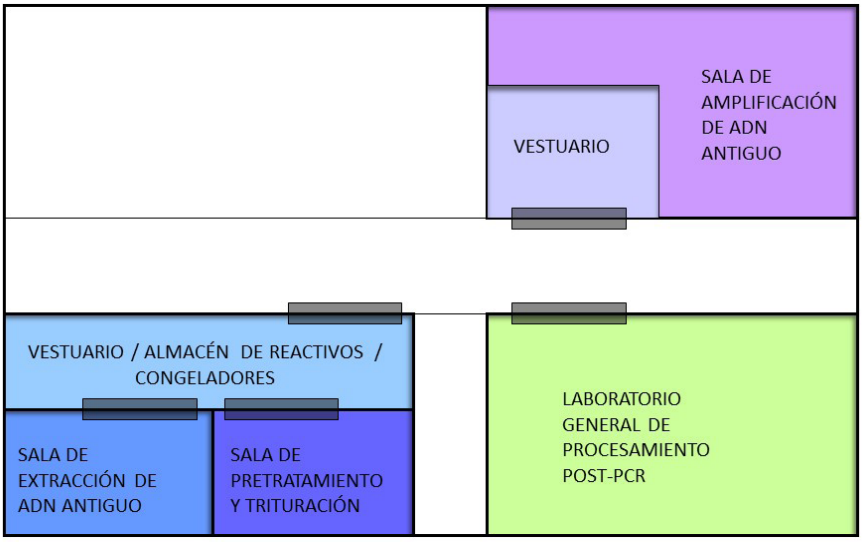


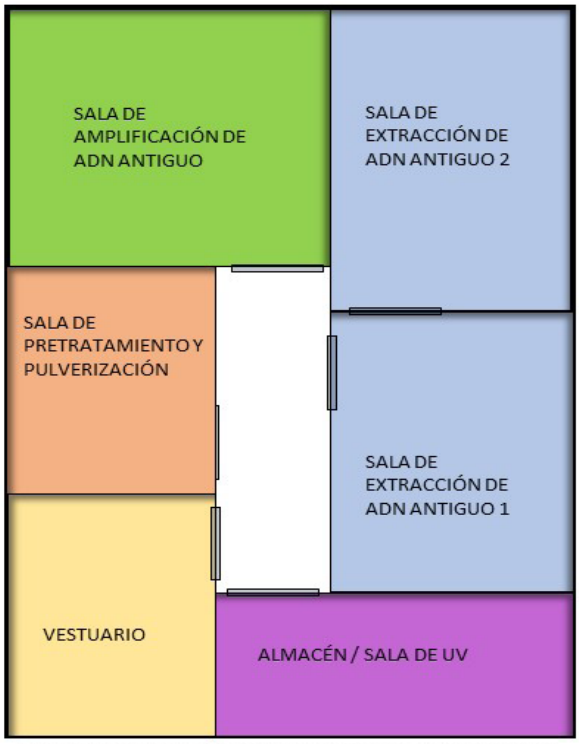
Figura 32. Plano esquematizado de la distribución de salas del laboratorio de Genética Forense y Genética de poblaciones de la Universidad Complutense de Madrid.

En la *figura 32* podemos observar que el primer área de trabajo (coloreado en azul), en el cual se lleva a cabo el pretratamiento y la extracción de ADN está físicamente separado del área de PCR (en color violeta) en el cual se realiza la amplificación por PCR. Finalmente, en color verde y también separado de las otras 2 regiones, aparece el área de trabajo post-PCR. En esta última área, en la que el riesgo de contaminación es mucho menor que en las otras, se llevan a cabo todos los procedimientos posteriores a la amplificación, tales como geles de agarosa, secuenciación, clonación, etcétera.

4.2.2.1.2 El Laboratorio Para El Estudio Del ADN Antiguo De La Universidad Tor Vergata De Roma (Laboratorio 2)

En el Laboratorio para el estudio del ADN antiguo de la Universidad Tor Vergata de Roma, Italia, todo el proceso experimental desde el pretratamiento hasta la mezcla de PCR fue llevado a cabo en las salas aisladas habilitadas exclusivamente para este fin; que se sitúan en la Villa Mondragone, en la localidad Romana de Monteporzio. Los procesos llevados a cabo tras la PCR se desarrollaron en el laboratorio de antropología molecular localizado en la propia Universidad Tor Vergata, a unos 30 kilómetros, en Roma.

Al igual que en los laboratorios de Madrid, el laboratorio de ADN antiguo está completamente separado de los laboratorios de ADN moderno, y del mismo modo dispone de una serie de salas aisladas destinadas a cada uno de los diferentes procesos experimentales. En la *Figura 33* podemos observar la distribución del laboratorio de la Universidad Tor Vergata; que presenta 2 áreas muy aisladas: el área pre-PCR y de PCR (a la izquierda), por un lado, y el área del laboratorio general de procesamiento post-PCR (a la derecha, en amarillo) (*Figura 33*).



Laboratorio para el estudio del ADN antiguo. Ubicado en Villa Mondragone (Monteporzio).

Laboratorio General ubicado de Antropología Molecular. Ubicado en la Facultad de Biología de la Universidad Tor Vergata de Roma.

Figura 33. Plano esquematizado de los laboratorios de la Facultad de Biología de la Universidad Tor Vergata de Roma.

4.2.2.2 Pretratamiento De Las Muestras

4.2.2.2.1 Pretratamiento En El Laboratorio I

Tras la llegada de la muestra al laboratorio y su registro, su procesamiento comienza con una limpieza para eliminar posibles moléculas contaminantes adheridas a su superficie (*Kaestle, 2002; Hummel, 2003*). Para llevar a cabo este proceso existen diferentes técnicas, pero en este caso se ha empleado un procedimiento físico que consiste en la eliminación de aproximadamente medio milímetro de capa superficial de la muestra mediante abrasión con óxido de aluminio. Esto se ha realizado mediante una arenadora (*Dentalfarm Base 1 Plus)* (*Figura 33*) que consta de una cámara dotada de presión positiva (*Hummel, 200*3).

Tras la abrasión, las muestras fueron radiadas con luz ultravioleta en un Crosslinker (*Figura 34*). La radiación ultravioleta crea dímeros de timina en el ADN que pudiera quedar localizado en la superficie de la muestra. Estos dímeros impiden la amplificación del ADN por PCR, de modo que si quedara algún contaminante remanente o se hubiera introducido alguno durante el proceso de limpieza, quedaría neutralizado de este modo. Tras la radiación, las muestras son guardadas en un recipiente estéril y almacenadas a menos 20ºC para preservar el ADN (*Fulton, 2012*) o directamente se procede a su pulverización para continuar con el proceso.

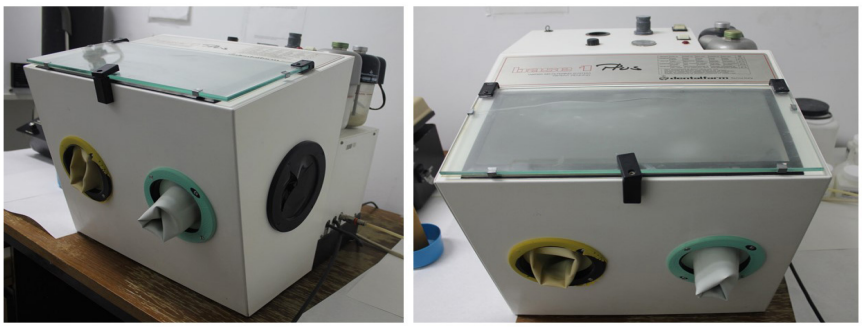
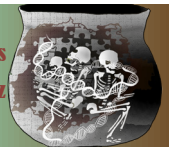


Figura 34. Arenadora Dentalfarm Base 1 Plus

Figura 35. Crosslinker



4.2.2.2.2 Pretratamiento En El Laboratorio 2

El pretratamiento utilizado en este caso fue una limpieza superficial de la muestra mediante la utilización de bisturí esterilizado, previamente limpiado con etanol y lejía diluidos al 70% y radiado con luz ultra violeta. La limpieza consiste en un raspado de la superficie de la muestra para eliminar la suciedad adherida. Esa primera eliminación de la capa superficial, se completó con la radiación de la muestra con luz ultravioleta durante 24 horas.

4.2.2.3 Pulverización

4.2.2.3.1 Pulverización En El Laboratorio 1

Para poder realizar la extracción de ADN, la forma más eficiente de hacerlo es a partir de una porción de polvo de la muestra, ya que de este modo se aumenta la superficie expuesta a la extracción de ADN (*Kaestle 2012*), a pesar de que se han llevado a cabo intentos de extracción no destructiva de ADN antiguo (*Hofreiter, 2012; Molhandesan et al., 2012*).

Existen diversos métodos para obtener polvo a partir de la muestra ósea o dental. En este caso hemos utilizado un molino refrigerado con nitrógeno líquido (*SPEX Model 6700*) (*Figura 35*). En el molino se introduce un vial de plástico crio-resistente cerrado en sus extremos con 2 tapones de tungsteno (wolframio o volframio) que encierran la muestra junto a un percutor del mismo material (*Figura 35*). El molino en funcionamiento, por un sistema de imanes, consigue mover el percutor a gran velocidad provocando la pulverización de la muestra.

A excepción de las muestras procedentes del yacimiento de Los Tolmos (primeras en procesarse), cuya extracción se realizó a partir de 500mg de polvo de diente o hueso; en el resto de los casos ha sido suficiente la obtención de 250mg de polvo para realizar la extracción de ADN.

Una vez obtenido el polvo, este se almacenó en su correspondiente tubo *falcon* estéril a -20ºC para preservar el ADN (*Fulton, 2012*).

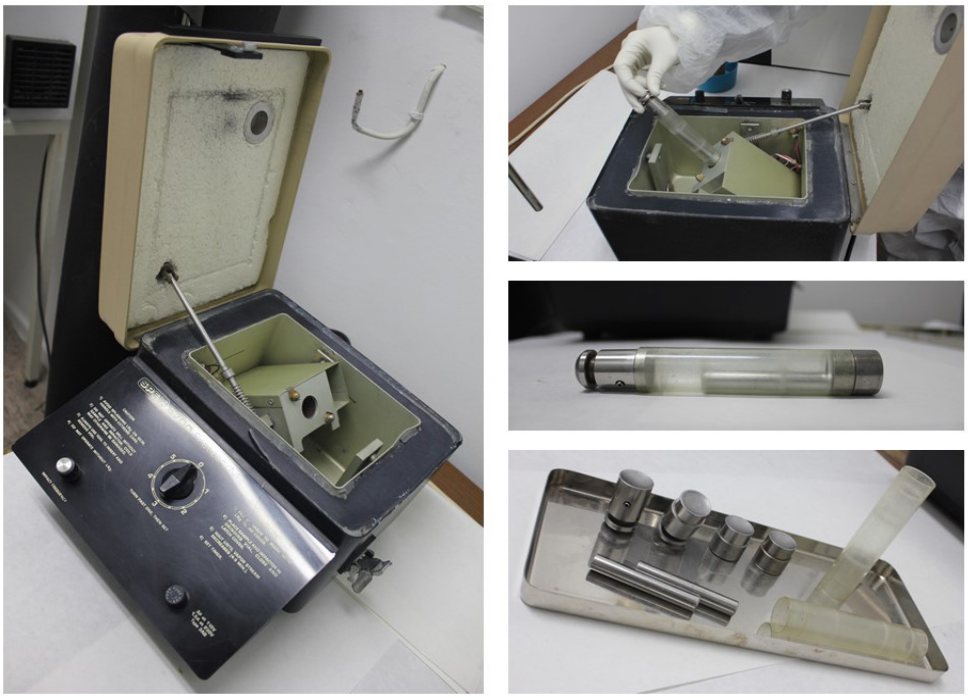
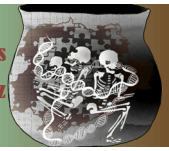


Figura 36. Molino refrigerado con nitrógeno líquido. A la izquierda aparece el molino. En la parte inferior y meda de la derecha se observan los viales, los tapones y los percutores.

4.2.2.3.2 Pulverización En El Laboratorio 2

La pulverización fue llevada a cabo de 2 modos diferentes en función del tipo de muestra y su dureza. Cuando se trataba de huesos, o piezas no demasiado duras pudo ser suficiente su trituración mediante el empleo de un mortero de ágata. Sin embargo, en la mayoría de los casos la obtención de polvo de hueso o diente se realizó mediante un taladro odontológico, siendo este proceso ligeramente más rápido y obteniendo un polvo más fino que con el mortero.

En cualquier caso la obtención de polvo tuvo que ser al menos de 500mg, que fue la cantidad empleada para realizar las extracciones mediante este segundo protocolo empleado en el laboratorio 2.



4.2.2.4 Extracción De ADN

4.2.2.4.1 Extracción De ADN En El Laboratorio I

El protocolo de extracción se basa en la utilización de sílica combinada con tiocianato de guanidina (GnSCN) (*Rohland and Hofreiter, 2007a; Rohland and Hofreiter, 2007b; Rohland and Hogreiter, 2009*). La utilización de este protocolo conlleva preparar un conjunto de soluciones que se irán empleando a lo largo del proceso.

En primer lugar se requiere un buffer de extracción o solución de lisis. Este preparado contiene proteinasa K (Con una concentración final de 0,25 mg/ml), EDTA 0,5 M (con una concentración final 0,45 M) y agua estéril Braun. 5 ml de esta solución se añaden al polvo de hueso o diente y se incuban durante 24 horas a 37ºC en movimiento y oscuridad en un horno de hibridación (*Hybridization oven HB-500 Minidizer, UVP*). Durante este tiempo la solución de extracción consigue lisar las células del hueso, liberando todos los componentes celulares. Una vez finalizada la incubación, se centrifuga la mezcla para separar el polvo remanente (que ya contendrá únicamente materia mineral o al menos tendrá bajo contenido en componentes orgánicos) de la fase líquida que contiene los lisados celulares en suspensión. El polvo sobrante se reserva por si fuera necesaria una segunda extracción, a pesar de que su contenido en ADN será inferior al primero. El proceso experimental continúa con el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido es mezclado con 2 componentes nuevos. El primero de ellos serán 100 µl de sílica, que actuarán como fase sólida. Es decir, la sílica va a ejercer de “filtro” o “tamiz” para separar el ADN del resto de componentes celulares. Para que la sílica surta efecto, necesitamos un agente que permita la unión del ADN a ella, este agente es el denominado *Binding buffer*. El *Binding buffer* está compuesto por Tiocianato de guanidina (GnSCN) 6M (con una concentración final 5M), acetato de sodio 3M pH 5,2 (cuya concentración final es 0,3M) y agua esteril. El GnSCN es un compuesto que actúa degradando y liberando proteínas, además evita la actuación de enzimas ADNasas y ARNasas por desnaturalización, que de lo contrario podrían dañar el extracto.

Una vez mezclado el sobrenadante resultado de la fase de lisis, con la sílica y el *Binding Buffer*, se incuba durante 2 horas a 37ºC y oscuridad en un horno de hibridación (*Hybridization oven HB-500 Minidizer, UVP*). Durante este periodo se consigue unir las moléculas de ADN a la sílica.

Hay que destacar que la utilización de sílica ofrece una ventaja sobre el protocolo clásico de extracción fenol/cloroformo, y esta ventaja se debe a que todos los compuestos que no se unen a la sílica van a ser retirados y no van a terminar en el extracto final de ADN, lo cual es una gran aportación para evitar la coextracción de inhibidores de la PCR, que no se conseguían eliminar con otros protocolos (*Keastle, 2012*).

Tras la incubación de la mezcla, y una vez unido el ADN a la sílica, el próximo paso va a ir encaminado a

retirar todos los componentes celulares que no nos interesan (Proteínas, lípidos, compuestos minerales, etc.). Para ello debemos crear una solución más, en este caso el denominado *washing buffer*, o solución de lavado. Esta solución está formada por etanol absoluto (que en la solución final estará al 50% de su concentración inicial), cloruro de sodio 5M (con una concentración final de 125 mM) y Tris 1,5 M (concentración final de 10mM). Por lo general, se han llevado a cabo los lavados de la sílica con esta solución de lavado, con los que se ha conseguido retirar todos los compuestos de la mezcla. En aquellos casos en que se observe un color turbio en los distintos lavados, es posible llevar a cabo un tercer lavado, pero no es lo habitual. Tras este paso se deja secar completamente la sílica, hasta que no quede nada de *washing buffer* en ella.

El paso final de la extracción, es la elución. Es decir, la liberación del ADN puro y limpio. Para ello utilizamos el último reactivo, TE (Tris 100mM y EDTA 50mM pH8), y su función, como ya se ha mencionado, es la elución, solubilizando el ADN y protegiéndolo contra la degradación. El extracto final obtenido es de 60 µl que son almacenados a -20ºC en oscuridad para una buena conservación (*Hummel, 2003*).

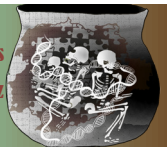
Todo el proceso de extracción se ha llevado a cabo en cabina de seguridad biológica con flujo laminar (Modelo: *Top Save 1.2 Euro Clone*).

4.2.2.4.1.1 Extracción No Destructiva De ADN

En el ámbito de la arqueología es importante preservar la conservación de las piezas, ya que se trata de elementos únicos e irrepetibles. Esto hace que sea importante avanzar en las técnicas que permitan obtener la mayor cantidad de información posible destruyendo solamente lo imprescindible. Por ello, se ha llevado a cabo una prueba experimental con 5 individuos. En ellos se ha procesado una tercera muestra para probar un protocolo de extracción no destructiva. El protocolo empleado se desarrolla exactamente igual que el anterior (*Rohland and Hofreiter, 2007a; Rohlan and Hofreiter, 2007b; Rohland and Hofreiter, 2010*), con la excepción de que se realiza con la muestra completa. Se lleva a cabo la limpieza superficial de la muestra y su radiación con luz UV, pero no se tritura. De modo que en el primer paso del ensayo se añade la solución de lisis directamente sobre la muestra.

Teniendo en cuenta que la lisis celular será más compleja mediante este protocolo debido a que las células están menos expuestas a la actuación de la solución de extracción y más concretamente a la proteinasa K, hemos probado 2 protocolos, variando únicamente el tiempo de incubación de la solución de lisis. La primera prueba se realizó con un tiempo de incubación similar al de la extracción destructiva (24 horas), y la segunda se prolongó durante 48 horas.

Esta prueba de extracción no destructiva se ha realizado únicamente sobre 4 individuos que mostraron resultados muy eficientes tanto con el protocolo de extracción del laboratorio 1 como del laboratorio 2,



y de los cuales se disponía de una tercera muestra. Por esa razón se procesó esa tercera muestra de cada uno de esos 4 individuos con la finalidad de realizar una extracción no destructiva y poder comprobar sus resultados en comparación con los de los protocolos destructivos.

En todos los casos se obtuvo extracto de ADN, sin embargo a pesar de no destruir la muestra, las características macroscópicas de la misma variaron mucho antes y después de la prueba; para valorar esas diferencias, se tomaron fotografías de cada una de las muestras procesadas antes y después de llevar a cabo la extracción de ADN (Ver *Figura 49*). Los resultados obtenidos serán expuestos y discutidos posteriormente (ver apartado 5.1.5.2)

4.2.2.4.2 Extracción De ADN En El Laboratorio 2

Al igual que en el Laboratorio 1, la extracción de ADN ha sido llevada a cabo en cabina de flujo laminar. En este caso la extracción se ha realizado mediante el kit comercial de purificación de productos de PCR, *QIAquick PCR Purification Kit®* (*Qiagen, USA)*. A continuación se describe el protocolo empleado:

1. Descalcificación del polvo de hueso o diente. Para ello se puede añadir de 2-8 ml de EDTA 0,5M pH8 al polvo. El EDTA es utilizado para disolver los componentes minerales del hueso, y actúa "secuestrando" los iones metálicos.
2. Al igual que en el protocolo empleado en la Universidad de Madrid, en segundo lugar se realiza una digestión o lisis celular. Para ello se emplean 2 ml de buffer de extracción, compuesto por EDTA 0,5 M pH5, SDS al 10% y proteínasa K (20mg/ml). Esta mezcla se incuba durante 2 días: 24 horas a 55ºC y 24 horas más a 37ºC.
3. Extracción de ADN propiamente dicha:
   a. El primer paso es llevar a cabo una centrifugación de la solución de lisis o extracción durante 15 minutos a 4000 rpm, y el sobrenadante resultante de la centrifugación se transfiere a un nuevo tubo falcon de 15 ml.
   b. Al sobrenadante se le añaden 5 volúmenes del buffer PB del kit. Para la cantidad de sobrenadante que hemos obtenido nosotros en la mayor parte de los casos este volumen era aproximadamente de 7,5 ml.
   c. De la mezcla anterior se transfieren de 600 a 700 µl a una columna QIAquick del kit, incorporada a un tubo colector.
   d. Se centrifuga la mezcla durante 2 minutos a 15800 rpm.
   e. Tras la centrifugación se descarta el contenido derramado al tubo colector y seguimos trabajando con la misma columna, que ya tendrá atrapado el ADN en su filtro.

f. Los últimos 3 pasos se repiten cuantas veces sea necesario hasta finalizar el volumen total del tubo falcon. Siempre para cada vez se utiliza un tubo colector nuevo y limpio.

g. Una vez se ha filtrado todo el contenido del falcon, la columna se coloca en un nuevo tubo colector y se le añaden 750 µl del reactivo PE del kit (habiendo agregado previamente a este PE etanol).

h. Se centrifuga durante 2 minutos a 12500 rpm, se limpia el tubo colector y se repite la centrifugación durante 2 minutos más.

i. Se añaden 100 µl del reactivo EB en la columna para llevar a cabo la elución del ADN, habiendo colocado la columna previamente en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml. Se deja que el EB repose en la columna durante 1 minuto a temperatura ambiente y después se centrifuga durante 2 minutos a 12500 rpm. De este modo finalmente obtenemos 100 µl de nuestro extracto de ADN, que se almacena a -20ºC.

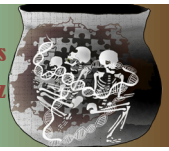
4.2.2.5 Amplificación

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica bien conocida y empleada en todo el campo de la biología molecular. Esta técnica descrita en 1985 por Kary Mullis (*Mullis and Faloona, 1987*), teóricamente consiste en un procedimiento a partir del cual podemos obtener un billón de copias de un fragmento de ADN de interés a partir de una única molécula tras 30 ciclos de PCR (*Buttler, 2005*). Sin embargo, en la práctica, cuando nos enfrentamos a una muestra con baja cantidad de ADN, que además se encuentra muy fragmentado, como ocurre en las muestras de origen arqueológico, esta teoría no suele funcionar tan fácilmente. Por esta razón, cuando realizamos una PCR sobre muestras antiguas o críticas, tomamos una serie de medidas, añadidas a las ya explicadas anteriormente para evitar contaminación. Estas medidas van encaminadas a maximizar las posibilidades de amplificación de ADN, aunque varían en función del marcador de interés. A rasgos generales son:

1. Amplificación de fragmentos solapantes de pequeño tamaño molecular: De este modo se aumentan las posibilidades de amplificación, y posteriormente se reconstruyen fragmentos de mayor longitud mediante la unión de las secuencias cortas. Los fragmentos que suelen conseguirse como máximo son de no más de 300 pb en ADN mitocondrial y de 200 pb en ADN nuclear; aunque varían en función del estado de preservación de la muestra. Además esta técnica supone el empleo de distintas parejas de cebadores para la amplificación de un mismo fragmento, lo cual nos va a permitir detectar y evitar la amplificación de pseudogenes insertados en el ADN nuclear (NUMTs) (*Cooper y Poinar, 2000*), así como posibles haplotipos quiméricos o contaminaciones.

2. Emplear kits específicos para muestras críticas. Una de las características típicas de estos kits es la utilización de Taq polimerasa Hot-start, que es más estable.

3. Aumento del número de ciclos de la PCR. De este modo se incrementa la posibilidad de conseguir más número de copias. Esto debe hacerse de una forma moderada, ya que un aumento excesivo del número



de ciclos también va a favorecer la amplificación de contaminantes así como la aparición de artefactos en los electroferogramas.

Algo muy importante a tener en cuenta, es que si no se han tomado las medidas adecuadas para evitar la contaminación con ADN exógeno; al utilizar estas estrategias de amplificación de ADN crítico, también aumenta la posibilidad de amplificar ADN exógeno contaminante. Por ello en todas las PCRs llevadas a cabo se han procesado en paralelo blancos para controlar este fenómeno.

Además de los problemas hasta aquí mencionados, hay que tener en cuenta que las muestras de ADN crítico frecuentemente muestran fenómenos de daño molecular, provocados por alteraciones postmortem. Estas alteraciones pueden generar cambios de bases nitrogenadas que podrían ser confundidos con mutaciones. Para poder detectar estas alteraciones y distinguirlas de una verdadera mutación, es esenciar obtener resultados reproducibles.

El ADN crítico además con frecuencia sufre una serie de fenómenos denominados estocásticos, esto es especialmente importante en el análisis de Short Tandem Repeats (STRs) de ADN nuclear; y se hará referencia a ello cuando lleguemos a ese apartado (apartado 4.2.3.3.2.1).

Todas las PCRs realizadas en el laboratorio 1, se hicieron en un Termociclador Multigene II (Labnet®, modelo: TC050A-230V), y en el laboratorio 2 se utilizaron termocicladores: Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2720 y Applied Biosystems Gene Amp PCR System 9700. En todos los casos se trataba de termocicladores utilizados exclusivamente para la amplificación de ADN antiguo.

4.2.2.5.1 Amplificación De ADN Mitocondrial

La amplificación de ADN mitocondrial ha sido realizada con los mismos primers y protocolo de PCR en los 2 laboratorios implicados (Universidad Complutense de Madrid y Universidad Tor Vergata de Roma). Este ha sido el único marcador analizado en ambos laboratorios, siendo el resto (marcadores autosómicos, cromosoma X y cromosoma Y) analizados exclusivamente en el Laboratorio 1.

A la hora de trabajar con ADN crítico la amplificación de fragmentos de tamaños moleculares largos no es posible mediante una única PCR, y por esa razón se emplea la amplificación de fragmentos cortos solapantes entre sí. La ruptura de las cadenas de ADN genera este efecto, que se ve incrementado cuanto mayor es el daño sufrido por la molécula. Es decir, una molécula de ADN muy dañada tendrá fragmentos moleculares más cortos que una molécula menos dañada en la cual será posible la amplificación de fragmentos moleculares de mayor longitud.

La amplificación de ADN mitocondrial se ha llevado a cabo en 2 fases. La primera para la amplificación de

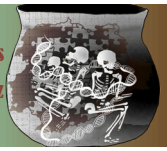
fragmentos solapantes de la Región Hipervariable I (HVI) del D-loop mitocondrial (o región de control), y la segunda para la Región Hipervariable II (HVII).

Las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de HVI son los creados y utilizados por Fernández E. en su tesis doctoral (*Fernández E., 2005*). Por otro lado, los *primers* empleados para la amplificación de HVII del ADN mitocondrial son de *Martínez-Labarga et al., 1999.* Todos ellos se recogen en la *Tabla 28*.

REGIÓN	NOMBRE	SECUENCIA DEL CEBADOR	POSICIONES DEL CEBADOR	FRAGMENTO AMPLIFICADO	POSICIONES AMPLIFICADAS POR REGIÓN
HVI	L16125 (*Fernández, 2005*)	5'-GCCAGCCACCATGAATATTG-3'	16106→16125	16106-16276 179pb	16106-16399 (293pb)
	H16259 (*Fernández, 2005*)	5'-ATCCTAGTGGGTGAGGGG-3'	16276→16259		
	L16251 (*Fernández, 2005*)	5'-CACACATCAACTGCAACTCC-3'	16232→16251	16232-16399 167pb	
	H16380 (*Fernández, 2005*)	5'-TCAAGGGACCCCTATCTGAG-3'	16399→16380		
HVII	L48 (*Martínez-Labarga et al, 1999*)	5'-CTCACGGGAGCTCTCCATGC-3'	29→48	29-190 161pb	29-408 (376pb)
	H170 (*Martínez-Labarga et al, 1999*)	5'-GTTCGCCTGTAATATTGAACG-3'	190→170		
	L100 (*Martínez-Labarga et al, 1999*)	5'-ATAGCATTGCGAGACGCTG-3'	82→100	782-307 225pb	
	H285 (*Martínez-Labarga et al, 1999*)	5'-GGGGTTTGGTGGAAATTTTTTTG-3'	307→285		
	L172 (*Martínez-Labarga et al, 1999*)	5'-ATTATTTATCGCACCTACGT-3'	153→172	153-408 255pb	
	H389 (*Martínez-Labarga et al, 1999*)	5'-CTGGTTAGGCTGGTGTTAGG-3'	408→389		

Tabla 28. Primers empleados para la amplificación de ADN mitocondrial

Tal como podemos observar la amplificación de HVI se ha realizado mediante 2 fragmentos solapantes de menos de 200 pares de bases, sin embargo, para la amplificación de HVII hemos amplificado hasta 3 fragmentos solapantes diferentes.



Para la definición de un perfil consenso válido, se han amplificado como mínimo por duplicado los 2 fragmentos de HVI a partir de 2 muestras de cada individuo. Es decir, se han obtenido al menos 8 amplificados por individuo (4 de cada fragmento). Considerando válidos solamente aquellos individuos que proporcionaban perfiles reproducibles. Del mismo modo se ha procedido en el caso de HVII, excepto en aquellos casos en los que la cantidad de extracto de ADN inicial no fuera suficiente. El procedimiento esquematizado es observable en la *Figura 30*.

Además de considerar la reproducibilidad de los resultados como un criterio fundamental para determinar un resultado válido, también se ha tenido en cuenta el sentido filogenético de los resultados. Es decir, el resultado obtenido debe presentar un sentido filogenético de acuerdo con la filogenia establecida para el correspondiente marcador en la población. Esto significa, que se ha considerado que el resultado obtenido en HVI debe ser coherente con el obtenido en HVII según las bases de datos de poblaciones conocidas.

Para la amplificación de ADN mitocondrial se ha empleado el Kit múltiplex de Qiagen®, que viene compuesto por una mezcla preparada con todos los componentes necesarios para la PCR (Taq polimerasa, dNTPs, buffer, $MgCl_2$, etc.). Los demás reactivos que se requieren son simplemente agua estéril y los *primers* o cebadores correspondientes a la región de interés (en este caso los de la *Tabla 27*). La *Taq* polimerasa que incluye este *kit* es *Hot Start PCR*; es decir, se caracteriza por no presentar actividad por debajo de una temperatura mínima de 95ºC que debe ser aplicada durante los 15 primeros minutos de la PCR, esta característica hace que sea muy estable a los cambios de temperatura. Las proporciones utilizadas en la reacción de PCR por cada muestra son de 9 µl de H_2O, 12,5 µl de kit múltiplex de Qiagen®, 0,25µl de cada primer a una concentración final 0,2mM y 3 µl de ADN. En aquellos casos en que se detectó un menor contenido de ADN en el extracto, se incrementó la cantidad de ADN en la mezcla de PCR, manteniendo la proporción final de componentes. Del mismo modo, en aquellos casos en que se detectó la posible presencia de inhibidores de la PCR en el extracto, se redujo la cantidad de extracto empleada en la reacción, diluyendo de este modo el efecto de inhibición.

Para la amplificación de los fragmentos de RHVI las condiciones de los ciclos de temperatura programados en el termociclador (*MultiGene II, Labnet®* y *Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700, 2720 y 9700*) fueron los siguientes:

- 95ºC → 15 minutos
- 94ºC → 30 segundos
- 55ºC → 1 minuto y 30 segundos
- 72ºC → 1 minuto
- 72ºC → 10 minutos
- 40 ciclos

En cuanto a la amplificación de los fragmentos de la región HVII, las condiciones variaron ligeramente:

- 95ºC → 15 minutos
- 95ºC → 30 segundos
- 60ºC→ 30 segundos
- 72ºC→ 30 segundos
- 72ºC→ 10 minutos
- 40 – 45 ciclos

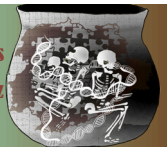
En todas las PCRs realizadas, además de las muestras de estudio, se procesaron en paralelo un control positivo al que se añadió ADN de buena calidad (siempre fuera de la sala de PCR antiguo) cuya misión es controlar el buen funcionamiento de los reactivos y el termociclador; y al menos 2 controles negativos, a los que se añadió agua estéril en lugar de ADN, para controlar la presencia de contaminación.

A pesar de utilizar un *kit* multiplex, que puede utilizarse para la amplificación simultánea de varios fragmentos de ADN, en este caso se ha realizado de manera independiente la amplificación de cada uno de los fragmentos de interés.

4.2.2.5.2 Amplificación De STRs Autosómicos

Los marcadores autosómicos se sitúan en las 22 parejas de cromosomas heredados de los progenitores. Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se han empleado 4 kits comerciales para el análisis de STRs autosómicos: Kit *AmpFISTR®MiniFiler™ PCR Amplification Kit* (denominado a partir de ahora MiniFiler), *AmpFISTR®NGM™ PCR Amplification Kit* (denominado a partir de ahora NGM), *AmpFISTR® NGM SElect PCR Amplification Kit* (denominado a partir de este momento NGM SElect) y *PowerPlex® ESX* (que se denominará a partir de ahora como ESX); los 3 primeros de la casa comercial *Applied Biosystems* y el último de *Promega*.

A diferencia del estudio de ADN mitocondrial, el análisis de STRs autosómicos no se ha realizado en la totalidad de individuos de esta tesis (94), sino tan solo en aquellos que por las características del enterramiento tiene un especial interés su estudio de relaciones de parentesco cercano. En este análisis se han incluido por tanto los individuos pertenecientes a enterramientos múltiples o colectivos de diversa índole. En cualquier caso, se llevó a cabo en primer lugar el análisis de ADN mitocondrial, y se procedió al estudio de STRs autosómicos solamente en aquellos casos en los que el ADN mitocondrial proporcionó un buen resultado. Esta medida se ha tomado por el hecho de que una muestra sin contenido en ADN mitocondrial o con muy bajo contenido, difícilmente contendrá suficiente ADN nuclear amplificable.



A continuación se exponen las principales características de los kits empleados y el protocolo de PCR empleado para cada uno de ellos.

- **Kit *AmpFISTR®MiniFiler™ PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems):** Este kit se creó a partir de 8 marcadores contenidos en el kit Identifiler® de la misma casa. En este caso el *kit* se diseñó para aumentar la eficiencia de la amplificación, siendo diseñado específicamente para muestras con bajo contenido en ADN y con longitudes menores de los amplicones (*Mullero, 2008*). Este kit incluye los marcadores: D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO, and FGA, además de un fragmento del gen de la amelogenina. Todos ellos están incluidos en el CODIS (*Combined DNA Integrated System*), referencia internacional para los marcadores utilizados en ciencias forenses. Este kit está constituido por una *Master mix*, que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR y un *Primer Set*, formado por el conjunto de parejas de *primers* de los distintos marcadores. Las proporciones de cada reactivo para una muestra de ADN fueron las siguientes:

  a) 5 µl de *Master mix*

  b) 2,5 µl de *Primer set*

  c) 5 µl de ADN

  El programa de termociclador para la reacción tenía los siguientes parámetros:

  d) 95ºC → 11 minutos

  e) 94ºC → 20 segundos

  f) 59 ºC → 2 minutos

  g) 72ºC → 1 minuto

  h) 30 ciclos

- ***AmpFISTR®NGM™ PCR Amplification Kit* y *AmpFISTR® NGM SElect PCR Amplification Kit* (Applied Biosystems):** Este kit, más moderno que el anterior pero de la misma casa comercial, contiene primers para la amplificación de 16 marcadores en el caso de NGM® y 17 en su versión extendida NGM Select®. Dentro del total de marcadores se encuentran 6 de los que ya eran analizados por su antecesor MiniFiler ® (AMEL, D16S539, D21S11, D18S51, D2S1338, and FGA), además de estos NGM® presenta: D10S1248, vWA, D8S1179, D22S1045, D19S433, TH01, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33. En este caso la mezcla de reacción para la PCR de una muestra contenía las mismas proporciones que el Kit de MiniFiler ®. En cuanto al programa del termociclador, existen algunas variaciones:

  a) 95ºC → 11 minutos

  b) 94ºC → 20 segundos

c) 59ºC → 3 minutos

d) 60ºC → 10 minutos

e) 29 ciclos

- ***PowerPlex® ESX* (Promega)**: Este último kit, perteneciente a otra casa comercial, amplifica 17 STRs: D10S1248, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D22S1045, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391, SE33, and AMEL, parcialmente compartidos con los 2 kits anteriores. Los protocolos para la preparación de la mezcla de reacción, así como el programa del termociclador, son similares a los de NGM® y NGMSelect®.

Las principales razones para emplear 3 kits diferentes en la obtención de STRs autosómicos ha sido aumentar el número de marcadores analizados (incrementando de este modo la posibilidad de obtener información) además de poder validar los resultados, y aportar mayor solidez al estudio.

4.2.2.5.3 Amplificación De STRs De Cromosomas Sexuales: X / Y

- **Cromosoma Y:** En la presente tesis no se ha realizado análisis de cromosoma Y con fines filogenéticos; sin embargo se ha empleado en algunos casos de parentesco cercano para solventar dudas acerca de alguna relación padre-hijo varón. Dado que el cromosoma Y incluye marcadores con elevada tasa mutacional (STRs), su estudio permite establecer relaciones de parentesco a lo largo de la línea paterna asociadas a probabilidades mucho más elevadas en el ADN mitocondrial. Sin embargo en este caso, los resultados del análisis de cromosoma Y han sido nulos, por lo que no se incluyen en los resultados de esta tesis.

Para ello, en esos casos concretos, hemos empleado el *kit* AmpFLSTR® Yfiler® PCR Amplification Kit (a partir de ahora denominado Yfiler) de la casa comercial Applied Biosystems. Las condiciones de PCR utilizadas para este análisis fueron:

a) 9,2 µl de Master mix

b) 5 µl de Primer set

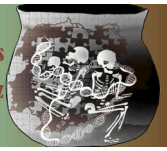
c) 0,8 µl de AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)

d) 5 µl de ADN

Y el programa de termociclador (Labnet®) las siguientes características:

a) 95ºC → 11 minutos

b) 94ºC →1 minuto



c) 61ºC → 1 minuto

d) 72ºC → 1 minuto

e) 60ºC → 1 minuto

f) 60ºC → 21 minutos

g) 30 ciclos

- **Cromosoma X:** Para el estudio de marcadores de cromosoma X se ha utilizado el X-Chromosome STR decaplex (*Gusmão et al, 2008; Gusmão et al, 2009*), consistente en un conjunto de pares de *primers* que se utilizaron con el *kit* multiplex de Qiagen. Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

  a) 5 µl de Kit multiplex de Qiagen.

  b) 1 µl de Primer set

  c) 3 µl de agua

  d) 4 µl de ADN

  En cuanto al termociclador, se programó con los siguientes parámetros:

  a) 95ºC → 15 minutos

  b) 94ºC → 30 segundos

  c) 60ºC → 1 minuto y 30 segundos

  d) 72ºC → 1 minuto

  e) 94ºC →30 segundos

  f) 58ºC → 1 minuto y 30 segundos

4.2.2.6 Detección De Productos De PCR Por Gel De Agarosa

De manera previa a la secuenciación, se ha comprobado el éxito de la PCR mediante la elaboración de un gel de agarosa. La electroforesis en gel de agarosa es una técnica relativamente fácil que consiste en la separación de moléculas de ADN en función de su tamaño (*Hummel, 2003*).

Para el análisis de los resultados de amplificación de ADN mitocondrial se fabricaron geles de agarosa al 2%, con 1 gramo de agarosa y 50 ml de medio TBE. Una vez mezclada la agarosa y el TBE, la disolución se calienta ya que es el único modo de que solubilice la mezcla. Una vez la mezcla sea homogénea se

deja enfriar para añadir 2,5 µl de un agente intercalante que aporte fluorescencia en presencia de luz ultravioleta a las cadenas de ADN, en este caso hemos utilizado *GelRed* o *Syber Safe*, en lugar de Bromuro de Etidio. Un vez mezclado se deposita la mezcla en un molde correctamente sellado y se le coloca el peine para que se formen los pocillos correspondientes dónde se incorporarán los amplificados de ADN, dejándolo enfriar durante aproximadamente 20 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo el gel habrá gelificado, adquiriendo una textura de gelatina. En ese momento se retira el sistema de sellado del molde y el peine, y se introduce el gel en la cubeta de electroforesis.

En cada uno de los pocillos se añaden 5 µl de amplificado mezclados con 2 µl de un buffer de carga compuesto por glicerol azul de bromofeno y xilen-cianol, que aporta color y consistencia al ADN para que sea más fácil su carga en el gel y su visualización.

Una vez cargado el gel, se conecta la cubeta a una fuente eléctrica aproximadamente con una corriente de entre 80 y 120 V durante media hora.

La corriente eléctrica hace que las moléculas migren a través del gel de agarosa a una mayor o menor velocidad en función de su tamaño molecular. De modo que el ADN migrará más o menos en función del número de pares de bases del fragmento que hayamos analizado. Como guía de esta migración disponemos del azul de bromofenol, que migra a través de la agarosa aproximadamente a la misma velocidad de un fragmento líneal de ADN bicatenario de unos 300 pb, y la del xilen-cianol puede equipararse a la de un fragmento de las mismas características pero de 4kb. En una electroforesis de estas características los productos de amplificación del presente trabajo, de entre 150 y 255 pares de bases, se situarían entre ambos frentes de colorante, más próximos al azul de bromofenol.

En el gel también se cargan los controles positivo y negativo, para controlar el buen funcionamiento de la PCR.

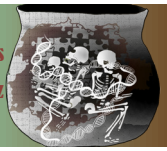
Tomaremos nota de las muestras que han dado positivo en el gel de agarosa (presencia de banda fluorescente) y se purificarán para seguir adelante con el proceso experimental.

En el caso de las amplificaciones de STRs, no se llevó a cabo ninguna detección previa de los productos de amplificado. Directamente se realizó la secuenciación y se analizaron los electroferogramas resultantes.

4.2.2.7 Purificación De Productos De PCR

Una vez amplificado el ADN debemos aislarlo del resto de componentes dela PCR (*primers*, dNTPs sobrantes, *buffers*, etc.) para poder secuenciarlo.

Existen distintos protocolos para aislar el producto de amplificación, pero en el desarrollo de este trabajo



se han empleado concretamente 2 métodos.

- Método 1: Utilización de un *kit* comercial de purificación de productos de PCR. El *kit* consiste en la utilización de una serie de columnas con un filtro que retiene el ADN y permite la eliminación del resto de componentes mediante sucesivos lavados. Una vez se han eliminado los componentes que no nos interesan, el ADN se libera del filtro de columna utilizando un agente eluyente, TE.
- Método 2: Utilización de la enzima ExoSAP. La mezcla de 3 µl del ADN amplificado, 3,5 µl de agua y 0,5 µl de la enzima, son suficientes para llevar a cabo este tipo de purificación. La mezcla se somete a 37ºC durante 15 minutos y otros 15 minutos se le aplican 80ºC en un termociclador. Tras el proceso disponemos de nuestro amplificado puro.

4.2.2.8 Secuenciación De Productos De Amplificado De ADN Mitocondrial Y Análisis De Fragmentos De ADN autosómico (STRs)

La secuenciación de los productos de PCR de ADN mitocondrial se ha realizado mediante secuenciación de Sanger (*Sanger et al. 1977*). Este tipo de secuenciación, básicamente requiere una segunda PCR como la primera con la diferencia de que esta es "asimétrica", es decir, en ella utilizamos un único *primer* o cebador, resultando en una amplificación lineal de una sola cadena del producto. Lo más importante de esta PCR es que además lleva una serie de fluorocromos incorporados que nos van a permitir visualizar un color particular en función de la base nitrogenada que lleve cada uno de los nucleótidos de la cadena amplificada. Esto se consigue no solo añadiendo dNTPs en la reacción, sino también terminadores multi-coloreados, dideoxinucleótidos (ddNTPs). En contra de los dNTPs que permiten una elongación regular, estos ddNTPs conducen a una inmediata terminación del paso de elongación. El resultado final observable en forma de electroferograma es una sucesión de picos de diferentes colores que representan la secuencia analizada (*Hummel, 2003*). La secuenciación de los productos de amplificado de esta tesis se han realizado en un secuenciador 3730 DNA Analyzer de Applied Biosystems.

En el caso del análisis de STRs autosómicos, los fluorocromos responsables de emitir los colores resultantes en los electroferogramas van directamente incorporados en los kits comerciales de ampificación utilizados, por ello no es necesaria la purificación de los productos de amplificación ni una segunda PCR para incorporar la fluorescencia a los fragmentos. En este caso el análisis de fragmentos se ha realizado en un secuenciador *ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems*) localizado en el Parque Científico de Madrid. Los resultados en este caso fueron analizados mediante el software *GeneMapper®* version 4.0.

4.2.2.9 Clonación Bacteriana

Teniendo en cuenta los recursos económicos del proyecto, así como el tiempo disponible, se realizó la clonación de 57 productos de amplificación de HVI, 32 de ellos del primer fragmento analizado (16106 – 16276) y 25 del segundo fragmento (16232 – 16399). Para llevar a cabo la clonación entre las muestras procesadas se seleccionaron aquellas que aportaban ciertas dudas tras la secuenciación, principalmente por la presencia de dobles picos; dado que la clonación es una técnica fundamental para resolver casos de este tipo y poder establecer el perfil correcto.

La clonación bacteriana es un procedimiento que permite la separación de secuencias de diferente origen que estén formando parte de un mismo producto de amplificado. Es frecuente que en algunos casos encontremos mezclas por contaminación entre los resultados obtenidos, en estos casos la clonación bacteriana es un método para poder separar las secuencias endógenas de las contaminantes y determinar cuál es cual.

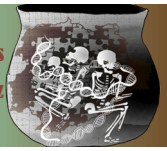
La clonación bacteriana se basa en la inserción del ADN amplificado en un vector de clonación o plásmido, con el que se trasforman células de la bacteria *E. coli*. El mecanismo de clonación hace que cada vector incorpore un único inserto y que cada bacteria incorpore un único vector. Una vez infectada la bacteria, ésta se multiplica, reproduciendo a la vez el ADN incorporado como si fuera suyo. Así, cada colonia bacteriana, descendiente de la original, contendrá copias idénticas de cada molécula de ADN presente en la PCR.

Para llevar a cabo la clonación bacteriana, se ha empleado el kit *TOPO® TA Cloning®* de *Life Technologies*. A continuación se detalla el protocolo utilizado.

El primer paso para llevar a cabo la clonación es la preparación de una serie de medios de cultivo que vamos a necesitar a lo largo del proceso. Es necesario preparar tanto medio LB líquido como LB-agar. En ciertos casos también se requiere la preparación de SOC-medium, pero cuando se emplea el kit TOPO® TA Cloning® no es necesario, ya que el SOC-medium viene incluido entre los reactivos del kit.

1. Preparación LB líquido: se mezclan 5 g de triptona, 2,5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl, diluyéndolo en aproximadamente 250 ml de agua estéril. Se mezcla y se ajusta el pH a 7,5. Una vez ajustado, se añade agua hasta 500 ml. La mezcla se autoclava y una vez autoclavada y fría se añade 1 ml de ampicilina/carbenicilina a 50mg/ml (diluido en etanol al 50%). El medio se conserva en el frigorífico.

2. Preparación LB-agar: se mezclan 5 g de triptona, 2,5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl, diluyéndolo en aproximadamente 250 ml de agua estéril. Se mezcla y se ajusta el pH a 7,5. Una vez ajustado, se añade agua hasta 500 ml. Además, se añaden 5 g de agar bacteriológico europeo. . La mezcla se autoclava y una vez autoclavada y templada (no dejar que enfríe del todo para que no



gelifique dentro de la botella) se añade 1 ml de ampicilina/carbenicilina a 50mg/ml (diluído en etanol al 50%). En ese preciso momento es necesario tener las placas Petri preparadas en la campana de flujo laminar para repartir el medio LB-agar en cada una de ellas. Las placas reposarán en la campana hasta que haya solidificado el medio, y después podrán conservarse en el frigorífico.

3. Preparación del antibiótico: El antibiótico debe preparase de manera previa a los medios de cultivo. Para ello hemos utilizado ampicilina/carbenicilina. Se creó un stock de 50 mg/ml (en etanol al 50%) (1000mg de antibiótico en 10 ml de etanol). El etano se filtra previamente con filtros de 0,22 µl (milex, Milipore) y se hacen alícuotas de 1 ml, almacenándolas a -20ºC.

4. Preparación del control positivo: Todos los reactivos necesarios para la preparación del control positivo están incluidos en el *kit*. Se realiza una PCR con 41,5 µl de agua, 1µl de cada primer, 0,5 µl de dNTPs, 5 µl de buffer y 1 µl del control positivo incluido en el kit. La mezcla preparada se introduce en el termociclador con el siguiente programa:

   a) 94ºC →2 minutos

   b) 94ºC → 1 minuto

   c) 55ºC →1 minuto

   d) 72ºC → 1 minuto

      - Hasta aquí, 25 ciclos

   e) 72ºC → 7 minutos

5. Una vez tenemos preparados los medios de cultivo y el control positivo, se puede dar comienzo a la clonación propiamente dicha. Antes de nada se prepara el termobloque (*TEMBLOC* de la casa *J.P-SELECTA® S.A.*) a 42ºC para que cuando sea necesario su uso esté a la temperatura adecuada. También se sacará el SOC-medium del frigorífico unos minutos antes para que se atempere. A partir de ahora comenzamos con el protocolo de clonación:

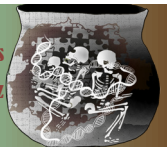
6. Ligación: Por este proceso conseguimos insertar el fragmento amplificado de interés en cada vector (plásmido).

   - Se toman tantos tubos *eppendorf* de 0,2 ml como purificados se quieran clonar; y en cada tubo se añade:

     - 1 µl de agua estéril BRAUN
     - 0,5 µl de sal – sodium
     - 0,35 µl de Topo – Vector
     - 2 µl de ADN purificado

- Se centrifuga la mezcla (un *spin*).
- Se deja reposar de 5 a 30 minutos como máximo a temperatura ambiente
- Mientras tanto se sacan las células, que se mantenían mientras tanto en un congelador a -80ºC y se mantienen en todo momento en hielo.
- Se preparan tantos tubos *eppendorf* de 1,5 ml como purificados se vayan a clonar y se mantienen también en hielo.
- Transcurrida la media hora (como mucho) se añade a cada tubo *eppendorf* de 1,5 ml:
    - 25 µl de células
    - 1 µl de reacción de ligado
- En el caso del control negativo, en lugar de reacción de ligado, se añade la misma cantidad de agua estéril.
- En el caso del control positivo, en lugar de reacción de ligado, se añade el control positivo que habíamos preparado previamente.

7. Transformación:
    - La mezcla se mantiene en hielo durante 10 minutos. Tras ese periodo de tiempo se transfiere al termobloque (a 42ºC) produciéndose de este modo un choque térmico que va a permitir la incorporación de los plásmidos al interior de las células. Este choque térmico a 42ºC no debe durar más de 45 segundos y tras él se transfieren los tubos al hielo nuevamente, dónde permanecerán durante 1 minuto.
    - Se añadirán 125 µl de SOC-medium a cada *eppendorf* y se incubarán durante una hora a 37ºC en movimiento (la incubación se ha realizado en un baño marca *Robbins Scientific®* modelo *GEMINI Twin Shaking Water Bath*), para que las células ya infectadas por los plásmidos comiencen a reproducirse. Durante ese periodo de espera, se sacan las placas Petri del frigorífico, para que se atemperen.
    - Una vez transcurrida la hora de incubación, se lleva a cabo la siembra de las placas Petri con el contenido de cada uno de los *eppendorf* de 1,5 ml. Todo el proceso de trabajo con las células bacterianas se debe realizar con mechero bunsen y limpiando previa y posteriormente las superficies con lejía.
    - Las placas se mantendrán toda la noche boca-abajo en una estufa seca a 37ºC.
    - El día siguiente, gracias al efecto del antibiótico en la placa tan sólo habrán crecido colonias a partir de aquellas células que tuvieran incorporado el plásmido con el correspondiente fragmento de ADN.



- Esas colonias serán seleccionadas y se purificará su ADN mediante *minipreps* (en nuestro caso se ha realizado este proceso mediante un kit comercial de la casa Qiagen). Finalmente se secuenciará el fragmento a partir de cada una de ellas. De este modo podremos obtener en torno a 15 secuencias clonadas a partir de la secuencia original.

4.2.2.10 Cuantificación De Secuencias Específicas De ADN Mitocondrial Por Real Time PCR

En el Laboratorio 2 (Universidad Tor Vergata de Roma) se ha llevado a cabo la cuantificación de secuencias específicas de ADN mitocondrial por *Real Time PCR* (RT-PCR) a partir de los extractos obtenidos de 38 muestras correspondientes a 19 individuos estudiados (2 por cada individuo). De cada uno de estos individuos una de las muestras fue procesada mediante el protocolo empleado en la Universidad de Madrid y la otra mediante el protocolo empleado en la Universidad de Roma. Esto, además de poder cuantificar el contenido real de ADN en cada extracto, también nos ha permitido realizar una evaluación de la técnica más eficiente para obtener ADN a partir de muestras antiguas.

La cuantificación por RT-PCR nos permite evaluar la calidad de nuestro extracto de ADN., ya que permite monotorizar la reacción de PCR mientras que tiene lugar.

El diseño de cuantificación empleado en este trabajo utiliza la química TaqMan MGB, según la cual se diseña una sonda específica complementaria a una región del producto que se desea amplificar (sonda TaqMan MGB). En nuestro caso para la realización de la RT-PCR se han empleado 2 parejas de primers diseñadas para amplificar 2 tractos de ADN correspondientes a regiones intermedias al HVI y HVII. Una de las parejas de primers (El *Forward* F1645, y el *Reverse* R16497) amplifica un fragmento corto de 67 pb. Mientras que la segunda pareja de *primers* (El *forward* F16453, y el *Reverse* R16560) amplifica un fragmento ligeramente más largo, de 129 pb, de la misma región (*Scorrano et al, 2014*). Además para el análisis de cada muestra se realizan 4 reacciones, 2 por el fragmento corto y 2 por el largo, para poder detectar posibles errores, de este modo nos aseguramos de la fiabilidad del resultado.

Además, como referencia a la hora de valorar la cuantificación, se han empleado un conjunto de estándares con diferentes diluciones de ADN de concentración conocida, sus concentraciones fueron:

- 3C→ 3.67×10^3
- 4C→ 3.67×10^4
- 5C→ 3.67×10^5
- 6C→ 3.67×10^6

En el laboratorio 2 se llevó a cabo todo el procedimiento de PCR a tiempo real. Concretamente, en la sala

de PCR se preparó la mix de PCR en placas de 96 pocillos para realizar las distintas cuantificaciones. Las condiciones de PCR de cada muestra fueron las siguientes:

- TaqMan MGB → 12.5 µl
- Primer Forward → 2,25 µl
- Primer Reverse → 2,25 µl
- Probe → 0,5 µl
- Agua estéril → 5 µl
- ADN → 5 µl (Previamente diluído 1/3)

En cada placa se añadían las muestras correspondientes por cuadriplicado (2 para el fragmento corto y 2 para el largo), los estándares también por cuadriplicado y un control negativo también cuadriplicado.

Una vez preparada la mix y agregados los extractos de ADN crítico, la placa se transladaba al laboratorio de la Universidad Tor Vergata para agregar allí los e*standars* y realizar la cuantificación en un termociclador *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System*.

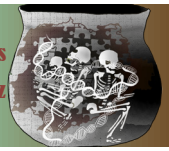
4.2.2.11 Determinación Del Sexo Por Real Time PCR

Para determinar el sexo por *PCR* a tiempo real se llevó a cabo un procedimiento similar al utilizado para la cuantificación de ADN mitocondrial por *Real Time – PCR.*

Sin embargo, en este caso los *primers* que se emplearon amplificaban un segmento del gen de la amelogenina, presente en los cromosomas sexuales. Dicho gen está presente tanto en el comosoma X como en el cromosoma Y, pero presenta pesos moleculares diferentes en cada uno de ellos; de modo que el fragmento del gen de la amelogenina en el cromosoma X es de 106 pares de bases, mientras que en el cromosoma Y presenta 112 pares de bases. Esta característica nos da la ventaja de poder diferenciar a las mujeres como haploides (con 2 cromosomas X y por lo tanto 2 fragmentos del gen de la amelogenina de idéntico tamaño molecular) y a los hombres como diploides (con un cromosoma X y otro Y con fragmentos del gen de la amelogenina de diferentes tamaños moleculares).

Para realizar la determinación del sexo por Real Time - PCR se emplearon los primers diseñados por *Nakahori et al, 1991* (Accessions nos. M55418 and M55419) y las sondas diseñadas por *Alonso et al., 2004* (VIC-CATCCCAAATAAAGTG para la detección de AMGY, y FAM-TATCCCAGATGTTTCTC para la detección de AMGX.

La PCR a tiempo real empleada consistió en una cuantificación absoluta, es decir, únicamente se percibía



si se trataba de un genotipo XX o un genotipo XY, pero no se cuantificaban las cantidades de uno y otro cromosoma. La diferencia visible en el resultado era que los perfiles masculinos (XY) mostraban 2 curvas, frente a los femeninos (XX) que únicamente mostraban la curva de la amplificación del fragmento de la amelogenina presente en el cromosoma X.

Para llevar a cabo la reacción de amplificación se utilizaron las siguientes cantidades:

- Taqman → 12,5 µl
- Primer Forward → 2,25 µl(10uM)
- Primer Reverse → 2,25 µl(10uM)
- Sonda masculina → 0,5 µl(10uM)
- Sonda femenina → 0,5 µl(10uM)
- Agua → 4,5 µl
- ADN → 2,5 µl

Esta mezcla debe prepararse para las muestras objeto de estudio, más un control negativo, al menos por duplicado, y 2 controles positivos (uno femenino y otro masculino) también por duplicado.

4.2.3 Interpretación De Resultados

4.2.3.1 Eficiencia Del Trabajo Realizado

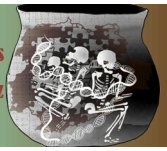
Para obtener una primera aproximación a la valoración de los resultados, se ha realizado un análisis de estadísticos descriptivos. Concretamente un primer análisis de frecuencias para evaluar la proporción de muestras a partir de las cuales se han obtenido resultados válidos frente a las que proporcionaron resultados no válidos. Además se analizaron también las frecuencias de las diferentes causas de fracaso, considerándose fundamentalmente 3 causas: la ausencia de ADN, la presencia de daño molecular (considerando que presentaban daño molecular aquellas muestras en las que resultó imposible la replicación de resultados) y la presencia de contaminación.

Además de esta aproximación al análisis de las causas de fracaso, también se ha querido valorar el grado de fragmentación de las cadenas de ADN, para ello se ha analizado el porcentaje de diferentes máximos tamaños moleculares amplificados en ADN mitocondrial y ADN nuclear. Este análisis también se basó en estadística descriptiva de porcentajes y frecuencias. Todos los análisis se realizaron mediante el empleo del software *SPSS Statistics 20*.

Posteriormente, y una vez obtenida una visión general, se ha querido indagar en las verdaderas causas del fracaso. Para ello se han llevado a cabo una serie análisis estadísticos de las diferentes causas de fracaso en los resultados (validez del resultado (replicación), fragmentación del ADN y contaminación) en función de distintas variables; las variables consideradas fueron las siguientes:

1. Antigüedad de la muestra: Tal como ya se mencionó en la introducción, a pesar de que la degradación del ADN se ve mayormente afectada por factores de carácter ambiental o climático, el tiempo transcurrido tras la muerte de un organismo es un factor que también influye en la descomposición de la materia orgánica. De hecho, es lógico pensar que a un mayor tiempo transcurrido mayor será el efecto causado por esos distintos factores ambientales y climáticos a los que está sometida la materia orgánica, y eso deberá verse reflejado en los resultados del estudio molecular
    a. Periodo crono-cultural al que pertenece (cualitativa)
    b. Datación radiocarbónica de la muestra o su entorno (cuantitativa)
2. Edad del individuo (en intervalos de edad) (cualitativa)
3. Sexo del individuo (cualitativa dicotómica)
4. Tipo de tejido (cualitativa dicotómica):
    a. Dental
    b. Óseo
5. Tipo de pieza esquelética o dental (cualitativa dicotómica)
6. Pieza fragmentada (cualitativa dicotómica)
7. Presencia de grietas (cualitativa dicotómica)
8. Presencia de desgaste dental (cualitativa dicotómica)
9. Presencia de caries (cualitativa dicotómica)
10. Presencia de consolidantes (cualitativa dicotómica)
11. Presencia de rótulos con bolígrafos permanentes (cualitativa dicotómica)
12. Coloración de la muestra (cualitativa multivariante)

Ya desde el inicio del planteamiento experimental de esta tesis, así como debe hacerse en cualquier estudio de ADN a partir de restos esqueléticos o dentales, se ha tratado de seleccionar muestras con unas determinadas características macroscópicas de estructura, integridad y color. Sin embargo no siempre resulta sencillo obtener muestras que presenten todas las características macroscópicas recomendadas. Y en algunos casos, cuando la variedad muestral es reducida, nos vemos obligados a seleccionar muestras



con una apariencia inapropiada. Por esta razón, entre las variables expuestas figuran ciertas características macroscópicas de las muestras que pueden ser más o menos desfavorables a la obtención de ADN de buena calidad.

En una primera fase se han analizado las variables que puedan estar afectando a la validez de los resultados. Para ello se han enfrentado cada una de las variables expuestas anteriormente (de la 1 a la 12) frente a la variable cualitativa dicotómica: "resultado válido o resultado no válido". Para el análisis de las variables cualitativas (casi todas) frente a esta variable cualitativa dicotómica, se empleó un test Chi cuadrado. Con la excepción del contraste de la variable del tiempo medido según la datación radiocarbónica (por tratarse de una variable cuantitativa) frente a la variable de obtención de resultados válidos o no válidos, para cuyo análisis se empleó el test estadístico *t de Student*. En este caso, cuando el test aplicado fue el *t* de Student, además se aplicó el test de Levené, que nos indica si es correcto o no aceptar la suposición de igualdad de varianzas, de modo que cuando el p-valor del test de Levené es inferior a 0,05 no es fiable asumir la igualdad de varianzas. Todos los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico *SPSS Statistics 20*.

En todos los casos en los que fue aplicado el test Chi Cuadrado, se aplicó además también el test exacto de Fisher, para obtener un estadístico más conservador y poder confirmar con mayor seguridad el resultado obtenido mediante el Chi cuadrado.

La segunda fase se dedicó a analizar las principales causas de la contaminación, enfrentando nuevamente cada una de las variables expuestas (de la 1 a la 12) a la obtención de resultados limpios o contaminados (de nuevo una variable cualitativa dicotómica). Empleando en este caso de nuevo, en la mayoría de los casos, el test Chi cuadrado, por tratarse de variables de la misma naturaleza que en el caso anterior.

Finalmente, se evaluó el grado de fragmentación del ADN y las variables que podrían estar afectando a esa fragmentación de las cadenas de ADN. Para ello se creó la variable cuantitativa "Fragmentación del ADN", que consiste fundamentalmente en el valor del máximo tamaño molecular analizado en cada una de las muestras, considerando por un lado el máximo tamaño molecular que fue posible amplificar a partir de ADN mitocondrial y por otro lado, el máximo tamaño molecular que fue posible amplificar a partir de ADN nuclear, dado que estos 2 tipos de ADN se encuentran en proporciones muy diferentes dentro de la célula. Estas 2 variables cuantitativas (con valores correspondientes al número de pares de bases máximo amplificado en cada caso) se enfrentó a cada una de las variables expuestas anteriormente (de la 1 a la 12), empleando por lo tanto el estadístico t de Student para realizar contrastes entre una variable cuantitativa (variable "Fragmentación del ADN") y otra cualitativa en la mayoría de los casos (variables de la 1 a la 12); con la excepción del análisis en el que se valoró el máximo tamaño molecular amplificado en función de la coloración de la muestra, en este caso la variable de comparación (coloración de la muestra) es una variable cualitativa multivariante, por lo que en este caso concreto se aplicó una Anova para conocer la influencia de esta variable sobre la fragmentación del ADN. De nuevo, todos los análisis estadísticos realizados en esta última fase, fueron llevados a cabo mediante el *software SPSS Statistics 20*.

4.2.3.2 Interpretación De Los Resultados De ADN Mitocondrial

4.2.3.2.1 Lectura De Secuencias De ADN Mitocondrial Y Establecimiento De Haplotipos

Los electroferogramas resultantes de la secuenciación de Sanger han sido visualizados en primer lugar mediante el software *Chromas versión 2.0* para observar la calidad general de cada una de las secuencias. En segundo lugar se ha leído minuciosamente cada una de las secuencias comparándolas con la secuencia referencia de Anderson revisada (rCRS), tomando nota de cada una de las diferencias de las secuencias analizadas frente a la rCRS para definir de este modo sus correspondientes haplotipos. Esta lectura comparada se ha llevado a cabo gracias a la utilización del software *Mutation Surveyor V4.0.9 (demo)* que nos permite la alineación de cada una de las secuencias problema con la secuencia de referencia rCRS, así como con las secuencias replicadas del mismo individuo.

A la hora de llevar a cabo la lectura se han anotado todos los cambios de bases en las diferentes posiciones, ya fueran cambios de una base por otra, como inserciones, delecciones, o aparición de dobles picos (2 bases nitrogenadas en una misma posición). Utilizando para ello la nomenclatura adecuada (A, G, C, T). Esta anotación de cambios de nucleótido, se hace apuntando la posición correspondiente y la base nitrogenada que aparece en lugar de la propia de rCRS (por ejemplo: 16362C en lugar de 16362T); en los casos de inserción, el cambio se anota con la posición seguida de un punto y un 1 acompañado de la base nitrogenada incorporada (por ejemplo: 16183.1T); en el caso de que se haya incorporado más de una base la nomenclatura será idéntica repitiendo el número de bases que aparezcan (por ejemplo, si se incorporan 3 bases nitrogenadas tras la posición 16183, la nomenclatura apropiada sería: 16183.1T, 16183.2T, 16183.3T); en los casos de pérdida de bases, la delección se anota con la posición correspondiente acompañada de las siglas “del” seguidas de la base nitrogenada deleccionada (por ejemplo: 16362delT). Para las delecciones existen otras nomenclaturas, también correctas, sustituyendo el “del” por “D” o “d” (*Butler, 2005*). Este listado de mutaciones es lo que va a constituir el haplotipo mitocondrial del individuo en cuestión.

Además la secuenciación se realizó en ambos sentidos, *forward* y *reverse*, para completar la lectura de los 2 extremos. La lectura de secuencias presenta ciertas dificultades en determinadas ocasiones como por ejemplo en los tractos de poli-C (por ejemplo, el tracto 311-315 de HV2). En estos tractos poli-C podemos encontrar algunas dificultades a la hora de interpretar las inserciones. Por ejemplo, si en el tracto poli-C 311-315 encontramos una C extra, es complejo saber de antemano en qué posición se ha incorporado la nueva base; por ello la notación que se emplea por convenio es la de la última base del tracto, de modo que su notación sería 315.1C (*Andrews et al 1999*) (*Butler, 2005).*

4.2.3.2.2 Establecimiento Del Haplogrupo Mitocondrial

Para determinar el haplogrupo mitocondrial al que pertenece cada uno de los haplotipos obtenidos se ha empleado la herramienta online *Haplogrep* (*Kloss-Brandstätte et al, 2010*). Dicha herramienta aporta un resultado con un mayor o menor grado de fiabilidad medido en tanto por ciento y señalizado mediante un código de 3 colores: verde para aquellas asignaciones de haplogrupo con elevada fiabilidad, amarillo para una fiabilidad media y rojo cuando la fiabilidad de la asignación es baja. Esta herramienta trabaja basándose en el *Phylotree* (*Van Oven and kayser, 2008*).

Para realizar el análisis con *Haplogrep*, se preparó un archivo de texto adecuado con la información relativa de cada una de las muestras incluyendo el haplotipo completo de cada individuo, tanto HVI como HVII.

Una vez obtenido el haplogrupo asignado por *Haplogrep*, cada uno de ellos fue comprobado buscándolo directamente en el *Phylotree* (*van Oven M and Kayser M. 2009*) y comprobando si cada una de las mutaciones de cada haplotipo era concordante con el haplogrupo asignado. El *Phylotree* consiste en un árbol filogenético global de la variabilidad del ADN mitocondrial humano.

4.2.3.2.3 Análisis De Los Resultados Del Estudio De ADN Mitocondrial De Los Periodos Específicos De Esta Tesis

Una vez conocidos el haplotipo y el haplogrupo de cada uno de los individuos analizados, se ha procedido al análisis de variaciones en la composición genética de las poblaciones a lo largo de los periodos temporales estudiados, así como variaciones en las diferentes regiones geográficas que ocupan nuestra población de estudio. A continuación se muestra la metodología empleada para llevar a cabo estos estudios de variación de la composición genética de las poblaciones en el tiempo y el espacio, centrándonos de forma exclusiva en las poblaciones estudiadas de manera íntegra en esta tesis.

4.2.3.2.3.1 Análisis Diacrónico De Los Periodos Estudiados En Esta Tesis

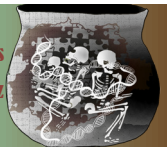
En primer lugar se ha llevado a cabo un estudio diacrónico para conocer la existencia de variaciones genéticas en las poblaciones analizadas a lo largo de los distintos periodos temporales estudiados (apartado 5.2.1.2 de resultados).

En esta primera parte únicamente se han tenido en cuenta las poblaciones analizadas de manera íntegra en esta tesis (Periodos: Precampaniforme, Campaniforme, Bronce Antiguo, Protocogotas, Cogotas I y Soto

Formativo de la Submeseta Norte de la Península Ibérica). Posteriormente se ha llevado a cabo un análisis con los periodos inmediatamente anteriores a nuestra época de interés, utilizando datos de otros estudios ya publicados (visible en el siguiente punto, 4.2.3.2.4); para de ese modo conocer los cambios sucedidos en la población de la Península respecto de los periodos cronológicos inmediatamente anteriores.

Para realizar esta primera aproximación a las variaciones diacrónicas se ha empleado el software Arlequin versión 35 (*Excoffier et al., 2010*). Para analizar los datos con el software Arlequín de manera diacrónica, se ha establecido la siguiente estructura organizada en distintos grupos crono-culturales:

1. Grupo 1: Precamaniforme (n = 17)
    1- Los Areneros
    2- Los Cercados
    3- Trascabañas
    4- El Tomillar
2. Grupo 2: Campaniforme (n = 9)
    5- El Mirador
    6- Rivas Vaciamadrid
    7- Santa Cruz de Cabezón
    8- Tablada de Rudrón
    9- Pajares de Adaja
    10- Perro Alto
3. Grupo 3: Bronce Antiguo (n = 9)
    11- Cueva de la Revilla
    12- Santioste
4. Grupo 4: Protocogotas (n = 25)
    13- Tordillos
    14- Las Cañamonas
    15- El Cerro
    16- Fuente de la Mora



17- El Cementerio

18- La Huelga

19- Los Rompizales

20- Carrelasvegas

21- Los Tolmos

5. Grupo 5: Cogotas I (n = 3)

22- Cantoblanco

23- La Requejada

La división en grupos se ha realizado utilizando cada uno de los 6 periodos estudiados. Utilizando esta estructura en 6 grupos se ha llevado a cabo un análisis de la varianza molecular (AMOVA) (ver apartado 4.2.3.2.6 de material y métodos), para conocer la varianza existente entre los distintos grupos así como dentro de ellos (entre los yacimientos pertenecientes a un mismo periodo temporal) y entre los individuos de cada uno de los yacimientos.

En este punto es necesario realizar una aclaración importante: para este análisis se ha omitido el último periodo temporal estudiado en esta tesis, el denominado Soto Formativo. La principal razón para no utilizar este conjunto es que se trata de un grupo formado por un único individuo. Las diferencias culturales y arqueológicas entre el Soto Formativo y sus inmediatos antecesores de la cultura Cogotas I imposibilitan que ese individuo del yacimiento del Cerro de San Pelayo sea incluido en el conjunto de Cogotas I, y por otro lado resulta estadísticamente erróneo considerarlo un grupo; por esa razón no se ha considerado ese dato en este análisis.

4.2.3.2.3.2 Análisis Sincrónico – Espacial De Los Yacimientos Estudiados En Esta Tesis

En segundo lugar, se ha llevado a cabo un análisis geográfico – sincrónico de los datos. Para llevar a cabo un análisis geográfico de los datos, se han establecido grupos que no se han basado en las divisiones políticas de las provincias actuales. En su lugar, se ha empleado una división basada en las divisiones hidrográficas de la Submeseta norte. Se ha tomado este criterio ya que las divisiones orográficas dentro de la Submeseta no parecen suponer grandes barreras geográficas para el tráfico de individuos de unas regiones a otras, por lo que se han tomado las redes de los ríos como posibles divisiones geográficas. De este modo pretendemos observar si esas “fronteras” hidrográficas son realmente barreras que afectan a la composición genética de las poblaciones; o por el contrario, si las comunidades asentadas en posiciones alejadas por kilómetros, pero en las cuencas de los mismos ríos, comparten características genéticas

similares y diferentes al resto. Esto último sería indicativo de una posible utilización de los ríos como vías de transporte y comunicación entre poblados.

Por ello, las divisiones geográficas que se han empleado se recogen en el siguiente mapa (*Figura 37*).

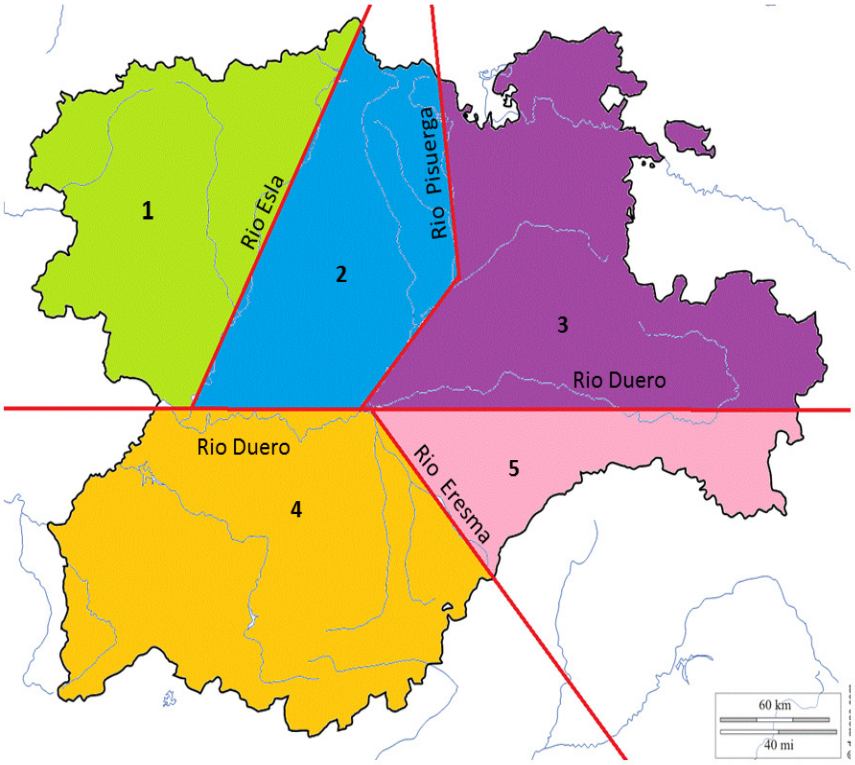
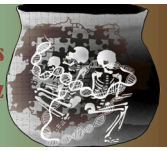


Figura 37. Mapa en el que se representa las divisiones geográficas establecidas para llevar a cabo el análisis espacial de variación genética. El mapa de Castilla y León se ha dividido en 5 regiones diferentes separadas por los principales ríos de la región: Esla, Pisuerga, Duero y Eresma.

En este caso, la estructura en grupos que se empleó para llevar a cabo el análisis de la varianza molecular (AMOVA) con el software Arlequin v.35, fue la siguiente (los resultados relativos a esta metodología son visibles en el apartado 5.2.1.3):

1. Grupo región 1 (verde) (n = 2)
    1- Las Cañamonas (Protocogotas I)
    2- Santioste (Bronce Antiguo)
2. Grupo región 2 (azul) (n = 12)
    3- Santa Cruz de Cabezón (Campaniforme)
    4- Fuente de la Mora (Protocogotas I)
    5- Los Cercados (Precampaniforme)



6- Trascabañas (Precampaniforme)

7- Carrelasvegas (Protocogotas I)

8- La Huelga (Protocogotas I)

9- Cantoblanco (Cogotas I)

10- La Requejada (Cogotas I)

3. Grupo región 3 (violeta) (n = 19)

11- El Cerro (Protocogotas I)

12- Tablada de Rudrón (Campaniforme)

13- Cueva de la Revilla (Protocogotas I)

14- Los Rompizales (Protocogotas I)

4. Grupo región 4 (naranja) (n = 16)

15- El Tomillar (Precampaniforme)

16- Pajares de Adaja (Campaniforme)

17- Perro Alto (Campaniforme)

18- Tordillos (Protocogotas)

19- Cerro de San Pelayo (Soto Formativo)

5. Grupo región 5 (naranja) (n = 14)

20- Los Areneros (Precampaniforme)

21- El Mirador (Campaniforme)

22- El Cementerio (Protocogotas I)

23- Los Tolmos (Protocogotas I)

En este conjunto de agrupaciones se ha omitido el yacimiento de las Terrazas del Manzanares (Rivas-Vaciamadrid), por ubicarse geográficamente fuera de la Submeseta Norte. Sin embargo, tal como se puede observar en el grupo de la región 4, en esta ocasión si se ha incluido el yacimiento de San Pelayo, que se omitió en el estudio diacrónico por constituir un grupo de un solo individuo, del Soto Formativo.

Tras este análisis, espacial se ha querido llevar a cabo otro en el que se toma la hipótesis de diferenciación espacial en otro sentido. En lugar de considerar los ríos como barreras geográficas que implican la división

en distintos grupos humanos, se ha considerado la posibilidad de que los principales ríos funcionen como canales de comunicación entre las distintas comunidades. Por ello se han tomado como referencia únicamente las poblaciones que se ubican de forma más cercana a las cuencas de los ríos (El Cementerio, La Requejada, Los Tolmos, Pajares de Adaja, Perro Alto, Los Rompizales, Cueva de la Revilla, Santa Cruz de Cabezón y Tordillos), y se han asociado en los mismos grupos aquellas poblaciones que se encuentran en la cuenca del mismo río, a pesar de encontrarse a varios kilómetros de distancia e incluso en diferentes regiones de las analizadas según el criterio anterior, y por lo tanto podrían establecer comunicación vía fluvial entre ellas.

Para ello, en este caso, se han considerado las poblaciones ubicadas en las cuencas de los ríos: Duero, Adaja, Arlanzón y Tormes, por ser las más pobladas en sus cercanías. En la *figura 38* se observa la localización relativa de cada uno de los yacimientos pertenecientes a cada cuenca hidrográfica y seguidamente se muestra la organización en grupos y poblaciones utilizada en este análisis de la Amova.

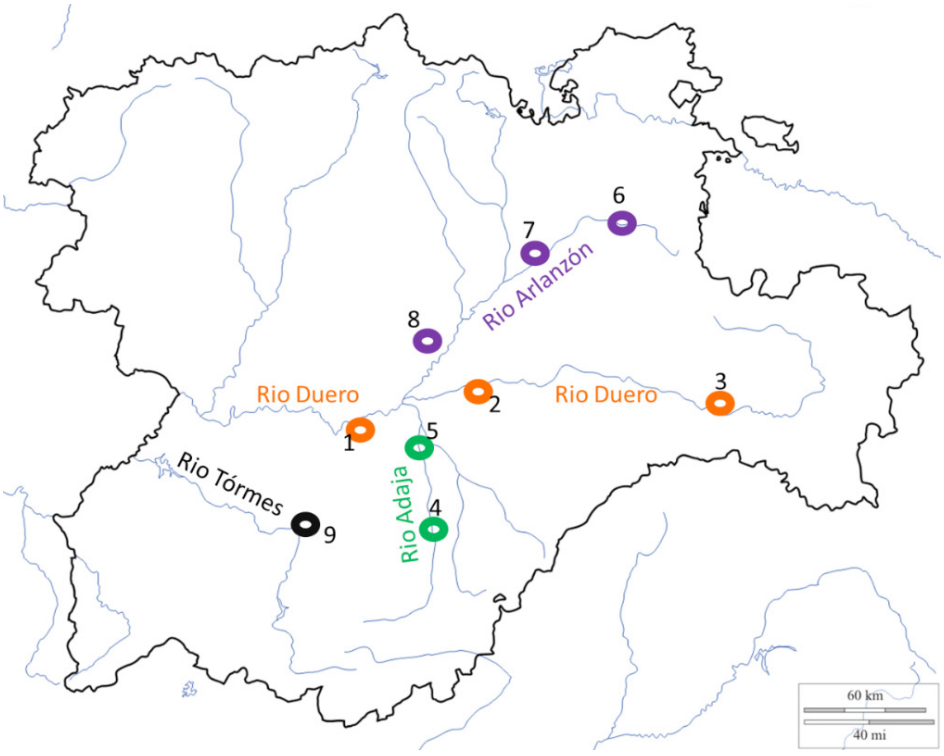
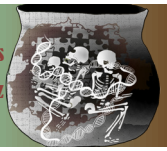


Figura 38. Mapa en el que se representa los principales yacimientos localizados de manera más próxima a las principales cuencas hidrográficas. Representado en negro el yacimiento del Rio Tormes, en verde los yacimientos del río Adaja, en naranja los del Duero y en violeta los del Río Arlanzón.



1. Grupo 1: Rio Duero (n = 7)
    1- El Cementerio (Protocogotas)
    2- La Requejada (Cogotas I)
    3- Los Tolmos (Protocogotas)
1. Grupo 2: Rio Adaja (n = 2)
    4- Pajares de Adaja (Campaniforme)
    5- Perro Alto (Campaniforme)
2. Grupo 3: Rio Arlanzón (n = 15)
    6- Los Rompizales (Protocogotas)
    7- Cueva de la Revilla (Protocogotas)
    8- Santa Cruz de Cabezón (Campaniforme)
3. Grupo 4: Río Tormes (n = 8)
    9- Tordillos (Protocogotas)

4.2.3.2.4 Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones De La Península Ibérica

Con la información obtenida mediante la metodología empleada hasta aquí, podemos tener cierto conocimiento sobre los cambios ocurridos en las poblaciones entre el Precampaniforme y el final de la Edad del Bronce. Sin embargo, es difícil conocer lo sucedido al comienzo de nuestro periodo de estudio si no lo comparamos con las poblaciones que habitaban la Península en los periodos inmediatamente anteriores al Precampaniforme. Por ello, en este apartado queremos ubicar a las poblaciones analizadas en este estudio dentro de un marco temporal en el que hay que tener en cuenta a las poblaciones anteriores y posteriores en el tiempo. Para ello, el primer paso necesario ha sido la creación de una base de datos con la información genética de esas poblaciones. Posteriormente, se llevaron a cabo los consiguientes análisis sincrónicos y diacrónicos. En los apartados siguientes se explica con detenimiento todo el proceso llevado a cabo.

4.2.3.2.4.1 Construcción De La Base De Datos

Se han seleccionado dos bases de datos (*Gamba et al, 2011; Hervella et al, 2012*) para llevar a cabo las comparaciones necesarias entre nuestras poblaciones de estudio y las anteriores y posteriores. A estas dos bases de datos se ha añadido una tercera sobre la población actual de la Península (*Prieto et al, 2004*), para poder valorar los cambios que existen entre aquellos hombres que poblaron la región respecto de los que ahora nos encontramos en este área territorial. Una vez construida la base de datos se llevarán a cabo los análisis necesarios para dar respuesta a nuestras preguntas.

Sin embargo, la realización de comparaciones poblacionales desde un punto de vista del estudio del ADN antiguo, plantea grandes limitaciones. La primera limitación es el reducido tamaño muestral, ya que los datos conocidos son pobres, en primer lugar debido a la escasez muestral y en segundo lugar a que no todas las muestras proporcionan resultados genéticos satisfactorios. Lo ideal habría sido llevar a cabo comparaciones empleando datos genéticos de las poblaciones Neolíticas de la Submeseta Norte, pero no es posible debido a la ausencia de datos; por esta razón se han empleado los resultados de estudios de poblaciones Paleolíticas, Mesolíticas, Neolíticas y Calcolíticas de las regiones de Cantabria, El País Vasco, Navarra y la Región Mediterránea. La segunda limitación es la aportada por fuentes de carácter histórico-arqueológico, que impide la comparación de ciertos grupos por diferentes cuestiones; en nuestro caso por ejemplo para llevar a cabo los análisis cronológicos se han omitido las poblaciones del Levante Español, por tener características muy especiales por tratarse de regiones sometidas a importantes migraciones vía Mediterráneo, por lo que para evitar la intrusión de factores que no podemos controlar, se ha omitido a la hora de realizar comparaciones diacrónicas (no así en las sincrónicas, en las cuales tiene gran relevancia si los conjuntos poblacionales levantinos realmente son tan diferentes de los del interior desde un punto de vista genético).

La localización de todos los yacimientos utilizados para evaluar cambios genéticos en el tiempo, se puede observar en la *Figura 39.* En la misma figura podemos observar la fuente de la que proceden los datos genéticos de cada uno de los yacimientos incluidos.

Una vez formada la base de datos se han contabilizado un total de 187 haplotipos diferentes repartidos en 15 haplogrupos distintos. Del total de haplotipos, los más representativos (presentes en más de un 1% del total de individuos) se muestran en la *tabla 29.*

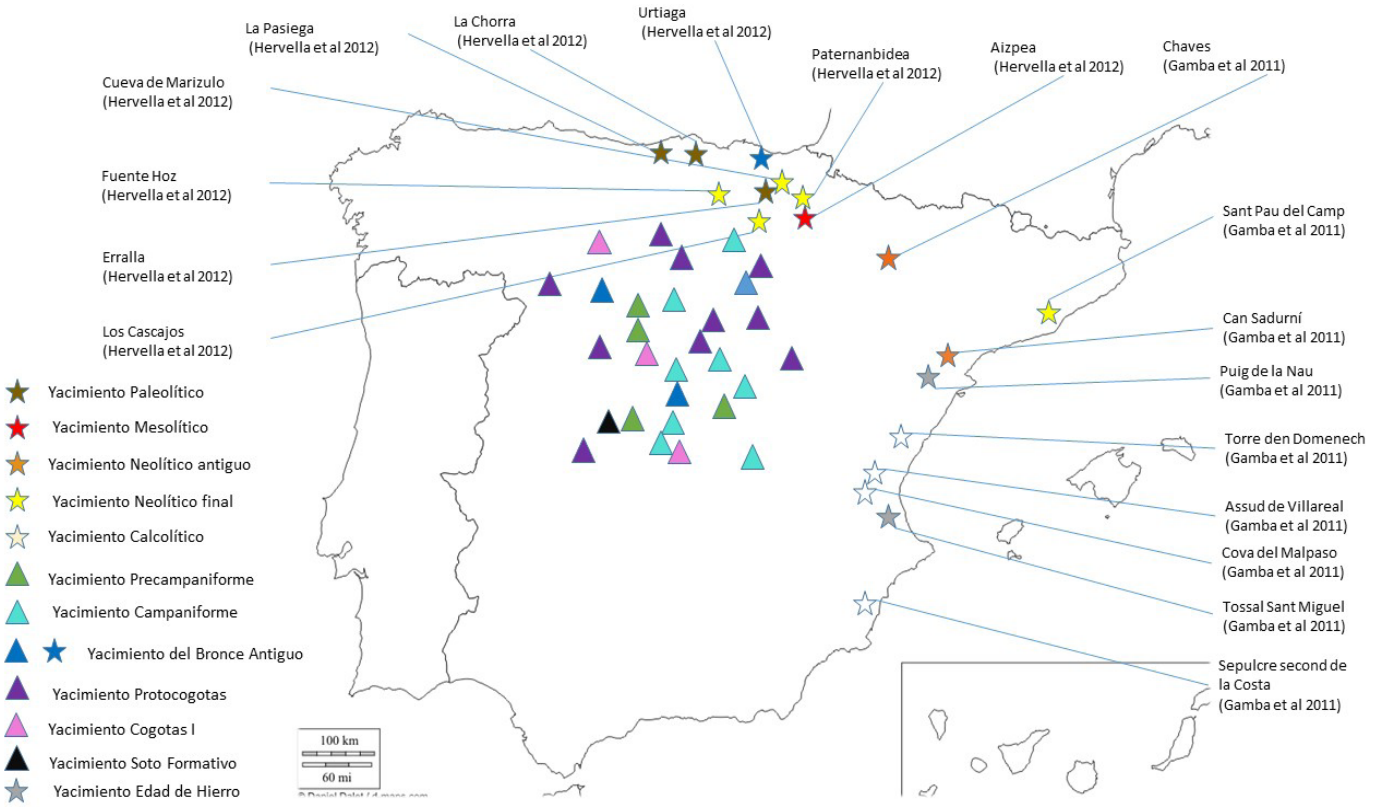


Figura 39. Localización de los yacimientos empleados en el análisis diacrónico. Los yacimientos pertenecientes a esta tesis están representados con triángulos, por otro lado, las estrellas representan la localización de los yacimientos de otras fuentes bibliográficas que han sido empleados para realizar las comparaciones cronológicas. Los diferentes colores representan cada uno de los periodos estudiados, su significado aparece en la leyenda en la parte izquierda. Además bajo el nombre de cada yacimiento podemos observar su correspondiente referencia bibliográfica.

Nombre asignado al haplotipo	Haplotipo	Frecuencia	Porcentaje
Ht7	16126C	12	2,5%
Ht40	16129A	21	4,5%
Ht94	16189C	7	1,5%
Ht111	16192T 16270T	6	1,3%
Ht133	16224C 16311C	22	4,7%
Ht134	16224C 16311C 16319A	5	1,1%
Ht149	16270T	6	1,3%
Ht158	16298C	16	3,4%
Ht160	16304C	10	2,1%
Ht163	16311C	9	1,9%
Ht172	16362C	11	2,3%
Ht174	rCRS	106	22,5%

Tabla 29. Relación de los haplotipos más representativos.

A diferencia de lo realizado durante el análisis de los datos específicos obtenidos en esta tesis (apartado 4.2.3.2.3) en este caso se ha trabajado exclusivamente con los perfiles mitocondriales de la Región Hipervariable I, ya que las referencias bibliográficas halladas y utilizadas para llevar a cabo las comparaciones no presentan amplificado el haplotipo correspondiente a la Región Hipervariable II. También ha sido posible llevar a cabo una comparación de los haplogrupos mitocondriales, ya que los haplogrupos correspondientes a las poblaciones utilizadas sí se encuentran disponibles en la bibliografía (*Hervella et al 2012; Gamba et al 2011; Prieto et al 2004*).

4.2.3.2.4.2 Análisis Diacrónico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones De La Península Ibérica

Tal como se ha introducido, las poblaciones humanas analizadas en este trabajo se corresponden con individuos que habitaron la Submeseta norte de la Península Ibérica hace entre 2.700 y 4.200 años. Culturalmente estas poblaciones han sido subdivididas en diferentes "culturas" caracterizadas por unos rasgos típicos en su comportamiento, ritos funerarios y manifestaciones materiales. Las culturas estudiadas concretamente se subdividen en los siguientes periodos: Precampaniforme, Campaniforme, Bronce Antiguo, Protocogotas, Cogotas I y Soto formativo.

En este apartado se pretende conocer las variaciones genéticas que se han producido en la población general de la Submeseta norte de la Península Ibérica a lo largo de los periodos temporales y culturales estudiados, así como en relación a los periodos anteriores y la población actual (*Hervella et al 2012 y Prieto et al 2004).* De este modo se podría obtener una aproximación al conocimiento del origen de esas poblaciones, podremos interpretar si la llegada de nuevas culturas y comportamientos está directamente relacionada con la llegada de nuevos pobladores a la región, o si por el contrario se trata de meros cambios culturales sin afluencia de nuevos individuos con características genéticas diferentes. Para ello se han empleado resultados publicados sobre estudios de ADN mitocondrial en restos del Paleolítico, Mesolítico, Neolítico, Calcolítico y la Edad del Bronce en otras regiones de la Península Ibérica. Lo ideal sería poder llevar a cabo estas comparaciones con individuos pertenecientes a dichos periodos, procedentes de la misma Submeseta Norte, sin embargo esto no es posible debido a la ausencia de datos disponibles. Por esta razón, nos basaremos en los resultados obtenidos por *Hervella et al. 2012* para llevar a cabo esta comparativa. De este análisis diacrónico se han excluido los datos aportados por Gamba et al. 2011. En efecto, en este trabajo habría tenido sentido la comparación diacrónica de los restos humanos de las Edades del Cobre y del Bronce con las etapas previa y posterior, pero no se ha podido disponer de restos humanos del Neolítico ni del Hierro I - se desconocen - ni del Hierro II, sometidos a cremación. En esa comparación no se justifica introducir los datos aportados por Gamba et al. 2011, que corresponden a una problemática muy específica, la de la detección de posibles colonos o individuos migrantes en el Neolítico Antiguo de la zona Levantina, cuya eventual presenci ase venía proponiendo, a partir de argumentos arqueológicos, en la bibliografía prehistórica (por ejemplo, Bernabeo Aubán, 1996), aunqeu tales datos sí serán tenidos en

cuenta en al comparación general de tipo geográfico. De igual forma, tampoco se justificaría incluir en la comparación diacrónica las poblaciones de la Cultura Ibérica (Gamba et al., 2011),mucho más recientes y sin conexión con las culturas de las Edades del Cobre y del Bronce de la Submeseta norte.

Los yacimientos empleados en este tipo de análisis se pueden visualizar en la *Figura 40*.

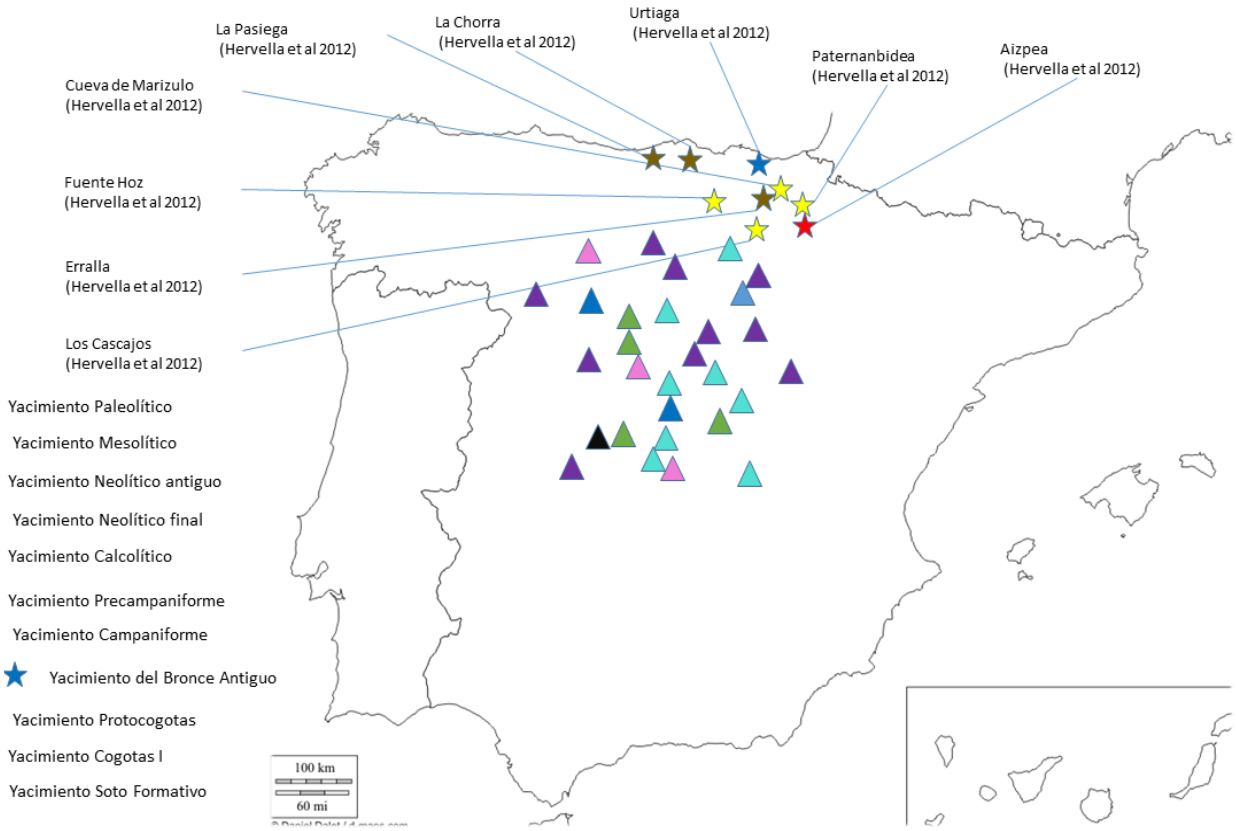


Figura 40. Yacimientos empleados para llevar a cabo el análisis comparativo diacrónico.

Por otro lado, de este modo se podrá valorar también si esa cultura material, cerámica o del metal va asociada a cambios fundamentalmente en la población femenina, a la cual se asocia la elaboración de este tipo de trabajos. Ya que el ADN mitocondrial presenta una forma de herencia fundamentalmente femenina que estaría ligada a las migraciones de mujeres más que a las de hombres, es una herramienta extraordinaria para poder evaluar si el cambio en los patrones cerámicos y/o metalúrgicos van asociados a cambios en el componente femenino de la población.

Para llevar a cabo este estudio diacrónico, en primer lugar se ha realizado un análisis de la varianza molecular (AMOVA) empleando el software *Arlequin V.35*. Para ello se han estructurado las poblaciones en los siguientes grupos:

1- Grupo 1: Paleolítico – Mesolítico (n=4)

   1- Erraya

   2- La Pasiega

   3- La Chorra

   4- Aizpea

2- Grupo 2: Neolítico final (n=42):

   5- Cascajos

   6- Fuente Hoz

   7- Paternabidea

   8- Cueva de Marizulo

3- Grupo 3: Precampaniforme (n = 15).

   9- Areneros

   10- Los Cercados

   11- Trascabañas

   12- El Tomillar

4- Grupo 4: Campaniforme (n=8)

   13- Santa Cruz de Cabezón

   14- El Mirador

   15- Rivas Vaciamadrid

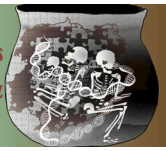
   16- Tablada de Rudrón

   17- Pajares de Adaja

5- Grupo 5: Bronce Antiguo (n=11)

   18- Cueva de la Revilla

   19- Santioste



20- Urtiaga

6- Grupo 6: Protocogotas I (n = 25)

21- Tordillos

22- Las Cañamonas

23- El Cerro

24- Fuente de la mora, El Cementerio y La Huelga

25- Los Rompizales y Carrelasvegas

26- Los Tolmos

7- Grupo 7: Cogotas I (n = 3)

27- Cantoblanco

28- La Requejada

8- Grupo 7: Siglo XXI

29- Siglo XXI_SubmesetaNorte_Castilla y León

30- Siglo XXI Cornisa Cantábrica

31- Siglo XXI Costa Mediterránea

32- Siglo XXI País Vasco

De este modo en un principio se ha realizado un análisis Amova entre la totalidad de los grupos, para posteriormente llevarlo a cabo dos a dos entre cada uno de ellos y de este modo conocer la varianza entre grupos de una manera más aproximada (Ver los resultados en el apartado 5.2.2.2).

4.2.3.2.4.3 Análisis Sincrónico – Espacial De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones De La Península Ibérica

Para llevar a cabo el análisis de variabilidad genética desde un punto de vista espacial, y no temporal como el anterior, debemos establecer los límites geográficos que limitan cada región estudiada. Hoy en día los mapas están claramente divididos por límites políticos establecidos que no siempre concuerdan con los límites orográficos. Además, el seguimiento de estas fronteras actuales implica una serie de problemas añadidos, comenzando por la distribución desigual del número de individuos en los diferentes espacios

geográficos y continuando por un elevado número de regiones en relación con el limitado número de individuos que forman parte del estudio. Por ello en este caso se ha establecido un criterio diferente para establecer los límites geográficos.Por ello se ha realizado una mera división geográfica basada en el establecimiento de una cuadrícula sobre el mapa de las regiones estudiadas (*figura 41*). De este modo se consigue un reparto más equitativo de los individuos, así como un número más reducido de divisiones que si se realizara el análisis basándonos en las subdivisiones en las provincias actuales. Las subdivisiones geográficas empleadas pueden observarse en el mapa de la *figura 41*.

En este caso, se han considerado todas las poblaciones de la base de datos creada, que aparecen en el mapa de la *Figura 39*. En esta ocasión si se han tomado en consideración las poblaciones del Levante peninsular. Aunque desde un punto de vista arqueológico no había razón para conectaras en la comparación diacrónica con las de la Submeseta Norte, en cambio es interesante incluirlas en el enfoque sincrónico entre distintas zonas geográficas, para poder valorar la eventual diferenciación biológica entre los pobladores del interior y de la costa levantina.

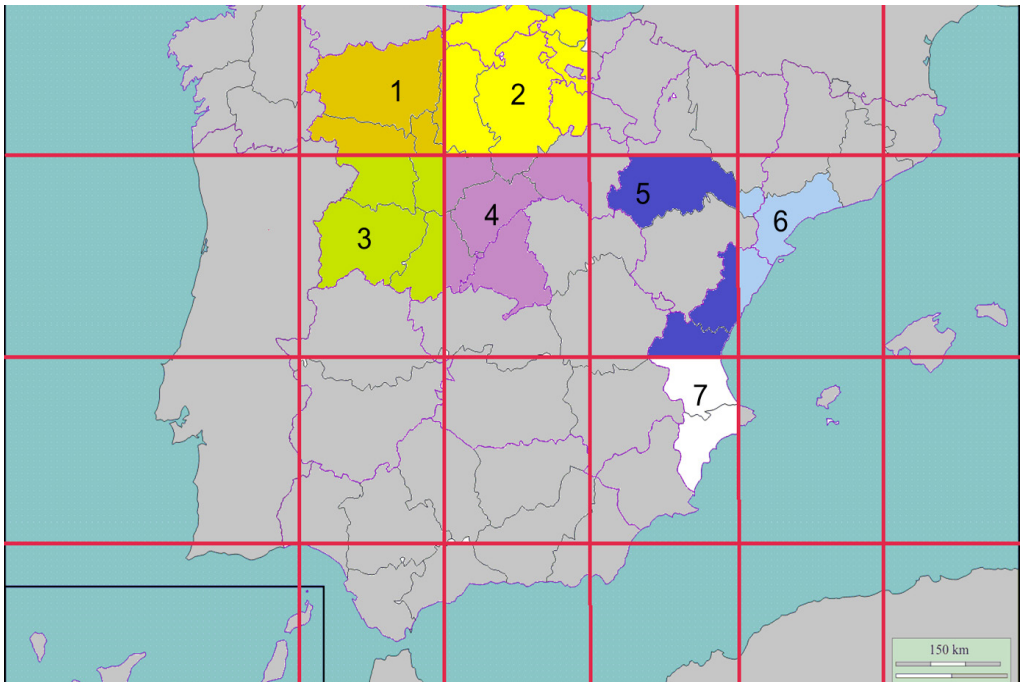
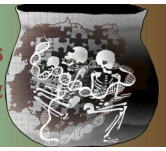


Figura 41. División geográfica establecida para definir los distintos grupos poblacionales de manera espacial

En este caso se van a emplear para el análisis los datos correspondientes a todos los yacimientos que aparecen en la *Figura 38*.

De este modo se han definido un conjunto de 7 grupos diferentes concordantes con las 7 regiones establecidas en el mapa, cada uno de los cuales está formado por los yacimientos que se citan a continuación:



1- Región 1 (naranja) (n=3):
    3. Las Cañamonas
    4. Cantoblanco
    5. Santioste
2- Región 2 (amarilla) (n=65):
    6. El Cerro
    7. Cueva de la Revilla
    8. Los Rompizales y Carrelasvegas
    9. Fuente de la mora, El Cementerio y La Huelga
    10. Tablada de Rudrón
    11. Cascajos
    12. Paternabidea
    13. FuenteHoz
3- Región 3 (verde) (n=24):
    14. Trascabañas
    15. El Tomillar
    16. San Pelayo
    17. La Requejada
    18. Tordillos
    19. Los Cercados
4- Región 4 (morada)(n=16):
    20. Pajares de Adaja
    21. El Mirador
    22. Rivas Vaciamadrid
    23. Santa Cruz de Cabezón
    24. Los Tolmos
    25. Areneros
5- Región 5 (azul oscura) (n=4):

26. Chaves
27. Assud de Villareal

6- Región 6 (azul clara)(N=4):

28. Sant Pau
29. Cova de Malpaso

7- Región 7 (Blanca)(n=9)

30. Can Sadurní
31. Sepulcre Segond de la Costa

Para realizar una primera aproximación a la variabilidad genética entre los distintos grupos establecidos, así como entre los yacimientos que conforman cada uno de ellos y entre los individuos de los mismos, se ha llevado a cabo un primer análisis global de la AMOVA (los resultados de este análisis pueden ser observados en el apartado 5.2.2.2 de resultados).

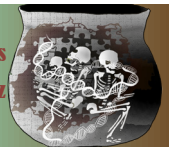
En una segunda parte del análisis sincrónico, se ha querido visualizar si realmente existe una diferencia genética clara entre las poblaciones que poblaron el interior peninsular y la región levantina durante el Calcolítico (Precampaniforme y Campaniforme). Para ello se ha llevado a cabo un análisis de distancias genéticas y su correspondiente representación MDS (Visible en la *figura 73* de resultados) entre dos grupos fundamentales:

1. Grupo 1: Población Calcolítica del Interior (n=23):

1- Areneros
2- Los Cercados
3- El Tomillar
4- Camino de Trascabañas
5- Rivas Vaciamadrid
6- Pajares de Adaja
7- El Mirador
8- Tablada de Rudrón
9- Santa Cruz de Cabezón

2. Grupo 2: Población Calcolítica de la Región Levantina (n=4):

1- San Segond de la Costa



2- Cova de Malpaso

3- Assud de Villarreal

4.2.2.2.2 Análisis De Correspondencias Y Análisis De Componentes Principales

Una de las herramientas que se empleó para conocer que haplotipos y haplogrupos concretos eran característicos de cada una de las poblaciones estudiadas fue el análisis de correspondencias. Ésta es una técnica descriptiva de la estadística multivariante que fue desarrollada por Jean-Paul Benzécri (*Benzécri, 1973; Greenacre, 1983*). Esta herramienta se empleó fundamentalmente para conocer si existían haplotipos y haplogrupos que fueran íntimamente vinculados a alguno de los periodos estudiados: Precampaniforme, Campaniforme, Bronce Antiguo, Protocogotas, Cogotas I y Soto Formativo.

Para realizar el análisis de correspondencias se utilizó el software de *IBM SPSS Statistics V.20*. Y se obtuvo una representación gráfica del análisis en forma de puntos dispersos en un eje de 2 dimensiones, en la que se puede observar la proximidad o distanciamiento de determinados haplotipos y/o haplogrupos a determinados periodos crono-culturales.

Del mismo modo, también se empleó el software *SPSS Statistis V.20* para realizar análisis de componentes principales, agrupando a los individuos en yacimientos y asignando a cada uno la frecuencia o porcentaje de cada uno de los haplogrupos observados. De este modo se puede obtener una representación gráfica de los distintos grupos (yacimientos) organizados en función de las frecuencias haplotípicas o de haplogrupos observadas en cada uno de ellos, para posteriormente poder inferir conclusiones sobre las similitudes y/o diferencias entre distintos conjuntos arqueológicos.

4.2.3.2.6 Análisis De La Varianza Molecular (Amova)

La AMOVA o análisis de la varianza molecular es un modelo estadístico que mide la variación molecular de una especie (*Excoffier et al, 1992*). Este modelo estima los índices de varianza de la estructura genética de la población utilizando la información del contenido alélico de los haplotipos, así como sus frecuencias (*Excoffier et al., 1992*). La información y diferencias en el contenido alélico entre haplotipos se introduce en forma de matriz de distancias euclídeas al cuadrado. Mediante esta herramienta podemos conocer los niveles de covarianza a distintos niveles: entre individuos, entre poblaciones y entre grupos de poblaciones. Y esto se testa utilizando procedimientos de permutación no paramétricos.

Por todo ello este test ha sido útil para establecer la varianza molecular entre grupos constituidos por individuos pertenecientes a distintos yacimientos ubicados en diferentes regiones geográficas, así como a

yacimientos pertenecientes a diferentes periodos crono-culturales. Es decir, gracias a esta herramienta se han podido establecer grupos para evaluar posibles diferencias y/o similitudes entre poblaciones humanas en el tiempo y en el espacio. Todo ello se ha realizado mediante el software Arlequin 3.1. (*Excoffier et al, 2010*).

4.2.3.2.7 Estudio De Distancias Genéticas FSTs

La distancia genética puede definirse como una medida de diferenciación entre las frecuencias alélicas de un número determinado de genes entre individuos y/o poblaciones determinadas. De modo que la distancia genética entre 2 poblaciones resulta de la diferencia entre las frecuencias génicas de las 2 poblaciones. El cálculo debe realizarse para cada uno de los genes analizados, realizando después una estandarización para tener en cuenta el peso estadístico de cada diferencia. Cuanto mayor sea el número de genes considerados, más fiable será la distancia estimada entre las 2 poblaciones (*Nei, 1987a y b; Nei, 1972; Takezake and Nei, 1996*).

Se trata por lo tanto de un parámetro que si se emplea, como en esta ocasión, sobre la misma especie, la distancia tiende a aumentar regularmente entre poblaciones separadas a medida que se suceden las generaciones, siempre que no tengan lugar fenómenos de migración u otros cambios desconocidos. Por lo que sirve como un instrumento importante para informar sobre momentos en los que ha tenido lugar un suceso importante de cambio en la composición genética de la población. Del mismo modo, también puede emplearse, y de hecho se emplea en esta tesis, para conocer la diferenciación genética entre poblaciones coetáneas de distintas regiones geográficas.

Para analizar las distancias genéticas entre pares de poblaciones en este trabajo, se ha empleado el software Arlequin v. 3.1; y concretamente se han utilizado las distancias genéticas de Slatkin (*Slatkin, 1995*).

El resultado obtenido tras el análisis de distancias genéticas FSTs de Slatkin consiste en una matriz de n filas por n columnas. Para una visualización más directa y sencilla de cada uno de los resultados, se ha realizado MDS (del inglés: *multidimensional scaling*; o lo que es lo mismo escalamiento multidimensional). El MDS consiste en un conjunto de técnicas estadísticas que permite la visualización y exploración de datos; ofreciendo como resultado una representación en forma de diagrama visual. Estos diagramas se denominan mapas perceptuales y suelen tener 2 dimensiones, aunque pueden representarse con un mayor número de ellas. En nuestro caso todos los diagramas se han representado en 2 dimensiones, y se han realizado mediante el *software SPSS V.20*. Dichos diagramas posteriormente han sido tratados digitalmente para crear áreas de color sobre los yacimientos pertenecientes a un mismo conjunto, ya sea cronológico o espacial (según cada caso) utilizando el software Power Point.

4.2.3.2.8 Creación De Mapas De Distancias Genéticas Y De Frecuencias De Haplogrupos

Otro método empleado para representar las distancias genéticas entre diferentes grupos crono-culturales ha sido mediante mapas. Se ha creído interesante conocer, no únicamente en qué momento tiene lugar un mayor distanciamiento genético entre poblaciones, sino también en qué regiones geográficas concretas tiene lugar ese cambio. Por ello, se han representado las distancias genéticas sobre mapas de las regiones estudiadas, y para ello se ha empleado el *software Surfer V. 11*. Este software, empelado para la realización de mapas con diferentes fines, nos permite realizar un mapa con gradaciones que indiquen el mayor o menor distanciamiento genético entre 2 poblaciones situando los grupos poblacionales mediante sus coordenadas geográficas. Las coordenadas geográficas exactas han sido previamente determinadas mediante *Google Earth* ®.

Se compararon poblaciones humanas de periodos crono-culturales sucesivos entre sí situando geográficamente cada uno de los yacimientos, de este modo se puede observar en qué región geográfica tiene lugar el cambio en la composición genética de la población (ver Figuras 55, 56, 75 y 76 de resultados).

Este mismo procedimiento se ha llevado a cabo con las frecuencias de determinados haplogrupos para conocer las variaciones de las mismas en el tiempo. En este caso en el mismo software se introdujeron las coordenadas correspondientes, y en este caso en lugar de las distancias genéticas, se introdujo la frecuencia del haplogrupo objeto de análisis en cada una de las poblaciones (o en este caso yacimientos) del periodo crono-cultural estudiado (ver apartado 5.2.1.5 de resultados).

4.2.3.2.9 Elaboración De Networks

Para la reconstrucción de árboles y redes filogenéticas, que permitan inferir tipos ancestrales y cambios evolutivos a través de los distintos grupos poblacionales estudiados, se ha empelado el *software Network 4.6.1.2*. Utilizando siempre el algoritmo median-joining (*Bandelt et al, 1999*).

4.2.2.2 Interpretación De Los Resultados De ADN Nuclear

4.2.3.3.1 Enterramientos Colectivos Y Múltiples. Localización Y Periodo

En la *figura 42* podemos observar la localización de los yacimientos que presentaban enterramientos colectivos. Además podemos ver el número de individuos hallado en cada uno de ellos.

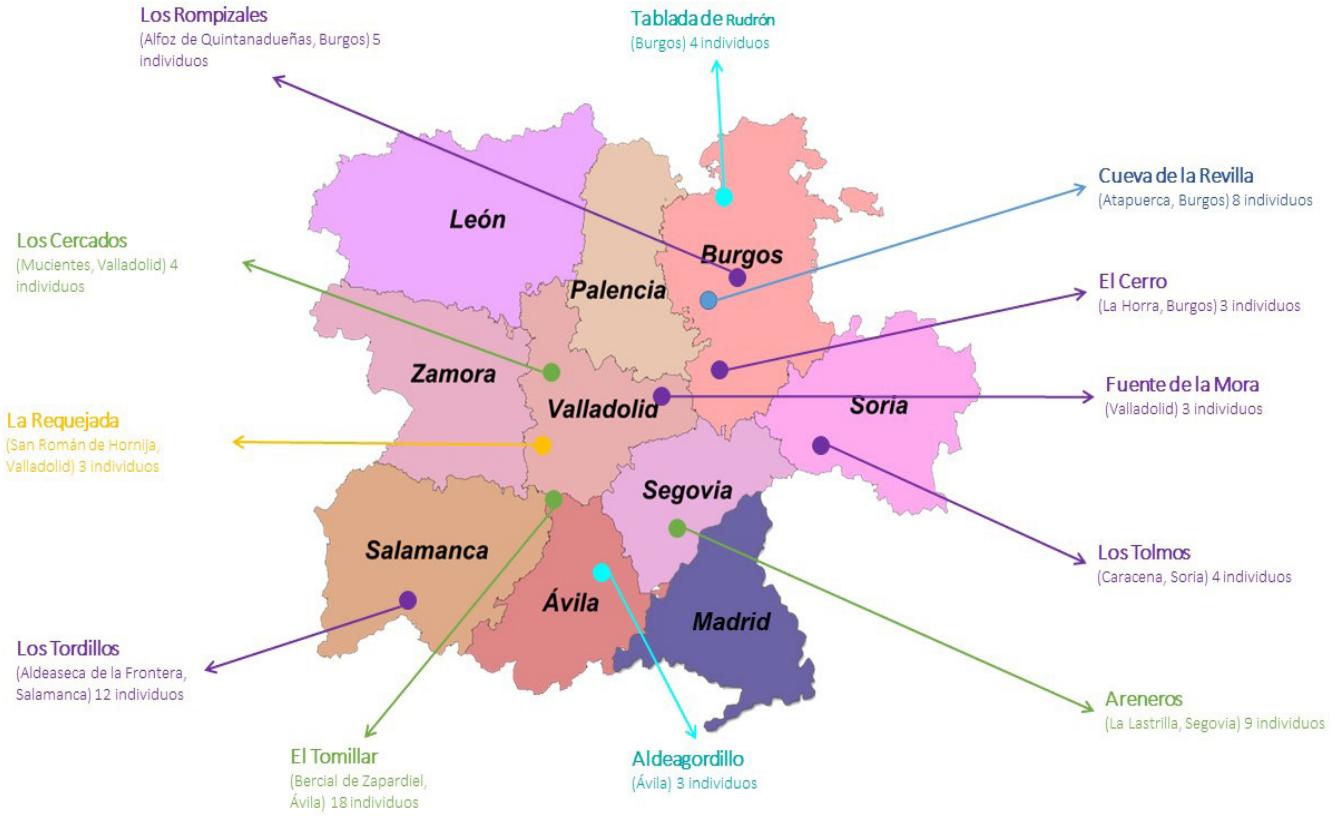


Figura 42. *Localización geográfica de los enterramientos colectivos estudiados. En verde aparecen los yacimientos Precampaniformes; en turquesa los Campaniformes; en azul los del Bronce Antiguo, en violeta los yacimientos Protocogotas I y en amarillo los Cogotas I.*

4.2.3.3.2 Interpretación De Perfiles De STRs Nucleares

Tal como ya se ha mencionado en el apartado 4.2.2.8, el análisis de fragmentos (STRs) fue llevado a cabo en un secuenciador *ABI PRISM® 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems*) localizado en el Parque Científico de Madrid.

A lo largo de esta tesis se han empleado 3 kits diferentes en la amplificación de STRs, pero el análisis de los resultados ha sido similar en todos los casos, mediante mediante el software *GeneMapper®* version 4.0.

Tras la obtención de los electroferogramas el objetivo fue asignar picos a los diferentes marcadores de cada muestra analizada para determinar cada perfil. En segundo lugar se compararon los perfiles obtenidos en cada amplificación de cada una de las muestras del mismo individuo, y se pusieron en común para establecer un perfil consenso definitivo. En cualquiera de los casos, al igual que en el análisis de ADN mitocondrial, se trató de obtener al menos 2 perfiles por muestra (por extracto de ADN) y *kit*; aunque no en todos los casos fue posible emplear los 3 *kits*, y el análisis se redujo a 2 de ellos, o en una minoría a uno.

4.2.3.3.2.1 Asignación De Picos A Un Perfil

Para asignar picos a cada perfil tuvimos en cuenta una serie de problemas habituales en las muestras críticas con LTD *(Low Template DNA*). Estos problemas se traducen en forma de artefactos que pueden ser malinterpretados a la hora de leer los electroferogramas. A continuación se enumeran algunos de estos problemas y las medidas de precaución tomadas en cada caso:

1. Presencia de *Stutters*: Un Stutter puede definirse como una “sombra” del producto de PCR. Se manifiestan en forma de pequeños picos que anteceden a un pico de tamaño considerablemente mayor (Ver *Figura 43)*. El problema que plantea este fenómeno es que los Stutters pueden presentar el mismo tamaño que un alelo de un producto de PCR normal y por lo tanto pueden ser confundidos con un alelo, cuando en realidad tan solo se trata de un artefacto que no debería tenerse en cuenta. Por ello se ha tenido en cuenta la altura relativa de los alelos para considerarlos o no válidos, medida en rfus (*relative fluorescence unit*). De modo que en presencia de 2 alelos en un mismo marcador se han considerado como alelos reales aquellos que superen el 50% de la altura del pico más alto, especialmente cuando el alelo de menor altura se sitúa a la izquierda del más alto (ya que esa es la posición habitual de un *stutter*, aunque no suelen superar el 15% de la altura del pico real) (*Buttler,2005*). La presencia o no de *stutters* va a depender en gran medida también del marcador y de la polimerasa empleada, de modo que la propensión de los *stutters* decrece a medida que aumenta el número de unidades repetidas de un STR. Además aparecen más *stutters* en los alelos de mayor

tamaño de un mismo locus (*Buttler,2005*).

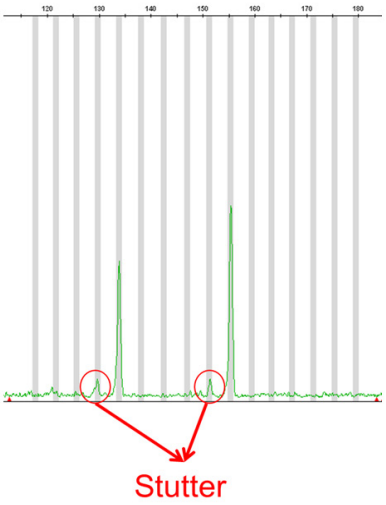


Figura 43. Presencia de stutters en un electroferograma

2. Las Taq polimerasas empleadas en la PCR habitualmente añaden un nucleótido extra al extremo 3`al final de los productos de PCR, normalmente una adenina. Si no se produce esta adición, pueden tener lugar fenómenos que se manifiestan en el electroferograma como “hombros” en algún pico o picos bifurcados. La forma de determinar la validez de estos picos ha sido mediante la replicación de resultados.

3. Aparición de picos fuera de lo establecido por el *ladder (*ver *Figura 44)*. El *ladder* se emplea como referencia para conocer el tamaño exacto de los picos conocidos en la población actual. No es habitual, pero en algún caso podemos encontrarnos con la amplificación de un alelo fuera de lo establecido por el *ladder (*ver *Figura 44)*. En estos casos, al hablar de un individuo perteneciente a una población antigua, podría tratarse de un alelo “extinguido”, que existió en un tiempo remoto, pero en la actualidad ha desaparecido. Sin embargo, en cualquier caso estos resultados no se han considerado válidos a menos que replicaran en al menos 2 amplificaciones de una manera clara y con una altura mínima establecida (dependiendo del criterio).

4. Desequilibrio alélico. Podemos observar casos en los que en un mismo locus se manifiestan 2 alelos, pero uno con una altura considerablemente mayor que el otro (Ver *figura 45*). En estos casos, para considerar válidos los 2 alelos (y no confundirnos con otros fenómenos tales como la aparición de *stutters* u otros artefactos) hemos considerado válidos aquellos alelos que al menos alcanzaran el 50% de la altura del alelo de mayor tamaño.

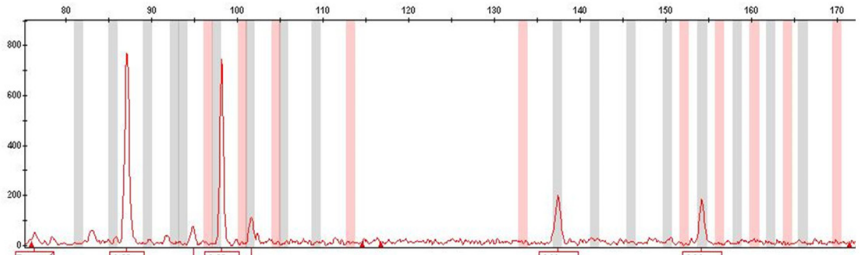


Figura 44. Presencia de picos que se sitúan fuera de lo establecido por el ladder

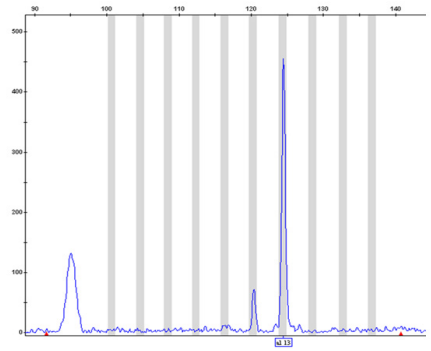


Figura 45. Desequilibrio alélico

5. *Allelic dropout* y alelos nulos. Un *alelic dropout* es un fenómeno de desequilibrio alélico llevado al extremo, por el cual en un individuo heterocigoto para un locus, uno de los alelos se manifiesta con más fuerza que el otro hasta tal punto que el alelo menos manifestado desaparece por completo (Ver *figura 46)*. Esto puede llevarnos a la falsa interpretación de homocigosis. Es decir. Por lo tanto, cuando nos enfrentamos a homocigotos, hemos tenido presente la probabilidad de *alellic dropout (Buttler,2005)*.

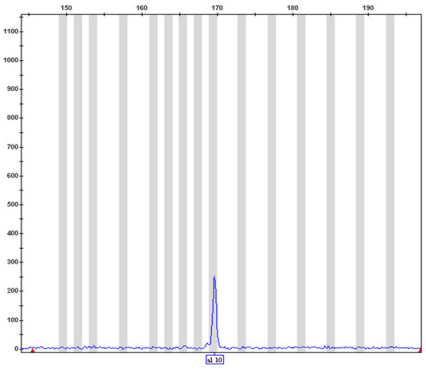


Figura 46. Electroferograma en el cual se presenta una situación en la cual podríamos estar observando a un individuo homocigoto para un marcador determinado, o bien un fenómeno de alelic dropout.

6. Desequilibrio entre marcadores. También podemos observar en un mismo perfil de ADN marcadores o locus con unos picos de altura considerablemente mayor que los picos de otros marcadores. Lo habitual es observar que la altura de los picos disminuye de manera inversamente proporcional al tamaño del marcador analizado; lo cual es lógico si pensamos que nos estamos enfrentando a cadenas de ADN dañado, entre las que predominarán los fragmentos cortos sobre los largos. Esto llevado al extremo (al igual que ocurría en el desequilibrio alélico con el *alelic dropout*) puede llevar a la desaparición completa de picos en ciertos marcadores (Ver *Figura 47*); lo cual ha sido muy frecuente en las muestras analizadas en este trabajo.

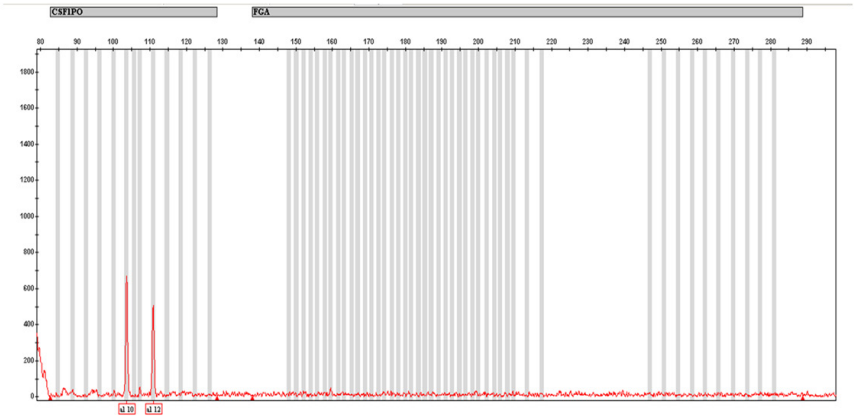


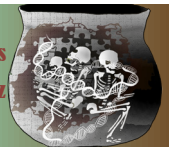
Figura 47. Electroferograma en el cual se presenta una situación en la cual ha tenido lugar la desaparición completa de picos en uno de los marcadores. Esto suele ocurrir con mayor frecuencia en los marcadores de mayor peso molecular, como el FGA que aparece en la imagen.

4.2.3.3.3 Establecimiento Del Perfil Consenso

Una vez establecidos los perfiles de cada una de las amplificaciones de cada extracto (siguiendo las precauciones ya indicadas en el apartado anterior), se ha llevado a cabo un análisis comparativo de los resultados para poder establecer un perfil a cada individuo estudiado.

A diferencia del ADN mitocondrial, en el caso del análisis de fragmentos cortos de ADN autosómico no existen unos criterios claros y definidos para el establecimiento de un perfil sólido y consistente cuando trabajamos con ADN crítico. Por esta razón en esta tesis se ha considerado imprescindible plantear unos criterios fundamentales para establecer los perfiles parciales (considerando los fenómenos derivados de la mala calidad del material genético) y el perfil consenso final.

En concreto se han definido 5 criterios diferentes para establecer un perfil consenso. Dichos criterios serán ampliamente discutidos posteriormente.



1. CRITERIO1: Se consideran válidos aquellos picos que repliquen en al menos 2 amplificaciones diferentes, presentando cada uno de ellos una altura de al menos 100 rfu.
2. CRITERIO 2: Se consideran válidos únicamente aquellos picos que replican en al menos 2 amplificaciones distintas, presentando cada uno de ellos una altura mínima de 75 rfu.
3. CRITERIO 3: Se consideran válidos los picos que replican en al menos 2 amplificaciones independientes, y además presentan una altura cada uno de al menos 50 rfu.
4. CRITERIO 4: Se consideran válidos todos los picos con una altura superior a 150 rfu independientemente de que se haya conseguido replicar el resultado en distintas PCRs. Además, también se consideran válidos los picos replicados en al menos 2 amplificaciones que presenten una altura de como mínimo 75 rfu.
5. CRITERIO 5: Este criterio es idéntico al número 4 con la excepción de que se consideran válidos los picos replicados de al menos 50 rfu. Es decir, se validan todos los picos con una altura superior a 150 rfu independientemente de que se haya conseguido replicar el resultado en distintas PCRs; y además, también se consideran válidos los picos replicados en al menos 2 amplificaciones que presenten una altura de como mínimo 50 rfu.

Como se puede observar, la altura mínima tenida en cuenta ha sido de 50rfu, se ha tomado este valor porque es el valor mínimo tenido en cuenta por la mayoría de laboratorios (*Gill et al, 2012*). Hay que señalar que los picos de esta altura mínima de 50 rfu han sido considerados únicamente en aquellos perfiles con una apariencia limpia y sin "ruido" que pudiera interferir en la interpretación. En cuanto a la mayor altura considerada en los criterios 4 y 5, 150 rfu; no hemos considerado indispensable la replicación de resultados de aquellos picos que superaran la altura indicada, ya que se ha asumido por varios laboratorios que una altura por encima de los 150 rfu no es susceptible de los típicos efectos de LTD (*Gill et al, 2012*).

4.2.3.3.4 Estudio De Relaciones De Parentesco Cercano

Para evaluar los distintos tipos de relaciones de parentesco entre individuos han sido calculadas probabilidades de parentesco mediante el *Likelihood Ratio* (LR), a través de la utilización del software *Familias*, versión 3.0. (*Kling et al, 2014*).

La última versión del software *Familias* (v. 3.0) ha desarrollado una serie de aplicaciones muy prácticas para el estudio de relaciones de parentesco en muestras degradadas, como las que aquí nos ocupan. Este programa nos permite conocer probabilidades de parentesco a partir de perfiles parciales de STRs autosómicos, pudiendo considerar la probabilidad de *alelic dropout*, lo que conforma un paso adelante respecto de versiones anteriores en las que no se consideraba esta opción.

Pero esta no es la única ventaja del programa, ya que esta última versión ha incluido una aplicación denominada "*Blind search*" que permite buscar posibles relaciones de parentesco cercano al azar entre múltiples individuos inidentificados. Lo que constituye una herramienta muy útil para establecer relaciones en situaciones catastróficas de desastres. Pero también lo es en nuestro caso, en el que en numerosas ocasiones disponemos de restos esqueléticos hallados en fosas comunes de manera mezclada y sin ningún conocimiento previo de quienes eran, ni ninguna referencia indubitada de familiares vivos.

De modo que se ha empleado la herramienta "*Blind search*" del programa *Familias* 3.0 para realizar un primer sondeo de las posibles relaciones de parentesco existentes entre los individuos exhumados de enterramientos colectivos. Una vez que hemos observado mayor vinculación entre determinados individuos, se ha centrado el estudio en el análisis de relaciones concretas entre esos individuos, valorándolo siempre en forma de probabilidad (LR). Se debe puntualizar, que se ha comprobado que la herramienta "*Blind search*" es muy útil para llevar a cabo un sondeo de posibles parentesco entre individuos al azar, sin embargo se ha observado que en ciertas ocasiones no identifica ciertas relaciones de parentesco cercano entre individuos; por ejemplo en el caso de Los Tolmos, como se puede observar en el apartado 5.3.3.1 de resultados, no detecta una posible relación de maternidad entre los individuos LTB1 y LTB3, que tal como veremos posteriormente si se realiza el análisis de probabilidad de la forma clásica con el programa Familias, sin utilizar la herramienta "*Blind Search*" resulta tener probabilidades más elevadas que otros tipos de relaciones. Por esta última razón, esta herramienta se ha empleado como medio de orientación, que en algunos casos ha sido necesario complementar posteriormente con un análisis clásico de relaciones de parentesco tal como se hacía con versiones anteriores del software *Familias*.

Para llevar a cabo el estudio de probabilidades de parentesco es necesario disponer de una base de datos de referencia que nos aporte información sobre las frecuencias de los distintos locus analizados; en ausencia de una base de datos de ADN antiguo correspondiente a la región y periodos estudiados, se ha empleado una base de datos de la población española moderna (*García et al 2011*).

4.2.3.3.5 Diagnóstico molecular del sexo

También mediante el análisis de STRs a través de los kits comerciales empleados y ya mencionados en el apartado 4.2.2.5.2 es posible llevar a cabo la determinación del sexo; dado que todos los *kits* empleados presentan un marcador que corresponde a un fragmento del gen de la amelogenina.

A este análisis debemos añadir el realizado mediante *Real Time PCR* (apartado 4.2.2.11).

Ambos análisis se han contrastado y se ha dado por válido el sexo que fuera replicable en las sucesivas amplificaciones.

4.2.3.3.6 Determinación Del Número De Individuos

Otra utilidad que se ha dado al análisis de STRs nucleares de manera conjunta con el ADN mitocondrial ha sido la determinación del número de individuos en aquellos casos en que el estudio antropológico no fue suficiente para determinar el número de individuos. En estos casos se contrastaron los perfiles de los distintos individuos también empleando la herramienta "*Blind search*" del software *Familias* v. 3.0, y se determinó la probabilidad de que se tratará del mismo individuo con un determinado LR.

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

RESULTADOS

A los mayores les gustan la cifras. Cuando se les habla de un nuevo amigo, jamás preguntan sobre lo esencial del mismo. Nunca se les ocurre preguntar: ¿Qué tóno tiene su voz?, ¿Qué juegos prefiere?, ¿Le gusta coleccionar mariposas?, pero en cambio preguntan: ¿Qué edad tiene? ¿Cuántos hermanos? ¿Cuanto pesa? ¿Cuánto gana su padre? Sólamente con esos detales creen conocerle...

Pero nosotros que comprendemos la vida, nos burlamos de los números

(El principito)

Antoine de Saint- Exupéry

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

5 RESULTADOS

5.1 EFICIENCIA DEL TRABAJO REALIZADO

5.1.1 Evaluación General De Los Resultados

De los 95 individuos analizados en la presente tesis, el número de individuos que aportó resultados sólidos y consistentes fue de 62, lo que supone un 65% de éxito. Los restantes 33 individuos no produjeron resultados, o bien los resultados no fueron lo suficientemente sólidos como para ser considerados en la presente tesis.

En este apartado se van a valorar diferentes variables que pueden haber influido en la no obtención de resultados, así como en la aparición de fenómenos tales como la presencia de contaminación o el daño molecular. Para ello se han realizado una serie de análisis paramétricos mediante el software de análisis estadístico SPSS 20.0 (ver apartado 4.2.3.1 de material y métodos), considerando cada una de las muestras analizadas, y no los individuos; ya que cada una de las muestras presenta unas características exclusivas y diferentes de las otras, inclusive las procedentes de un mismo individuo.

Del total de muestras analizadas se han obtenido resultados válidos en el 66,3% (114 muestras de 172). La eficiencia general de los resultados está representada en la *Figura 48.*

En la *Figura 48* podemos aproximarnos a conocer algunas de las principales causas del fracaso a la hora de trabajar con muestras críticas, como las que forman parte de esta tesis; entre esas causas están el bajo

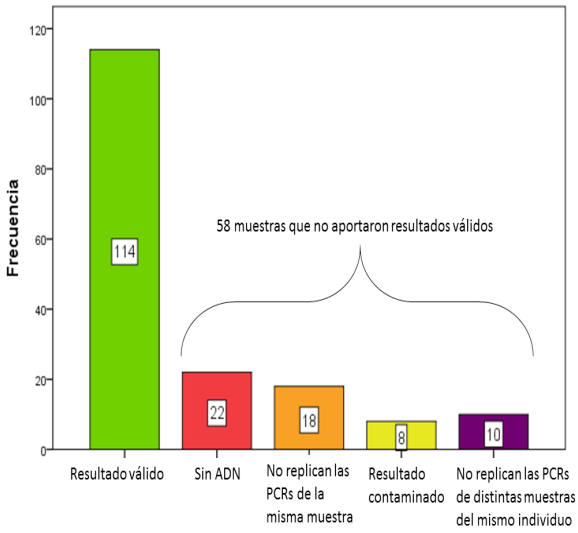


Figura 48. Diagrama de barras, en el cual se observan en verde la proporción de muestras que han aportado resultados válidos, y a su derecha desglosadas las diferentes causas de fracaso (ausencia de ADN en rojo, no replicación de resultados en naranja a partir de las diferentes amplificaciones de un mismo extracto de una muestra, en amarillo presencia de ADN contaminante y en violeta no replicación de resultados entre las distintas muestras o extractos del mismo individuo).

o nulo contenido en ADN de la muestra (en 22 muestras), la contaminación (en 8 muestras) y el daño molecular (que se ve reflejado en los parámetros que indican la no replicación de resultados, representados en naranja y morado en la *Figura 48*) (en 18 muestras no fue posible la replicación de resultados en las sucesivas amplificaciones a partir del mismo extracto o misma muestra, y en 10 individuos no se consiguió replicación de resultados entre las distintas muestras de cada individuo).

Dado que se ha llevado a cabo la amplificación de ADN mediante amplificación de fragmentos solapantes de mayor o menor tamaño, se ha realizado un análisis de los tamaños máximos amplificables en nuestras muestras. Se han considerado de manera separada diferentes tamaños moleculares amplificados a partir de ADN nuclear y a partir de ADN mitocondrial, ya que el segundo es mucho más abundante en el organismo, y en las gráficas de la *Figura 49* se representa la proporción de muestras a partir de las cuales ha sido posible amplificar determinados tamaños moleculares.

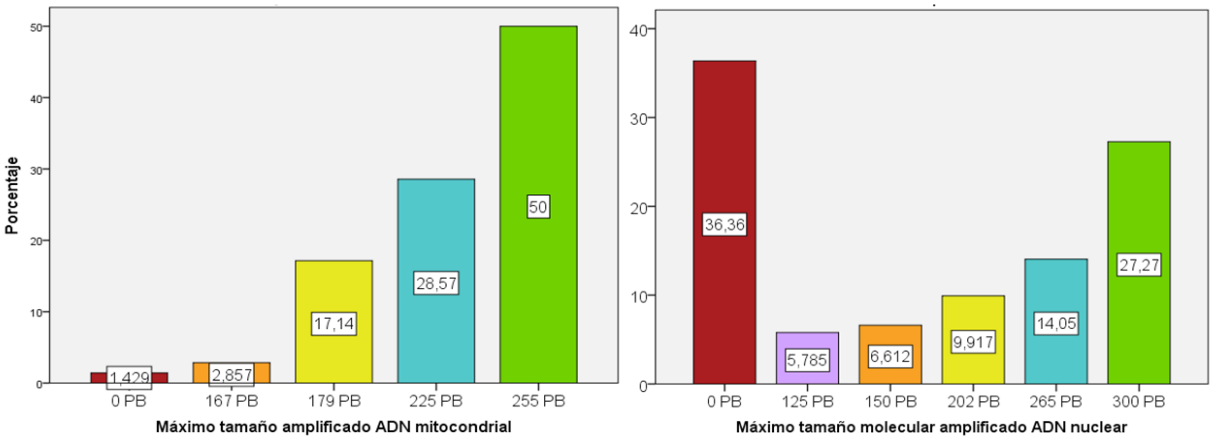


Figura 49. Diagramas de barras que representa en la proporción de muestras en las que ha sido posible amplificar un tamaño molecular máximo de ADN mitocondrial. A la izquierda observamos la gráfica que representa la proporción de muestras en las que se ha amplificado un máximo tamaño molecular de ADN mitocondrial, y a la derecha de ADN nuclear. En lo relativo al ADN mitocondrial, el máximo tamaño molecular amplificado ha sido de 255 pb, por debajo tenemos fragmentos de 225 pb , 179 pb y 167 pb. Los casos en los que no se ha obtenido amplificación están representados en rojo. En la gráfica de la derecha, observamos que el máximo tamaño molecular amplificado de ADN nuclear, ha sido de 300 pb, por debajo tenemos fragmentos de 265 pb, 202 pb, 150 pb y 125 pb.

La primera diferencia clara que se observa entre los máximos tamaños moleculares amplificados a partir de ADN mitocondrial y STRs de ADN nuclear (*Figura 49*) es que la proporción de individuos en la que no ha sido posible amplificar nada (Máximo tamaño molecular amplificado igual a 0, representado en rojo) es mucho mayor en el ADN nuclear (36% de individuos analizados) que en el mitocondrial (1,5% de los individuos analizados). Salvando esa diferencia, en la mayor parte de los individuos ha sido posible

la amplificación de tamaños moleculares relativamente grandes para tratarse de muestras antiguas degradadas, alcanzando el tamaño máximo de 300 pares de bases del ADN nuclear en el 27,27% de los individuos, y el tamaño máximo de 255 pares de bases del ADN mitocondrial en el 50% de los individuos.

En general los resultados obtenidos han sido bastante satisfactorios teniendo en cuenta la antigüedad de las muestras, siendo significativamente peores los resultados del análisis de ADN nuclear que del ADN mitocondrial.

5.1.1.1 Valoración Del Efecto Del Tiempo En La Obtención De Resultados

Esta evaluación se ha realizado mediante dos análisis fundamentales: El primero de ellos consiste en una valoración de la validez de los resultados obtenidos en función de la antigüedad de la muestra, basándonos en su datación radio-carbónica. En segundo lugar se ha evaluado la validez de los resultados en función de la antigüedad de la muestra, mediante la subdivisión de los periodos temporales según las distintas "culturas estudiadas" en seis grupos diferentes: Precampaniformes (que se extienden desde el 3.700 B.P. al 4.300 B.P.), Campaniformes (del 3.600 B.P. al 4.000 B.P.), Bronce Antiguo (del 3.300 B.P. al 3.700 B.P.), Periodo Protocogotas (entre el 3.100 B.P. y el 3.500 B.P.), cultura Cogotas I (extendida entre el 2.900 B.P. y el 3.100 B.P.) y finalmente Soto Formativo (2.700 B.P.). De modo que en el primer caso se trata de una evaluación meramente temporal y en el segundo caso pueden estar implicados también fenómenos culturales que puedan interferir en una mejor o peor preservación del ADN tras la inhumación. Para ello, en el primer caso se trata de confrontar una variable cuantitativa y una cualitativa, por lo que se ha empleado el test t-Student; en el segundo caso confrontamos dos variables cualitativas mediante un análisis Chi-Cuadrado.

A continuación se detallan los resultados del análisis de la validez de los resultados en función de la antigüedad de la muestra según su datación radio-carbónica, en este análisis se han incluido un total de 161 muestras, de las cuales se disponía de su datación radio-carbónica verificada, las muestras de las cuáles no se disponía dicha información han sido omitidas en este análisis (*Tabla 30*).

	Validez del resultado	N	Media (años BP)	Desviación estándar	Error	Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
DATACIÓN POR RADIOCARBONO	Válido	105	3518,10	372,241	36,327	0,22	0,018
	No válido	56	3660,71	339,346	45,347		

Tabla 30. Resultados de la Prueba t-Student para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función del tiempo transcurrido desde la deposición del cadáver datada por radio-carbono.

Según el análisis t-Student anterior (*Tabla 30*), en la cual se valora si existe o no una variación significativa de la validez de los resultados en función de la antigüedad de la muestra calculada en años según su datación radio-carbónica, podemos observar que se asume la igualdad de varianzas según el test de Levené y por lo tanto el test t de Student resulta significativo (sig. 0,018 < 0,05), lo que indica que existe una variación en la calidad del ADN en función de la antigüedad de la muestra.

No obstante, se ha llevado a cabo otro tipo de estudio, mediante la valoración del estado de conservación del ADN (reflejado en la variable "validez de los resultados" con sus dos variantes: resultado válido o resultado no válido) en función del periodo o cultura al que pertenezca, considerando los seis intervalos temporales ya mencionados anteriormente. En la *Tabla 31* se resumen los resultados obtenidos en el text Chi-cuadrado aplicado a este análisis.

	PERIODO	VALIDEZ DEL RESULTADO		% FRACASO	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Válidos	No Válidos			
PERIODO	Precampaniforme (3.700 - 4.300 BP)	33	32	49,23%	p < 0,001	p < 0,001
	Campaniforme (3.600 - 4.000 BP)	14	9	39,13%		
	Bronce Antiguo (3.300 - 3.700 BP)	10	1	10%		
	Protocogotas (3.100 – 3.500 BP)	52	10	1,6%		
	Cotogas I (2.900-3.100 BP)	4	6	60%		
	Soto Formativo (2.700 BP)	1	0*	0%		

Tablas 31. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función del tiempo transcurrido desde la deposición del cadáver valorando la cultura – periodo a la que pertenece.
**Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero.*
Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.

Las diferencias en la eficiencia del resultado en función del periodo crono-cultural estudiado son significativas (sig. P < 0,001). Hay que tener en cuenta que se han asumido varianzas iguales. El tamaño muestral de cada uno de los grupos no es el mismo, lo cual podría estar falseando alguno de los resultados,

especialmente en los grupos Bronce Antiguo, Cogotas I y Soto Formativo, que presentan tamaños poblacionales relativamente menores que el resto. Por ello, si no consideramos los dos últimos grupos (Cogotas I y Soto Formativo) podemos afirmar que en general la eficiencia de los resultados se reduce considerablemente a medida que aumenta la antigüedad de la muestra, tendencia claramente observable entre los periodos Precampaniforme y Protocogotas, siendo el porcentaje de fracaso en el grupo más antiguo de casi el 50% de las muestras, y viéndose reducido hasta menos del 2% de fracaso en el grupo de los Protocogotas I.

Esta reducción progresiva de la obtención de resultados con la antigüedad, solamente se hace visible si analizamos los diferentes periodos o culturas de manera puntual, pero no valorando la antigüedad de manera continua (por las dataciones radio-carbónicas). Esto podría indicarnos tal vez que exista una diferente conservación de la materia orgánica producto de variaciones culturales en la forma de llevar a cabo los enterramientos, o en las propias zonas elegidas para las inhumaciones, y no tanto en el tiempo transcurrido como tal.

5.1.1.2 Valoración Del Efecto De La Edad Y El Sexo Del Individuo En La Obtención De Resultados

Se ha considerado interesante conocer si se observa algún tipo de variación en la eficiencia de los resultados en función de la edad y el sexo del individuo. De este modo se pueden plantear estrategias para una mejor selección muestral en determinados casos.

Para analizar la posible existencia de una relación directa entre la preservación del ADN y las variables de edad y sexo, se han enfrentado estas dos variables a la variable cualitativa dicotómica “validez de los resultados obtenidos”, empleando para ello el test de Chi-Cuadrado. Los resultados obtenidos se resumen en la *Tabla 32*.

La variación en la validez de los resultados y por lo tanto en la calidad del ADN a lo largo de la edad de los individuos varía significativamente (con un nivel de significación del 0,013<0,05). Observamos claramente que el rango de edad que conlleva peores resultados es el rango de los perinatales, lo cual es esperable tratándose de individuos con un esqueleto muy frágil y con un desarrollo temprano de los huesos y ausencia de dentición. En este caso el grupo de los juveniles ha aportado la menor proporción de fracasos (sin considerar el conjunto de los ancianos por su reducido tamaño muestral) siendo el más exitoso.

En cuanto al sexo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en la calidad de los resultados respecto del sexo del individuo (sig. 0,3) (*Tabla 32*).

	Válidos	VALIDEZ DEL RESULTADO		% FRACASO	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Válidos	No válidos			
EDAD	Perinatal	1	6	85,71%	p = 0,013	p = 0,013
	Infantil	16	11	40,74%		
	Juvenil	18	2	10%		
	Adulto-joven	25	15	37,5%		
	Adulto	34	17	33,33%		
	Anciano	3	0*	0%		
	Indeterminado	17	7	29,16%		
SEXO	Varones	36	12	25%	p = 0,300	p = 0,305
	Mujeres	38	24	38,7 %		
	Indeterminado	40	22	35,5%		

Tabla 32. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función de la edad de los individuos, valorada en intervalos o grupos de edad: Perinatal, infantil, juvenil, adulto-joven, adulto, anciano e indeterminado. Y en función del sexo de los individuos: varones, mujeres o individuos de sexo indeterminable. Estos análisis se han realizado sobre el total de muestras, no de individuos.
**Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero.*
Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.

5.1.1.3 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas De Las Muestras En La Obtención De Resultados

En este punto, se muestran los resultados relativos a la eficiencia en la obtención de resultados en función de esas distintas características macroscópicas de las muestras. En la *Tabla 32* se resumen los resultados obtenidos para todos los análisis Chi-cuadrado llevados a cabo para evaluar las diferentes características macroscópicas de las muestras que pueden afectar o no sobre la obtención de resultados válidos.

El primer análisis llevado a cabo pretende evaluar si existe una diferencia significativa en los resultados obtenidos en función de si la muestra seleccionada consiste en una pieza dental u ósea. En este tipo de estudios siempre se recomienda la selección de piezas dentales, sosteniendo que éstas preservan mejor el ADN que los huesos. Mediante un análisis paramétrico Chi-cuadrado se ha evaluado si la utilización de piezas dentales u óseas ha producido diferencias significativas en la obtención o no de resultados válidos (*Tabla 33*), y en efecto se ha comprobado una mayor eficiencia estadísticamente significativa de las muestras dentales, siendo el porcentaje de fracaso sustancialmente mayor a partir de piezas óseas.

Válidos		VALIDEZ RESULTADO		% FRACASO	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Válidos	No válidos			
TIPO DE TEJIDO	Tejido dental	97	28	22,4%	p < 0,001	p < 0,001
	Tejido óseo	17	30	63,83%		
TIPO DE PIEZA	Molar	39	14	26,41%	p < 0,001	p < 0,001
	Premolar	19	4	17,39%		
	Incisivo	17	5	22,72%		
	Canino	13	4	23,53%		
	Pieza dental decidual	6	0*	0%		
	Calota craneal	13	13	50%		
	Hueso largo/otro hueso	4	17	80,95%		
	Germen dental	2	1	33,33%		
FRAGMENTACIÓN	Pieza Completa	83	34	29%	p = 0,012	p = 0,017
	Pieza fragmentada	23	23	50%		
GRIETAS	Presencia de grietas	11	16	59,25%	p = 0,004	p = 0,007
	Ausencia de grietas	95	41	30,15%		
CONSOLIDANTES	Presencia	10	7	41,18%	p = 0,571	p = 0,598
	Ausencia	96	50	34,25%		
ROTULADO CON INDELEBLES	Presencia de tinta	1	14	93,33%	< 0,001	p < 0,001
	Ausencia de tinta	105	43	29%		
COLOR	Color natural	90	45	33,33%	p = 0,578	p = 0,526
	Color anaranjado	3	3	50%		
	Color marrón-oscuro	13	9	40,90%		

Tabla 33. *Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función de las diferentes características macroscópicas de las muestras: Tipo de tejido empleado (óseo o dental), tipo de pieza o muestra procesada, utilización de piezas fragmentadas o completas, presencia de grietas en la muestra procesada, presencia de consolidantes en la muestra proceseada, utilización de muestras rotuladas y coloración de la muestra. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

De entre todas las muestras que podemos seleccionar, tanto de tejido esquelético como dental, se han seleccionado en diferentes casos distintos tipos de piezas dentales y diferentes fracciones del esqueleto, en función de la disponibilidad y el criterio del investigador. Mediante un test Chi-cuadrado, también se ha evaluado si existen diferencias significativas en la obtención de resultados en función del empleo de

distintas piezas dentales o distintos fragmentos óseos (*Tabla 33*). A la luz de los resultados obtenidos y observables en la *Tabla 33* el tipo de pieza seleccionada afecta directamente a la obtención de resultados válidos de manera estadísticamente significativa. Los resultados apuntan, tal como sucedía con el tipo de tejido empleado, a que las muestras de origen óseo producen resultados de peor calidad que las dentales. Pero entre las muestras óseas las que mejor resultado han proporcionado han sido los fragmentos de calota craneal, frente a los fragmentos de diáfisis de huesos largos y otros tipos de hueso, que son las que presentan un mayor porcentaje de fracaso. De entre las piezas dentales, los premolares son las que mejores resultados han proporcionado, con el menor porcentaje de fracaso (sin tener en cuenta las piezas deciduales, por su reducido número).

Muchos de los restos empleados en el análisis genético de muestras arqueológicas antiguas se encuentran degradados y en numerosas ocasiones nos vemos obligados a seleccionar piezas dentales u óseas fragmentadas. Con este test pretendemos conocer si realmente la fragmentación de las muestras causa un peor rendimiento en los resultados (*Tabla 33*). De este modo se ha verificado que las muestras fragmentadas aportan resultados significativamente peores que las piezas completas. Posteriormente observaremos si el fracaso en los casos de fragmentación viene conducido por un problema de daño molecular o por la infiltración de ADN contaminante.

En la mayoría de las ocasiones no se seleccionan piezas completamente fragmentadas, como las analizadas hasta ahora, pero si es muy posible encontrar numerosas muestras con pequeñas hendiduras o grietas, que también podrían favorecer el daño de las cadenas de ADN y con mayor frecuencia la infiltración de sustancias inhibidores o ADN contaminante. Por ello, se ha aplicado el mismo tipo de test para evaluar la eficiencia en los resultados de aquellas muestras que presentaban grietas. De nuevo, las grietas también se asocian de forma directa a un mayor nivel de fracaso en la obtención de resultados, con un nivel de significación del 0,004 (*Tabla 33)*.

Otra de las características que tratamos de evitar es la selección de muestras que hayan sido tratadas con agentes químicos (consolidantes y/o tintas) que puedan alterar la composición molecular de la muestra. Sin embargo, la selección de piezas de museo o de restos que hayan sido manipulados, en numerosas ocasiones presentan características de este tipo. Se pretende valorar si realmente el empleo de piezas con agentes químicos, que mayoritariamente suelen ser consolidantes o tintas, aportan resultados significativamente peores que las que no los tienen. Para ello hemos llevado a cabo dos tests Chi-cuadrado, cuyos resultados también se visualizan en la *Tabla 33*. En efecto observamos que el empleo de muestras rotuladas ha generado resultados significativamente peores (nivel de significación inferior al 0,001) que las muestras con ausencia de tinta. Las piezas rotuladas presentaban en todos los casos siglas realizadas con rotuladores indelebles, y en algunos casos recubiertos con esmalte, no es posible concretar si el efecto negativo es provocado por uno u otro componente. Sin embargo no se ha observado que el empleo de consolidantes o pegamentos genere resultados peores o al menos la diferencia no es estadísticamente significativa.

Finalmente, se ha realizado un último test Chi-cuadrado con el que se pretende evaluar si las muestras con coloración oscura o anaranjada han proporcionado resultados significativamente deficientes en comparación con las muestras que presentaban una coloración clara más natural (*Tabla 33*). Sin embargo, en este caso no se observa que la coloración de las muestras afecte de manera significativa a la validez de los resultados obtenidos (*Tabla 33*).

5.1.1.4 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas De Las Piezas Dentales En La Obtención De Resultados

En la mayoría de los casos se han seleccionado piezas dentales, por ser este tipo de muestra la recomendada por aportar mejores resultados en otros estudios. Sin embargo de entre las piezas dentales siempre se ha tratado de evitar ciertas características como la presencia de caries, por ser un posible foco de infiltración de inhibidores y contaminantes, así como aquellas piezas que no han finalizado su crecimiento en la zona apical de la raíz, mostrando orificios de mayor o menor tamaño. También se trató de evitar la selección de muestras con un avanzado desgaste que puedan llegar a exponer capas inferiores al esmalte, como la dentina. Sin embargo, al igual que en otras ocasiones, en ciertos casos nos hemos visto en la obligación de seleccionar piezas con alguna de estas características. Aquí se pretende evaluar el efecto real que estas características desfavorables han causado en los resultados finales (*Tabla 34*).

Válidos		VALIDEZ DEL RESULTADO		% FRACASO	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Válidos	No válidos			
CARIES	Presencia	2	1	33,33%	p = 0,676	P = 0,552
	Ausencia	87	26	23%		
DESGASTE DENTAL	Presencia	16	7	30,43%	p = 0,443	p = 0,428
	Ausencia	68	20	22,72%		
PRESENCIA DE ORIFICIOS EN EL ÁPICE DE LA RAÍZ	Presencia	19	7	26,92%	p = 0,617	p = 0,607
	Ausencia	70	20	22,22%		

Tabla 34. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la obtención de resultados válidos en función de la utilización o no de piezas dentales con diferentes características: caries, desgaste dental y/o presencia de orificios en el ápice de la raíz. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.

Ninguno de los rasgos considerados desfavorables en las piezas dentales (caires, desgaste y presencia de orificios apicales en la raíz) parecen mostrar resultados significativamente peores que las muestras que no presentan estas características en el contexto del presente estudio (ver *Tabla 34*).

Hasta el momento, se ha demostrado que ciertas características macroscópicas tales como la fragmentación, las grietas o los siglados afectan de manera negativa a la obtención de resultados válidos. Sin embargo, desconocemos la causa real de ese resultado. Las razones principales por las que se han rechazado resultados en el presente estudio han sido: la escasez y/o ausencia de ADN, causada fundamentalmente por la fragmentación de las cadenas en fragmentos de mayor o menor tamaño; la presencia de daño molecular en las cadenas de ADN, que proporciona resultados discordantes y no permite la replicación de los mismos; y finalmente, aunque en menor grado, la presencia de ADN contaminante (*Figura 49*). Por ello en los siguientes apartados, se evalúa la influencia de las distintas características macroscópicas en los fenómenos de contaminación, daño molecular y fragmentación del ADN.

5.1.2 Evaluación De Los Factores Que Influyen En La Contaminación Con ADN Exógeno

5.1.2.1 Valoración Del Efecto De La Edad Y El Sexo Del Individuo En La Obtención De Resultados Contaminados

En la primera evaluación llevada a cabo sobre los factores que afectan a una mayor contaminación se ha querido incluir la edad de los individuos, para conocer de cerca si existe algún grupo de edad más susceptible a este fenómeno y poder adaptar los protocolos necesarios y las medidas de seguridad suficientes para evitar la contaminación a la hora de manipular muestras procedentes de ese conjunto de individuos. Para ello se ha realizado un análisis Chi-cuadrado, cuyos resultados se resumen en la siguiente tabla (*Tabla 35*).

A pesar de observarse mayores niveles de contaminación en los individuos con menor edad (sobre todo perinatales, 28,6% de contaminación, e infantiles, 7,4% de contaminación), las diferencias no son estadísticamente significativas (p=0,085). No obstante, el número de individuos de corta edad es notablemente más reducido que el de juveniles y adultos. Además, cabe destacar que todas las muestras procedentes de individuos de este rango de edad son de carácter óseo y no dental. Además, por tratarse de huesos en crecimiento presentan un nivel de porosidad mayor que los huesos pertenecientes a individuos adultos, lo cual también podría estar implicado en esta mayor proporción de infiltración de contaminantes; en cuyo caso se debería más a una cuestión asociada también al tipo de tejido.

Contaminado		CONTAMINACIÓN		% CASOS CONTAMINADOS	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Contaminado	No contaminado			
EDAD	Perinatal	2	5	28,6%	p = 0,085	p = 0,176
	Infantil	2	25	7,4%		
	Juvenil	0*	20	0%		
	Adulto-joven	1	39	2,5%		
	Adulto	2	49	3,9%		
	Anciano	0*	3	0%		
	Indeterminado	1	23	4,16%		

*Tabla 35. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de contaminación en función de la edad del individuo analizado. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

5.1.2.2 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas De Las Muestras En La Obtención De Resultados Contaminados

Para poder valorar ya no tanto la diferencia por la edad del individuo, sino más bien por la naturaleza del tejido analizado o el tipo de muestra, y comprobar a qué se debe este mayor nivel de contaminación, a continuación se evalúan los diferentes niveles de contaminación en función del tipo de tejido y el tipo de muestra (*Tabla 36*).

A la luz de los resultados aportados en los últimos análisis, vemos claramente que el tipo de muestra que sufre una mayor probabilidad de contaminación es la ósea, no habiendo encontrado ningún caso de contaminación a partir de piezas dentales (nivel de significación inferior a 0,001). Para ir un poco más allá, es necesario valorar si esa mayor proporción de contaminación en las piezas óseas es debida exclusivamente a la propia naturaleza del tejido óseo, o si por el contrario haya podido deberse a otras características de las muestras en cuestión, tales como la fragmentación, la presencia de grietas o el color entre otros. Para ello se han llevado a cabo los análisis que se muestran en las *Tabla 37*.

Contaminado		CONTAMINACIÓN		% CASOS CONTAMINADOS	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Contaminado	No contaminado			
TEJIDO	Diente	1	124	0%	p<0,001	p = 0,001
	Hueso	7	40	14,9%		
TIPO DE PIEZA	molar	0*	53	0%	p = 0,015	p = 0,016
	premolar	0*	23	0%		
	incisivo	1	21	0%		
	canino	0*	17	0%		
	pieza dental decidual	0*	6	0%		
	calota craneal	3	23	13,04%		
	hueso largo u otro	4	17	19,04%		
	Germen dental	0*	3	0%		

Tabla 36. *Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de contaminación en función del tipo de tejido de la muestra analizada y en función del tipo de muestra seleccionada para el análisis. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

Contaminado		CONTAMINACIÓN		% casos con-taminados	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Contaminado	No contaminado			
FRAGMENTACIÓN	completa	4	113	3,42%	p = 0,160	p = 0,223
	fragmentada	4	42	8,69%		
GRIETAS	Con grietas	2	25	7.41%	P = 0,510	p = 0,620
	Sin grietas	6	130	4,41%		
COLOR	Color natural	7	128	5,18%	p = 0,844	p = 1
	Color anaranjado	0*	6	0%		
	Color marrón - oscuro	1	21	4,55%		
CONSOLIDANTES	Presencia	0*	17	0%	p = 0,322	p = 1
	Ausencia	8	138	5,48%		
ROTULADO	Con tinta	4	11	26,6%	p < 0,001	p = 0,003
	Sin tinta	4	144	2,70%		

*Tabla 37. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de contaminación en función las distintas características macroscópicas que muestre la pieza procesada: fragmentación, presencia de grietas, coloración, presencia de tintas y/o consolidantes. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

Tal como podemos observar en la *Tabla 37*, la única característica macroscópica de las muestras que está relacionada de forma significativa con un mayor nivel de contaminación detectada es la presencia de tintas. En cualquier caso el número de muestras en las que se ha detectado contaminación es de menos del 5% del total (8 muestras), por lo que a pesar de que los resultados son estadísticamente significativos para el test Chi-cuadrado, la muestra es pequeña y podría tratarse de un efecto azaroso. Sin embargo el resultado es significativo tanto a través del test Chi cuadrado, como a través del test Exacto de Fisher.

No se ha analizado como influyen las diferentes características de los dientes sobre la incidencia de mayor o menor grado de contaminación, dado que únicamente una pieza dental ha sido contaminada (ver *Tabla 36*).

5.1.3 Evaluación De Los Factores Que Influyen En El Daño Molecular

Otro de los grandes problemas que presentan las muestras críticas a la hora de realizar un estudio genético es la presencia de alteraciones moleculares. Este problema es detectado principalmente por la inconsistencia de los resultados, imposibilitando la obtención de resultados replicables entre distintas amplificaciones de la misma muestra y de distintas muestras del mismo individuo.

5.1.3.1 Valoración Del Efecto Del Tiempo Sobre La Presencia De Daño Molecular

Es interesante conocer a qué factores de los analizados se debe fundamentalmente la aparición de este fenómeno en la población de estudio. Por ello se lleva a cabo este análisis Chi-cuadrado entre las diferentes variables cualitativas analizadas y la aparición o no de daño molecular en los resultados obtenidos. Comenzamos por el análisis del daño molecular en función de los periodos temporales estudiados (*Tabla 38*).

Se observa que los periodos Precampaniforme y Cogotas I presentan con una diferencia estadísticamente significativa (Sig. 0,008) mayores niveles de daño molecular respecto del resto de periodos estudiados. En el caso del periodo Precampaniforme podría deberse a que se trata del periodo más antiguo de los analizados. La valoración en el caso de Cogotas I no es tan sencilla, y probablemente esté relacionada con otros factores de carácter ambiental o tafonómico.

Presencia de daño molecular		DAÑO MOLECULAR				Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Presencia	Ausencia	No procede	% CASOS CON DAÑO MOLECULAR		
PERIODO	Precampaniforme	11	41	13	21,15%	p = 0,008	p = 0,004
	Campaniforme	0*	21	2	0%		
	Bronce Antiguo	0*	11	0	0%		
	Protocogotas I	1	53	8	1,85%		
	Cogotas I	2	5	3	28,57%		
	Soto Formativo	0*	1	0	0%		

*Tabla 38. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de la antigüedad de la muestra según el periodo o cultura a la que pertenece. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

5.1.3.2 Valoración Del Efecto De La Edad Y El Sexo Del Individuo Sobre La Presencia De Daño Molecular

Por primera vez observamos que la edad del individuo estudiado no influye de manera significativa en la producción de resultados no está relacionada con una mayor observación de daño molecular (Ver *Tabla 39*). Aunque los mayores niveles de daño molecular se observan en el rango de edad de los perinatales (50% de daño molecular), las diferencias no son estadísticamente significativas (Nivel de significación 0,114 > 0,05) (Ver *Tabla 39*).

En la misma *tabla 39* también se recogen los resultados relativos al análisis del sexo. Se observa una proporción de casos de daño molecular ligeramente mayor entre la población femenina, que es estadísticamente significativa (p = 0,031). Sin embargo contamos con un elevado número de individuos de sexo indeterminable (47) que pueden estar falseando este resultado si resultan ser mayoritariamente varones.

Presencia de daño molecular		DAÑO MOLECULAR Presencia	Ausencia	No procede	% CASOS CON DAÑO MOLECULAR	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
EDAD	perinatal	2	2	3	50%	p = 0,114	p = 0,102
	infantil	3	20	4	13%		
	juvenil	0*	19	1	0%		
	adulto-joven	4	29	7	12,12%		
	adulto	3	38	10	7,31%		
	anciano	0*	3	0	0%		
	indeterminado	2	21	1	8,7%		
SEXO	Mujer	7	36	5	16,3%	p = 0,031	p =0,012
	Varón	0*	49	13	0%		
	Indeterminado	7	47	8	13%		

*Tabla 39. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de la edad del individuo analizado. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

5.1.3.3 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas De La Muestra Sobre La Presencia De Daño Molecular

Al igual que ocurría con los problemas anteriores, en este caso el empleo de hueso en lugar de diente como muestra también aporta resultados con mayores niveles de daño molecular (*Tabla 40*). Pero cuando nos paramos a analizar no solamente el tipo de tejido, sino también el tipo de pieza seleccionada, podemos observar que tras las piezas óseas, la utilización de gérmenes dentales conlleva un riesgo significativo de asociación a daño molecular también. Hasta el momento no habíamos observado ninguna manifestación estadísticamente probada de que los gérmenes dentales aportaran malos resultados, pero así como éstos en nuestro caso concreto no han sido afectados por la contaminación si se han visto afectados por el daño molecular. En cualquier caso hay que destacar que el número de gérmenes con el que se ha trabajado es muy reducido (3) y los resultados obtenidos pueden ser producto del azar (*Tabla 40*).

Presencia de daño molecular		DAÑO MOLECULAR: Presencia	Ausencia	No procede	% casos daño molecular	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
TIPO DE TEJIDO	Diente	5	109	11	4,4%	**p < 0,001**	**p < 0,001**
	Hueso	9	23	15	28,13%		
TIPO DE PIEZA	Molar	3	45	5	6,25%	**p < 0,001**	**p < 0,001**
	premolar	0*	22	1	0%		
	Incisivo	0*	19	3	0%		
	Canino	1	14	0	6,66%		
	pieza dental decidual	0*	6	5	0%		
	calota craneal	7	14	10	33,33%		
	hueso largo u otro hueso	2	9	0	18,18%		
	Germen dental	1	2	26	33,33%		
FRAGMENTACIÓN	completa	10	94	13	9,6%	p = 0,054	p = 0,064
	fragmentada	4	30	12	11,8%		
GRIETAS	Presencia	3	16	8	15,8%	p = 0,056	p = 0,049
	Ausencia	11	108	17	9,24%		
COLOR	natural	10	105	20	8,7%	p = 0,777	p = 0,515
	naranja	1	4	1	20%		
	marrón - oscuro	3	15	4	16,66%		
CONSOLIDANTES	Presencia	4	11	2	26,7%	p = 0,067	p = 0,090
	Ausencia	10	113	23	8,13%		
ROTULADO	Con tinta	5	3	7	62,5%	**p < 0,001**	**p < 0,001**
	Sin tinta	9	121	18	7%		

Tabla 40. *Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de las características macroscópicas de la muestra analizada. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

En cuanto a las principales características macroscópicas, observamos que los factores que más relacionados parecen estar con la aparición de daño molecular son el tipo de tejido y pieza analizada y el empleo de tintas utilizadas en el siglado de las muestras, en ambos casos se observa una relación estadísticamente significativa. Por lo demás no se observa que el daño molecular se vea incrementado por otras cuestiones como la fragmentación, la aparición de grietas o la coloración de las muestras (*Tabla 40)*.

5.1.3.4 Valoración Del Efecto De Las Características Macroscópicas De Las Piezas Dentales Sobre La Presencia De Daño Molecular

A continuación el estudio se centra en una serie de variables que atañen exclusivamente a las muestras dentales (*Tabla 41*).

Presencia de daño molecular		DAÑO MOLECULAR			% casos daño molecular	Sig. Test de Pearson Chi²	Sig. Test Exacto de Fisher
		Ausencia	Presencia	No procede			
CARIES	Presencia	0*	2	1	0%	p = 0,292	p = 0,342
	Ausencia	5	99	9	4,8%		
ORIFICIOS EN EL ÁPICE DE LA RAÍZ	Presencia	1	23	2	4,34%	p = 0,972	p = 1
	Ausencia	4	78	8	5,13%		
DESGASTE	Presencia	2	20	1	10%	p = 0,400	p = 362
	Ausencia	3	76	9	3,95%		

*Tabla 41. Resultados del test Chi-cuadrado para evaluar la variación en la presencia de daño molecular en función de la presencia o ausencia de determinadas características de las piezas dentales: presencia o ausencia de caries, orificios en el ápice de la raíz y presencia o ausencia de desgaste dental. *Valor no utilizado en las comparaciones por ser igual a cero. Todos los tests para la comparación por pares, han sido ajustados por la corrección de Bonferroni.*

Tal como se observa en la *Tabla 41* no parece que ninguna de las características macroscópicas propias de las piezas dentales (la presencia de caries, la presencia de orificios en el extremo apical de la raíz y el desgaste dental) estén relacionados de forma directa con mayor o menor grado de daño molecular.

5.1.4 Evaluación De Los Factores Que Influyen En La Fragmentación Del ADN

Se ha llevado a cabo una valoración de cuáles de las variables analizadas afecta en mayor medida a una mayor fragmentación del ADN, imposibilitando la amplificación de tamaños moleculares determinados o incluso impidiendo la amplificación por completo.

Para realizar este estudio se han creado dos variables denominadas: “Máximo tamaño molecular

amplificable en ADN mitocondrial" y "Máximo tamaño molecular amplificable en ADN nuclear". Se valoran de forma independiente las porciones mitocondrial y nuclear ya que mientras el ADN nuclear solamente presenta dos copias por célula, el mitocondrial puede presentar cientos de miles, por lo cual es esperable que los mayores tamaños amplificables correspondan con el ADN mitocondrial, por ello trataremos las dos variables de manera independiente.

Se ha empleado un test *t* de Student para evaluar el efecto de las diferentes características de la muestra (variable cualitativa dicotómica) sobre el máximo tamaño molecular amplificado (variable cuantitativa). A continuación se muestran los resultados obtenidos. Tal como se puede observar en todas las tablas relativas a análisis del test *t* de Student, dicho test va acompañado del test de Levené, este es un estadístico inferencial de la igualdad de varianzas, nos indica si es correcto o no aceptar la suposición de igualdad de varianzas, de modo que cuando el p-valor del test de Levené es inferior a 0,05 no es fiable asumir la igualdad de varianzas.

5.1.4.1 El Efecto De La Utilización De Muestras Fragmentadas Sobre La Fragmentación Del ADN

En la *Tabla 42* se observa una relación directa entre la fragmentación de la muestra y un incremento en el grado de fragmentación de las cadenas de ADN; concretamente, en el caso del ADN mitocondrial se observa que ha sido imposible la amplificación de fragmentos de ADN con longitudes de en torno a las 206 pb cuando la muestra estaba fragmentada frente a más de 235 pb cuando está completa (una diferencia de casi 30 pb); en el caso del análisis de STRs de ADN nuclear por encima de 175 pb cuando la pieza está completa, frente a unas 103 pb amplificables en piezas fragmentadas. Además, esta relación entre la fragmentación de la muestra y la fragmentación de las cadenas de ADN es estadísticamente significativa. De hecho, en el caso del ADN mitocondrial cuando dispusimos de piezas completas fue posible amplificar fragmentos con una media de 30 pares de bases más de longitud que cuando la pieza estaba fragmentada. En el caso del ADN nuclear conseguimos amplificar una media de 70 pares de bases más que cuando la muestra se encontraba fragmentada.

MUESTRA FRAGMENTADA		FRAGMENTACIÓN N	Media	Desviación estándar	Error	Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	NO	48	235,83	29,01	4,19	0,07	0,005
	SÍ	21	206,29	55,14	12,03		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	NO	86	175,38	124,08	13,38	0,54	0,015
	SÍ	28	103,71	131,12	24,78		

Tabla 42. Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la fragmentación de la muestra analizada.

5.1.4.2 Tipo De Tejido: Dental U Óseo

Tal como podemos observar en la *Tabla 43*, los máximos tamaños moleculares amplificados en dientes han sido mayores que los amplificados en hueso, tanto en ADN mitocondrial como en ADN nuclear lo cual parece apuntar a una mejor preservación del ADN en los dientes, tal como venían apuntando todos los datos obtenidos hasta el momento. Sin embargo, las diferencias en la amplificación de ADN mitocondrial entre las piezas dentales y óseas no son estadísticamente significativas, frente a los resultados de la amplificación de STRs de ADN nuclear, en cuyo caso las diferencias en los tamaños moleculares amplificables sí que son significativas ($p<0,001$) entre piezas dentales y óseas. En el caso del ADN nuclear la diferencia en los tamaños moleculares amplificables varía alrededor de 80 pares de bases de diferencia entre aquellas muestras fragmentadas y las que se encontraban íntegras (ver *Tabla 43*).

TIPO DE TEJIDO		TIPO DE TEJIDO				Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar		
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Diente	45	232	29,63	4,42	0,08	0,24
	Hueso	25	218	54,79	10,96		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Diente	91	180	120,75	12,66	0,50	0
	Hueso	30	86	128,47	23,46		

Tabla 43. *Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función del tipo de tejido.*

5.1.4.3 El Efecto De la Presencia De Grietas En La Muestra Sobre La Fragmentación Del ADN

La utilización de muestras con grietas para analizar tanto STRs de ADN nucelar como fragmentos de ADN mitocondrial no parece haber afectado significativamente a la obtención de amplificados de mayor o menor tamaño, es decir, la presencia de grietas en este caso no parece haber provocado una mayor fragmentación del ADN. A pesar de que se aprecian mayores tamaños moleculares en las piezas sin grietas, las diferencias no son estadísticamente significativas (*Tabla 44*).

GRIETAS		PRESENCIA DE GRIETAS				Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
		N	Media	Desviación	Error estándar		
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Presencia	6	175,17	91,77	37,46	0	0,192
	Ausencia	63	231,76	29,36	3,70		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Presencia	21	111,76	136,32	29,75	0,25	0,070
	Ausencia	93	168,17	125,76	13,04		

Tabla 44. *Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la presencia o ausencia de griegas.*

5.1.4.4 El Efecto De La Utilización De Muestras Tratadas Con Consolidantes Y/O Sigladas Con Rotuladores Permanentes Sobre La Fragmentación Del ADN

Anteriormente pudimos observar que los consolidantes actuaban generando daño molecular de manera significativa. En este caso en el análisis de ADN mitocondrial también se ha observado amplificación de tamaños moleculares significativamente menores (de unas 20 pares de bases menos concretamente) a partir de muestras tratadas con consolidantes. Sin embargo, en el caso de los STRs de ADN nuclear, no se ha percibido que la presencia de pegamento en la muestra esté significativamente relacionada con el incremento de la fragmentación en las cadenas de ADN (*Tabla 45*).

PRESENCIA DE CONSOLIDANTES						Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
CONSOLIDANTES O PEGAMENTOS		N	Media	Desviación estándar	Error estándar		
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Presencia	13	244,54	22,64	6,28	0,15	0,015
	Ausencia	56	222,73	43,05	5,75		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Presencia	14	133,71	129,88	34,71	0,86	0,469
	Ausencia	100	161,15	129,21	12,92		

Tabla 45. Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de muestras que presenten pegamentos o consolidantes.

Siguiendo en la línea de lo observado en cuanto al daño molecular, aquí también observamos que las muestras que presentaron algún tipo de rótulo también presentan el ADN muy fragmentado. En el caso del ADN mitocondrial las diferencias en los tamaños moleculares amplificados no son significativas entre muestras con presencia de tintas y sin ella. Pero en el caso de la amplificación de STRs de ADN nuclear aquéllas muestras que presentaban siglados con rotulador indeleble fue imposible la amplificación de ADN nuclear en ningún caso (Ver *Tabla 46*).

UTILIZACIÓN DE MUESTRAS ROTULADAS CON BOLIGRAFOS PERMANENTES						Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
TINTAS		N	Media	Desviación estándar	Error estándar		
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Presencia	5	203,4	35,05	15,68	0,88	0,19
	Ausencia	64	228,67	40,87	5,11		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Presencia	12	0	0	0	0	0
	Ausencia	102	176,34	123,78	12,26		

Tabla 46. Resultados del test t de Student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de muestras para el análisis que presenten rótulos con tinta indeleble.

5.1.4.5 El Efecto De Las Alteraciones De Las Piezas Dentales: Presencia De Caries, Desgaste Dental Y Orificios Apicales En La Raíz, Sobre La Fragmentación Del ADN

Según los datos obtenidos (*Tablas 47, 48 y 49*) parece que ninguna de las variables analizadas (presencia de caries, aparición de orificios en el extremo apical de la raíz y desgaste dental) influyen de manera significativa sobre la fragmentación de las cadenas de ADN.

PRESENCIA DE CARIES						Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
CARIES		N	Media	Desviación estándar	Error estándar		
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Presencia	1	179	.	.	-	0,07
	Ausencia	43	233	28,97	4,42		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Presencia	3	255,67	49,66	28,67	0,03	0,29
	Ausencia	81	180,86	120,93	13,44		

Tabla 47. *Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la presencia o ausencia de caries en la muestra analizada.*

PRESENCIA DE ORIFICIOS EN LA REGIÓN APICAL DE LA RAÍZ						Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
ORIFICIOS EN EL ÁPICE DE LA RAÍZ		N	Media	Desviación estándar	Error estándar		
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Presencia	11	245,36	23,78	7,17	0,23	0,06
	Ausencia	33	227,24	30,49	5,31		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Presencia	15	142,93	131,88	34,05	0,30	0,20
	Ausencia	69	192,36	116,15	13,98		

Tabla 48. *Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de piezas dentales que presenten sus extremos radiculares abiertos.*

PRESENCIA DE DESGASTE DENTAL						Sig. Test Levené para igualdad de varianzas asumida	Sig. Test t de Student para igualdad de medias
DESGASTE DENTAL		N	Media	Desviación estándar	Error estándar		
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Presencia	7	223	36,86	13,93	0,49	0,65
	Ausencia	32	230,07	29,31	5,18		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Presencia	18	176,44	123,87	29,20	0,69	0,62
	Ausencia	61	193,02	116,60	14,93		

Tabla 49. Resultados del test T-student para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función de la utilización o no de piezas dentales con desgaste en la corona.

5.1.4.6 El Efecto De La Coloración De La Muestra Sobre La Fragmentación Del ADN

Finalmente, para evaluar el efecto de la variable "coloración de la muestra" sobre el grado de fragmentación del ADN se ha empleado una ANOVA para contrastar la variable cualitativa multivariante "Coloración de la muestra" frente a las cuantitativas "máximo tamaño molecular amplificable del ADN mitocondrial" y "máximo tamaño molecular amplificable del ADN nuclear". Los resultados pueden verse en la siguiente *Tabla 50*.

	Coloración de la muestra								
	Color	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo	F	Sig
Máximo tamaño amplificado ADN mitocondrial	Natural	59	224,1	43,13	5,62	0	255	1,03	0,36
	Anaranjado	1	225	.	.	225	225		
	Marrón-oscuro	9	245	15	5	225	255		
	TOTAL	69	226,84	40,78	4,91	0	255		
Máximo tamaño amplificado ADN nuclear	Natural	98	151,77	129,52	13,08	0	300	1,03	0,36
	Anaranjado	3	244	36,37	21	202	265		
	Marrón-oscuro	13	183,23	134,57	37,32	0	300		
	TOTAL	114	157,78	129,03	12,08	0	300		

Tabla 50. Resultados del anova para valorar los máximos tamaños moleculares amplificables en función del color de la muestra analizada.

El color de la muestra no parece afectar de manera significativa a la fragmentación del ADN.

5.1.5 Evaluación Mediante PCR A Tiempo Real De La Eficiencia De Los Distintos Protocolos De Extracción De ADN Empleados

5.1.5.1 Protocolo De Extracción Laboratorio 1 Vs. Protocolo De Extracción Laboratorio 2

Tal como se expone en el apartado correspondiente de material y métodos (apartado 4.2.2.10), el proceso experimental de la segunda muestra de 31 de los individuos estudiados fue realizado en un laboratorio diferente al de la primera muestra. El protocolo de extracción empleado en el laboratorio 2 fue diferente al del laboratorio 1 y uno de los objetivos metodológicos de esta tesis consiste en valorar la eficiencia de los dos protocolos de extracción.

Para ello se ha empleado la técnica de la PCR a tiempo real, mediante la cual se amplifican dos fragmentos de diferente tamaño del *D-loop* mitocondrial (apartado 4.2.2.10).

En la *Tabla 51* se recogen los resultados obtenidos tras la amplificación por PCR a tiempo real, así como una relación entre los resultados obtenidos en los dos laboratorios.

Hay que mencionar que la elución de ADN en el último paso de la extracción del protocolo del laboratorio

1 se realizó con 60 ul de buffer, mientras que en el caso del laboratorio 2 se emplearon 100 ul. Esto hace que el ADN extraído en el laboratorio 2 se encuentre más diluido que el primero, por ello se ha ajustado el valor resultante de la cuantificación para que esa descompensación se vea corregida, esta corrección (observable en la cuarta columna *(Qty LAB 2 CORREGIDO)* de la *Tabla 51* es la que se ha empleado para obtener las relaciones finales entre los dos protocolos.

En la *Tabla 51* se muestran los resultados relativos de la cuantificación por PCR a tiempo real sobre los extractos obtenidos mediante los dos protocolos de cada uno de los laboratorios. Además, en la última columna de la derecha se muestra la relación entre las cantidades de ADN obtenidas mediante un protocolo y el otro (*Tabla 51*).

El estudio de cuantificación por PCR tiempo real ha sido llevado a cabo en 19 individuos del total, ya que se incluyeron aquellos que fueron replicados en los dos laboratorios y de los cuales se disponía de suficiente extracto de ADN tras hacer el resto de análisis. De ese conjunto, en 13 individuos se ha conseguido una mayor cantidad de ADN con el protocolo del laboratorio 1 que con el del laboratorio 2 (indicados con color rojo en la última columna de la *tabla 51*). En 4 de los individuos ha sido más eficiente el protocolo de extracción del laboratorio 2 (indicados con color violeta en la última columna de la *tabla 51*) y en los 2 individuos restantes no se ha obtenido ninguna cantidad de ADN mediante ninguno de los dos protocolos empleados (indicados con guiones negros en la última columna de la *tabla 51*).

A rasgos generales podemos afirmar que el protocolo de extracción empleado en el laboratorio 1 ha resultado más eficiente que el empleado en el laboratorio 2. No obstante, los resultados obtenidos mediante el protocolo del laboratorio 2 han resultado de gran utilidad para confirmar los del laboratorio 1.

INDIVIDUO	FRAGMENTO	Qty LAB 2	Qty LAB 2 CORREGIDO	Qty LAB 1	RELACIÓN LAB 1/LAB 2
1REV	CORTO	1146.11	2173,35	52380,87	24,10144247
1REV	LARGO	384.12	742,57	14532,78	19,57101046
2REV	CORTO	198.15	311,82	67014,99	214,9179219
2REV	LARGO	35.99	79,72	2295	28,78946268
4REV	CORTO	1814.47	2934,97	33167,25	11,3007246
4REV	LARGO	228.55	455,10	5169,45	11,3589321
5REV	CORTO	4144.02	7172,90	72546,09	10,11391348
5REV	LARGO	836.48	1787,53	6366,75	3,561751762
6REV	CORTO	1609.73	2363,35	195376,68	82,66938033
6REV	LARGO	126.99	243,03	85201,29	350,5745028
8REV	CORTO	2479.02	3833,07	14233,05	3,713227877
8REV	LARGO	643.55	1013,37	1576,65	1,555853426
2CER	CORTO	4674.79	7804,63	26845,92	3,43974135
2CER	LARGO	880.06	1226,98	13644,6	11,12044445
1HU	CORTO	3291.62	5510,60	73285,77	13,29905455
1HU	LARGO	769.89	1055,07	19144,26	18,1450714
1PA	CORTO	0	0,00	448,44	-
1PA	LARGO	0	0,00	0,00	-
1CER	CORTO	605.52	818,98	476,37	0,581660188
1CER	LARGO	383.55	505,50	460,29	0,910563798
3CER	CORTO	83.68	216,58	1411,14	6,515459792
3CER	LARGO	40.41	128,52	303,03	2,357904293
4CER	CORTO	12595.05	22054,68	3797,64	0,172191999
4CER	LARGO	1659.91	2784,22	1993,5	0,716000311
7REV	CORTO	19667.78	33127,80	169192,26	5,10725916
7REV	LARGO	5479.56	9307,33	78596,43	8,444570231
1RET	CORTO	0	0,00	0,00	-
1RET	LARGO	0	0,00	0,00	-
1TC	CORTO	4165.30	7357,17	1073,61	0,145927101
1TC	LARGO	850.49	1794,57	174,12	0,097026209
1ST	CORTO	18640.54	29829,93	96270,99	3,227328366
1ST	LARGO	2928.70	5342,47	29572,59	5,535381285
1FM	CORTO	111.50	312,93	3496,56	11,17349808
1FM	LARGO	0	0,00	1230,54	-
2FM	CORTO	357.46	542,97	4189,77	7,716440543
2FM	*LARGO*	31.18	0,00	739,71	-
1QUO	*CORTO*	5306.04	9521,77	241,74	0,025388146
1QUO	*LARGO*	876.24	1265,95	0,00	0

Tablas 51. Resultados relativos de la cuantificación por PCR a tiempo real sobre los extractos obtenidos mediante los dos protocolos empleados en el laboratorio 1 y el laboratorio 2. En la última columna de la derecha se indican en color rojo aquellos valores que resultaron indicar una mejor eficiencia del protocolo del laboratorio 1 (valores por encima de 1) y en violeta, aquellos que indican una mayor eficiencia del protocolo empleado en el laboratorio 2 (valores por debajo de 1).

5.1.5.2 Protocolos De Extracción De ADN Destructivos Vs. Protocolo De Extracción De ADN No Destructivo

Además de los dos protocolos de extracción empleados en los distintos laboratorios, también se utilizó un tercer protocolo de extracción. Debido a los problemas que implica la destrucción de muestras únicas como las aquí utilizadas, se ha realizado un intento por tratar de extraer ADN sin la necesidad de destruir la muestra analizada.

Tras la extracción, se cuantificó la cantidad de ADN extraído mediante PCR a tiempo real; los resultados obtenidos tras la cuantificación de los extractos de ADN obtenidos por los tres protocolos (laboratorio1, laboratorio2 y protocolo no destructivo) de se resumen en la *Tabla 52*.

Individuo	Fragmento	Qty LAB 2	Qty LAB 2 corregido	Qty LAB 1	Qty protocolo 3	Relación lab 1/ protocolo 3	Relación lab 2 / protocolo 3
1CER	CORTO	605.52	818,98	476,37	1698,69	0,280433746	0,482126423
1CER	LARGO	383.55	505,50	460,29	0	-	-
2CER	CORTO	4682,78	7804,63	26845,92	835,53	32,13040824	9,340937289
2CER	LARGO	736,19	1226,98	13644,6	411,03	33,19611707	2,985143015
3CER	CORTO	83.68	216,58	1411,14	1065,39	1,324529046	0,203290188
3CER	LARGO	40.41	128,52	303,03	540,93	0,560201875	0,237584654
4CER	CORTO	12595.05	22054,68	3797,64	14294,37	0,265673828	1,542892994
4CER	LARGO	1659.91	2784,22	1993,5	3659,19	0,5447927	0,760883328

Tabla 52. Resultados de la cuantificación de por PCR a tiempo real de los productos obtenidos mediante extracción de ADN destructiva y no destructiva. En las últimas columnas de la derecha se muestran las relaciones entre los protocolos de los laboratorios 1 y 2 frente al protocolo número 3, no destructivo. Están marcados en verde aquellos casos en los que la cantidad de ADN obtenida mediante el protocolo de extracción no destructivo es mayor que en los demás, en rojo se indica cuando el mejor protocolo resulta ser el del laboratorio 1 y en violeta cuando el más eficiente es el del laboratorio 2.

Si observamos detenidamente los resultados observamos que están bastante repartidos, y es difícil determinar con claridad si el protocolo no destructivo podría ser tan eficiente como los demás, aunque en principio los resultados apuntan a que puede ser tan eficiente como cualquiera de los otros.

Además debemos añadir que para que el protocolo pudiera considerarse "no destructivo" las características físicas de la pieza analizada deberían ser idénticas antes y después de la extracción. Para controlar este dato se tomaron fotografías de cada una de las muestras antes y después de llevar a cabo la extracción por

el protocolo no destructivo, y se comprobó que a pesar de no taladrar o triturar la muestra, el efecto de los agentes químicos empleados en la solución de lisis afectaron notablemente a la apariencia macroscópica de todas las muestras. En la *Figura 50* podemos observar las diferencias en cada una de las muestras antes y después de su procesamiento por el protocolo de extracción no destructivo.

En general macroscópicamente parece que todas las muestras pierden coloración, resultando más pálidas tras el tratamiento. Del mismo modo se incrementa la porosidad de las mismas y se pierde grosor en las capas óseas. En la única pieza dental (4CER3) también es observable un adelgazamiento de la dentina que incluso deja a la vista capas más internas de la raíz del diente. Dicho adelgazamiento es claramente observable en la fotografía de la *Figura 50*. Por ello, es necesario decir que la apariencia física macroscópica de las muestras no es exactamente la misma que presentaban antes de someterlas al tratamiento de extracción.

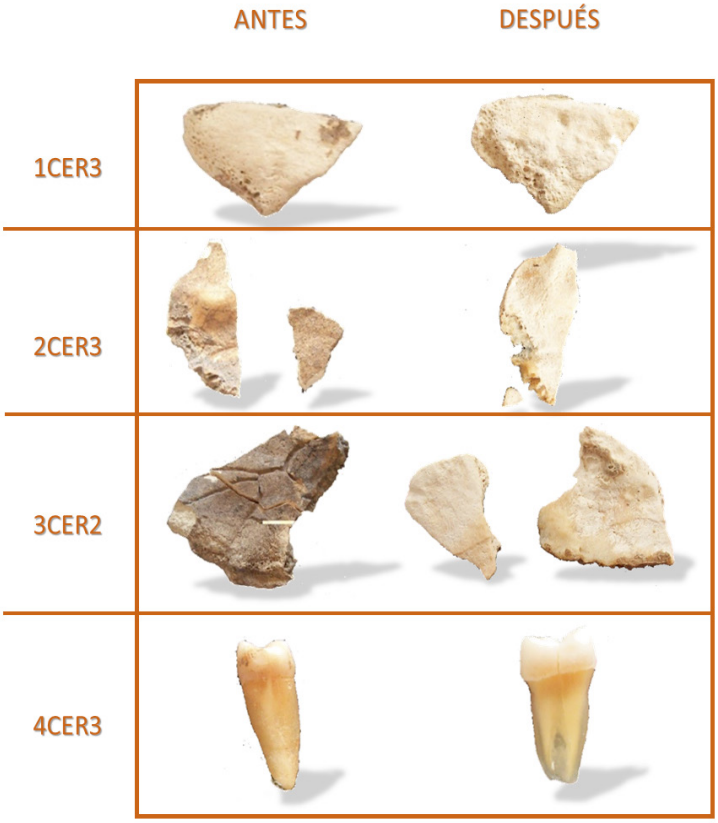


Figura 50. Imágenes de las muestras sometidas al protocolo de extracción no destructivo.

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

5.2 CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES ASOCIADAS AL ADN MITOCONDRIAL: ANÁLISIS DIACRÓNICO Y SINCRÓNICO.

5.2.1 Análisis Específico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis

5.2.1.1 Haplotipos Mitocondriales

En la *Tabla 53* se muestran los haplotipos de ADN mitocondrial obtenidos para cada uno de los 94 individuos analizados. A partir de ahora dejaremos de tratar con muestras y hablaremos de individuos, dado que en los análisis anteriores interesaba el estado de preservación de cada muestra de forma independiente, pero a partir de este momento nos interesan solamente aquellos individuos con resultados válidos y replicables en sus dos muestras analizadas. En dicha tabla (*53*) se puede observar el rango de los fragmentos de ADN mitocondrial analizados, así como los haplotipos obtenidos en las Regiones Hipervariables I y II del ADN mitocondrial. En la última columna de la derecha se señalan aquellas muestras cuyos amplificados fueron clonados.

N	PERIODO	YACIMIENTO	INDV	RANGO	HVI	HVII	CLON
1	PCAMP	Los Cercados	1CER	(16105-16399)(50-390)	16126C 16193T 16278T	73G 150T 263G 295T 315.1C	SI
2	PCAMP	Los Cercados	2CER	(16105-16399)(50-390)	16224C 16311C 16319A	73G 152C 263G 315.1C	SI
3	PCAMP	Los Cercados	3CER	(16105-16293)(298-385)	16129A 16311C 16319A ó 16126C	73G 228A 263G 295T 315.1C	NO
4	PCAMP	Los Cercados	4CER	(16105-16399)(50-390)	16224C 16311C 16319A	SIN RESULTADO	NO
5	PCAMP	Trascabañas	1TC	(16105-16399)(50-390)	rrCRS	73G 150T 263G 315.1C 338T	NO
6	PCAMP	El Tomillar	1ATOM	(16105-16399)(50-190)	16362C / CONTAMINADO	150Y / CONTAMINADO	NO
7	PCAMP	El Tomillar	2ATOM	(16105-16399)	SIN RESULTADO		NO
8	PCAMP	El Tomillar	3ATOM	(16105-16399)(70-190)	16298C 16362Y? CON-TAMINADO	rCRS	NO
9	PCAMP	El Tomillar	4ATOM	(16105-16399)(119-305)	NO REPLICA	SIN RESULTADO	NO
10	PCAMP	El Tomillar	5ATOM	(16105-16399)(119-305)	NO REPLICA	SIN RESULTADO	NO
11	PCAMP	El Tomillar	6ATOM	(16105-16293)(298-385)	NO REPLICA	SIN RESULTADO	NO
12	PCAMP	El Tomillar	7ATOM	(16105-16293)(298-385)	CONTAMINADA/NO REPLICA	SIN RESULTADO	NO
13	PCAMP	El Tomillar	8ATOM	(16270-16399)	SIN RESULTADO		NO
14	PCAMP	El Tomillar	1BTOM	(16105-16293)(298-385)	NO AMPLIFICA	SIN RESULTADO	NO
15	PCAMP	El Tomillar	2BTOM	(16105-16399)(119-305)	NO REPLICA	NO AMPLIFCA	NO
16	PCAMP	El Tomillar	3BTOM	(16105-16293)(298-385)	NO REPLICA	SIN RESULTADO	NO
17	PCAMP	El Tomillar	4BTOM	(16270-16399)	16311C	SIN RESULTADO	NO
18	PCAMP	El Tomillar	5BTOM	(16105-16399)(40-90)	16126C	73G	NO
19	PCAMP	El Tomillar	6BTOM	(16105-16399)(50-306)	16126C 16299G	150T 239C 263G 291.1A	NO

20	PCAMP	El Tomillar	7BTOM	(16105-16399)(29-309)	16183C 16189C 16234A 16299G	263G 291.1A	NO
21	PCAMP	El Tomillar	8BTOM	(16105-16399)(29-190)	NO REPLICA	73G	NO
22	PCAMP	El Tomillar	9BTOM	(16105-16399)(29-309)	16183C 16189C 16234A 16299G	263G 291.1A	NO
23	PCAMP	Los Areneros	1ARE	(16106-16399)(29-309)	16224C 16311C	73G 263G	NO
24	PCAMP	Los Areneros	2ARE	(16105-16399)(29-389)	16224C 16311C 16319A	73G 152C 263G 277T 315.1C	NO
25	PCAMP	Los Areneros	5ARE	(16105-16399)(29-389)	16224C 16311C 16319A	73G 152C 263G 309.1C 315.1C	NO
26	PCAMP	Los Areneros	6ARE	(16105-16399)(29-389)	16224C 16311C	73G 150T 239C 263G 309.1C 315.1C	NO
27	PCAMP	Los Areneros	7ARE	(16105-16399)(29-389)	16126C	150T 239C 263G 309.1C	NO
28	PCAMP	Los Areneros	8ARE	(16105-16399)(29-389)	rCRS	263G 315.1C	NO
29	PCAMP	Los Areneros	9ARE	(16105-16399)(29-190)	no replica	73G	NO
30	PCAMP	Los Areneros	20ARE	(16105-16399)(29-60) (240-390)	16224C 16311C	73G 263G 309.1C 315.1C	NO
31	PCAMP	Los Areneros	24ARE	(16105-16293)(298-385)	16126C	309.1C 315.1C	NO
32	CAMP	El Mirador	1MIR	(16105-16399)(29-190) (290-412)	16298C	72C 309.1 315.1C	NO
33	CAMP	Cabezón	1CAB	(16105-16399)(29-190) (290-412)	16224C 16311C	73G 309.1C 315.1C	NO
34	CAMP	Cabezón	2CAB	(16105-16399)(29-190)	rCRS	73G	NO
35	CAMP	Pajares de Adaja	1PAD	(16105-16399)(29-310)	16189C	263 315.1C	NO
36	CAMP	Rivas Vaciamadrid	1RV	(16105-16399)(26-390)	rCRS	263G 315.1C	NO
37	CAMP	Tablada de Rudrón	2TR	(16105-16399)(119-305)	16145A 16224C 16311C	150T 263G 291.1A	NO
38	CAMP	Tablada de Rudrón	1TR	(16105-16399)(119-305)	16362C	239C 263G 291.1A	NO
39	CAMP	Tablada de Rudrón	3TR	(16105-16399)(119-305)	rCRS	263G 291.1A	NO
40	CAMP	Aldeagordillo	3ALG	(16105-16399)(119-305)	SIN RESULTADO	SIN RESULTADO	NO
41	CAMP	Aldeagordillo	2ALG	(16105-16399)(119-305)	SIN RESULTADO	SIN RESULTADO	NO
42	CAMP	Aldeagordillo	1ALG	(16105-16399)(119-305)	SIN RESULTADO	SIN RESULTADO	NO
43	CAMP	Perro alto	1PA	(16105-16399)(119-305)	16298C	73G 150T 263G 310.1C 338T	SI
44	CAMP	Retajones	1RET	(16105-16399)(119-305)	SIN RESULTADO	SIN RESULTADO	NO
45	CAMP	Tablada de Rudrón	4TR	(16105-16399)(119-305)	NO REPLICA	NO REPLICA	NO
46	BA	Santioste	1ST	(16105-16399)(29-390)	16234T	263G 315.1C	NO
47	BA	Santioste	2ST		SIN RESULTADO	SIN RESULTADO	NO
48	BA	Cueva de la Revilla	1REV	(16105-16399)(29-310)	16270T 16304C	73G 150T 228A 263G 291.1A	SI
49	BA	Cueva de la Revilla	2REV	(16105-16399)(29-310)	rCRS	64T 263G 291.1A	SI
50	BA	Cueva de la Revilla	3REV	(16105-16399)	16172C 16183C 16189C 16219G 16278T		SI

51	BA	Cueva de la Revilla	4REV	(16105-16399)(29-310)	16298C	72C 263G 291.1A	SI
52	BA	Cueva de la Revilla	5REV	(16105-16399)(50-390)	16224C 16311C	66A 73G 263G 291.1A 315.1C	SI
53	BA	Cueva de la Revilla	6REV	(16105-16399)(29-310)	rCRS	263G 291.1A	SI
54	BA	Cueva de la Revilla	7REV	(16105-16399)(29-390)	16129A 16223T	73G 152C 199C 204C 207A 250C 263G 315.1C	SI
55	BA	Cueva de la Revilla	8REV	(16105-16399)(29-310)	16192T 16270T	73G 150T 263G 291.1A	SI
56	PCOG	Fuente de La Mora	1FM	(16105-16240)(50-190)	16126C	73G	NO
57	PCOG	Fuente de La Mora	2FM	(16105-16399)(29-389)	NO REPLICA	NO REPLICA	NO
58	PCOG	Fuente de La Mora	3FM	(16105-16399)(29-389)	NO AMPLIFICA	NO AMPLIFICA	NO
59	PCOG	El Cementerio	1QUO	(16105-16399)(50-300)	16189C 16270T 16311C	73G 150T 263G	NO
60	PCOG	El Cerro	1ELC	(16105-16399)(50-190)	16298C	64T 72C	NO
61	PCOG	El Cerro	2ELC	(16105-16399)(50-190)	16298C	64T 72C	NO
62	PCOG	El Cerro	3ELC	(16105-16399)(50-190)	16298C	64T 72C	NO
63	PCOG	Los Tolmos	LTB3	(16105-16399)(29-120)	16224C 16311C 16362C	73G	SI
64	PCOG	Los Tolmos	LTB2	(16105-16399)	16224C 16311C	NO AMPLIFICA	SI
65	PCOG	Los Tolmos	LTB1	(16105-16399)(29-120)	16224C 16311C 16362C	73G	SI
66	PCOG	Los Tolmos	LTA4	(16105-16399)(118-390)	rCRS	263G 315.1C	SI
67	PCOG	Tordillos	1TOR	(16105-16399)(29-390)	16189C 16192T 16270T 16362C	73G 263G 315.1C	NO
68	PCOG	Tordillos	2TOR	(16105-16399)(29-310)	16362C	73G 150T 263G 291.1A	NO
69	PCOG	Tordillos	3TOR	(16105-16399)(29-389)	NO AMPLIFICA	NO AMPLIFICA	NO
70	PCOG	Tordillos	4TOR	(16105-16399)(29-120)	NO REPLICA	73G	NO
71	PCOG	Tordillos	5TOR	(16105-16399)(29-310)	16270T	73G 150T 263G 291.1A	NO
72	PCOG	Tordillos	6TOR	(16105-16399)(29-390)	rCRS	263G 315.1C	NO
73	PCOG	Tordillos	7TOR	(16105-16399)(29-310)	16362C	73G 150T 263G 291.1A	NO
74	PCOG	Tordillos	8TOR	(16105-16399)(29-390)	rCRS	263G 315.1C	NO
75	PCOG	Tordillos	9TOR	(16105-16399)(29-310)	16343G	73G 150T 263G 291.1A	NO
76	PCOG	Tordillos	10TOR	(16105-16399)(29-90)	16298C	72C	NO
77	PCOG	Tordillos	11TOR	(16105-16399)	NO REPLICA		NO
78	PCOG	Tordillos	12TOR	(16105-16399)	NO REPLICA		NO
79	PCOG	Los Rompizales	1RPZ	(16105-16399)(29-128)	16192T 16270T 16304C	73G	SI
80	PCOG	Los Rompizales	2RPZ	(16105-16399)(29-389)	rCRS	152C 263G 315.1C	SI
81	PCOG	Los Rompizales	3RPZ	(16105-16399)	16192T 16270T		SI
82	PCOG	Los Rompizales	4RPZ	(16105-16399)(29-389)	16126C 16292T 16294T	73G 146C 152C 263G 279C 309.1C 315.1C	NO
83	PCOG	Los Rompizales	5RPZ	(16105-16399)(29-389)	16126C 16286T	73G 185A 228A 263G 295T 315.1C	NO
84	PCOG	La Huelga	1HU	(16105-16399)(29-389)	16189C	263G 315.1C	SI
85	PCOG	Carrelasvegas	1CRV	(16105-16399)(29-190)	16298C	72C	SI

86	PCOG	Las Cañamonas	1CÑ	(16105-16399)(29-128)	16126C	73G	NO
87	PCOG	El Juncal	1JU	(16105-16399)	NO AMPLIFICA		NO
88	COG	Canto Blanco	1CB	(16105-16399)(26-390)	rCRS	263G 309.1C 315.1C	NO
89	COG	La Requejada	1LR	(16105-16399)	NO REPLICA		NO
90	COG	La Requejada	2LR	(16105-16399)	16293T 16298C	NO AMPLIFICADO	SI
91	COG	La Requejada	3LR	(16105-16399)(29-129)	rCRS	73G	NO
92	COG	Cerro de la Cabeza	1CC	16105-16399)(29-389)	NO REPLICA	NO AMPLIFICA	NO
93	COG	Cerro de la Cabeza	2CC	16105-16399)(29-389)	NO REPLICA	NO AMPLIFICA	NO
94	SF	San Pelayo	1SP	(16105-16399)(29-190)	16298C	72C	NO

Tabla 53. Haplotipos de ADN mitocondrial establecidos para cada individuo analizado. Se marcan con el fondo blanco aquellos resultados que son válidos y con el fondo gris aquellos cuya validación no ha sido posible por diferentes causas. Los periodos a los que pertenecen vienen indicados en la primera columna de manera abreviada (PCAMP: Precampaniforme; CAMP: Campaniforme; BA: Bronce Antiguo; PCOG: Protocogotas; COG: Cogotas I y SF: Soto Formativo).

5.2.1.2 Análisis Diacrónico De Los Periodos Estudiados En Esta Tesis

Para llevar a cabo el análisis de cambios en la composición genética de las poblaciones estudiadas de forma íntegra en esta tesis al o largo del tiempo, se ha empleado el software *Arlequin V.35* y se han establecido los grupos cronológicos definidos en el apartado 4.2.3.2.3.1 de Material y Métodos.

El primero análisis realizado sobre ese conjunto de grupos ha sido un análisis de la varianza molecular (AMOVA). En la *Tabla 54* se muestran los resultados obtenidos en la Amova de manera general.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	4	8,035	0,02438 Va	1,74
Entre poblaciones	18	27,414	0,11379 Vb	8,14
Entre individuos	40	50,392	1,25979 Vc	90,12

Tabla 54. AMOVA. Se observan los resultados del análisis de la varianza molecular entre los distintos grupos según un criterio temporal, entre los yacimientos pertenecientes a cada grupo y entre los individuos.

Tal como podemos observar en la *Tabla 54*, la variación más grande es la que existe entre los individuos y la menor entre los distintos grupos. Sin embargo, esta comparación a grandes rasgos puede no ser totalmente informativa, ya que las diferencias entre ciertos grupos pueden ser mayores entre unos que entre otros. Por ello, se ha llevado a cabo un segundo análisis de la AMOVA, realizando enfrentamientos entre los grupos 2 a 2. En la *Tabla 55* se pueden ver los resultados de este análisis.

	% de variación	Precampaniforme	Campaniforme	Bronce antiguo	Protocogotas I
Precampaniforme	Grupos				
	Poblaciones				
	Individuos				
Campaniforme	Grupos	5,37			
	Poblaciones	0,38			
	Individuos	94,26			
Bronce antiguo	Grupos	2,91	**16,06**		
	Poblaciones	10,17	-41.70		
	Individuos	86,92	125,64		
Protocogotas I	Grupos	5,99	-4.78	-9,39	
	Poblaciones	19,42	16,54	18,11	
	Individuos	74,59	88,23	91,28	
Cogotas I	Grupos	5,28	**0,77**	**16,87**	**-12,47**
	Poblaciones	10,52	-43,44	-46,18	25,85
	Individuos	84.19	142,67	129,32	86,61

Tabla 55. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2, siguiendo un criterio cronológico. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos, dentro de cada grupo (entre yacimientos o poblaciones) y entre individuos (dentro de cada yacimiento o población). Se marcan en blanco aquellos valores más significativos entre grupos.

El Bronce Antiguo es el grupo que muestra una mayor diversidad respecto de otros, concretamente respecto de la cultura Cogotas I (varianza molecular del 16,87%) y respecto del Campaniforme (con una varianza molecular del 16,06%). En segundo lugar, también se observa una varianza molecular elevada entre la cultura Cogotas I sus predecesores Protocogotas (12,47%). Y . La diversidad observada entre el Bronce Antiguo y el periodo Campaniforme puede ser algo más significativa por tratarse de grupos con un tamaño muestral más elevado.

En el lado opuesto, observamos una varianza molecular baja entre Cogotas I y Campaniforme (0,77), lo cual podría indicarnos cierta similitud genética entre estos dos grupos.

Por otro lado, se han estudiado las distancias genéticas entre grupos crono-culturales, creando una matriz de distancias genéticas FSTs de Slatkin, que se han representado en forma de gráfico MDS (*Figura 51*). En este caso, también se agruparon los individuos en función de su pertenencia a cada conjunto crono-cultural, y tal como se puede observar en la *Figura 51 s*e ha observado que el único grupo que presenta distancias FSTs significativamente elevadas respecto del resto de periodos es el periodo Precampaniformem más alejado del resto. Las distancias FSTs han sido representadas mediante un gráfico MDS que puede observarse en la *Figura 51*. La matriz de distancias FSTs correspondiente a este gráfico está disponible en el material suplementario de esta tesis (archivo S.1, HOJA FST1).

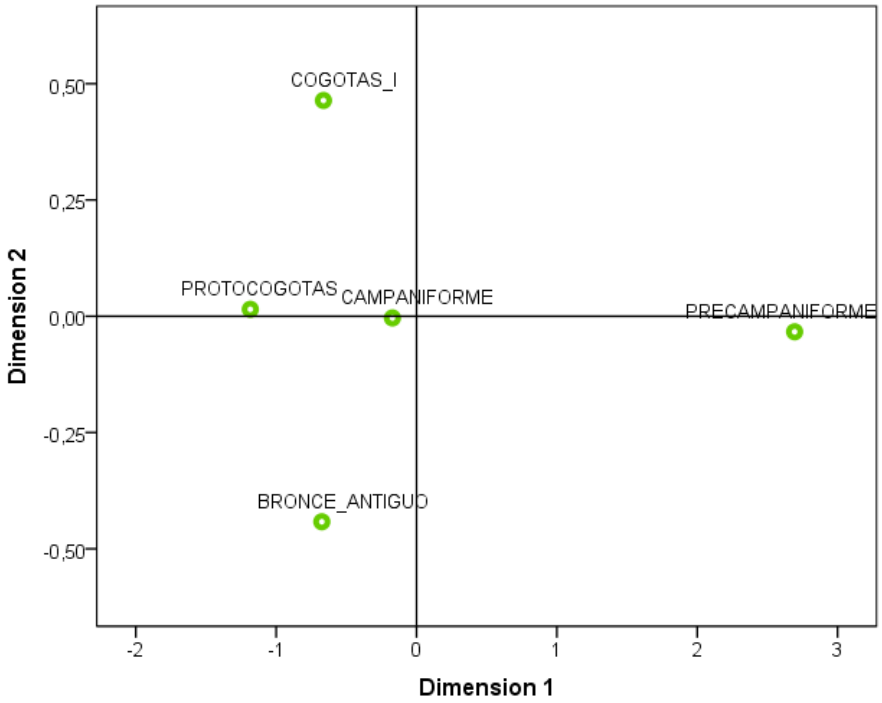


Figura 51. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los 6 periodos temporales estudiados: Precampaniforme, Campaniforme, Bronce antiguo, Protocogotas I y Cogotas I

En la *figura 51* se observa al grupo Precampaniforme como el más distante del resto, existiendo también cierto distanciamiento entre las poblaciones del Bronce antiguo y la cultura Cogotas I. En cualquier caso, del mismo modo que ocurría con el análisis de la varianza molecular, también cuando analizamos las distancias genéticas al hacerlo de manera global perdemos información relativa a las pequeñas interacciones entre unos grupos poblacionales y otros dentro de cada periodo crono-cultural. Por ello en este caso, también se han estudiado las distancias genéticas de manera puntual entre grupos consecutivos en el tiempo. Posteriormente dichas distancias genéticas han sido representadas en forma de gráficas de escala multidimensional (MDS), que se pueden observar en la *Figura 52.* En dicha figura observamos tres gráficas MDS que representan las distancias genéticas entre los individuos de los yacimientos Precampaniforme y campaniforme en primer lugar (en la gráfica superior izquierda), en segundo lugar entre Bronce antiguo y Protocogotas (en la gráfica superior derecha), y en tercer lugar culturas Protocogotas y Cogotas I (en la gráfica inferior). Únicamente se han representado estas interacciones por ser las únicas que presentaban distancias genéticas significativas para alguno de los yacimientos; en cualquier caso, la totalidad de las matrices de distancias FSTs están disponibles en el material suplementario de esta tesis (archivo S.1, hojas: MFST3, MFST4, MFST5).

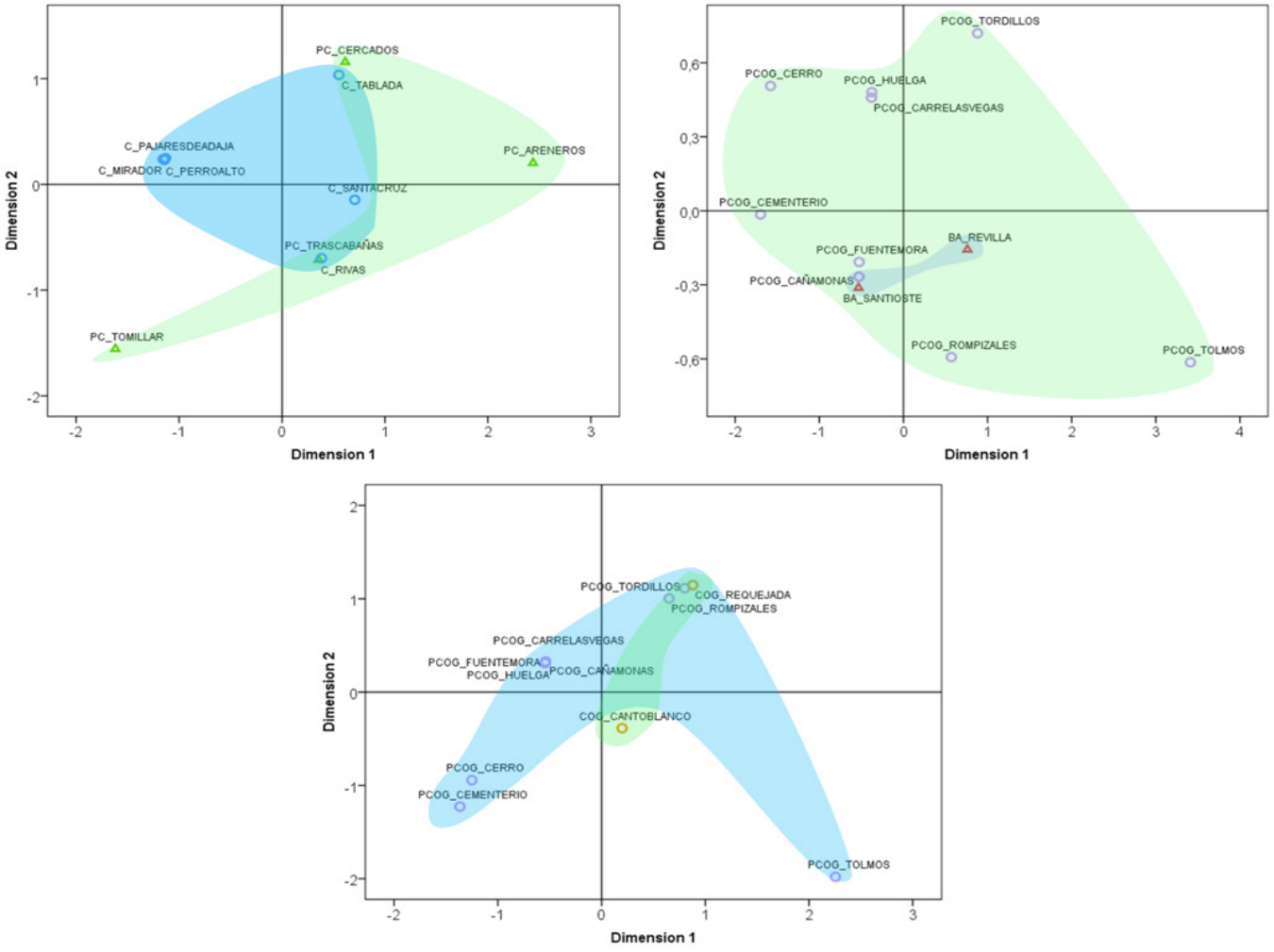


Figura 52. Representaciones MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin., En cada una de las tres representaciones se marca bajo un mismo área de color aquellos yacimientos pertenecientes al mismo periodo crono-cultural, de modo que las regiones donde se superponen las áreas de los dos colores (verde y azul) será dónde podemos encontrar los yacimientos genéticamente más próximos entre sí.

5.2.1.3 Análisis Sincrónico – Espacial De Los Yacimientos Estudiados En Esta Tesis

Para llevar a cabo el análisis sincrónico-espacial, se han seguido las pautas establecidas en el apartado 4.2.3.2.3.2 de Material y métodos. Y los grupos establecidos para el análisis llevado a cabo con el software *Arlequín v. 35* son fácilmente visibles en el mapa de la *Figura 37* de ese mismo apartado (4.2.3.2.3.2).

Los resultados de la Amova general realizada con la estructura grupal anterior, se muestran en la *tabla 56*.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	4	10,308	0,08685 Va	6,11
Entre poblaciones	18	25,840	0,07370 Vb	5,19
Entre individuos	40	50,392	1,25979 Vc	88,70

Tabla 56. AMOVA. Se observan los resultados del análisis de la varianza molecular entre los distintos grupos según el criterio geográfico, entre los yacimientos pertenecientes a cada grupo y entre los individuos.

A grandes rasgos observamos que la varianza molecular entre los grupos organizados según el criterio espacial o geográfico es notablemente superior (6,11) (*Tabla 56*) que la que observábamos entre los grupos organizados según el criterio temporal (1,74) (*Tabla 54*).

En cualquier caso, es interesante conocer las variaciones entre grupos 2 a 2 para poder establecer de un modo más exacto si existen grupos entre los que la variación genética sea mayor que entre otros. Por ello en la siguiente tabla (*Tabla 57*) se muestran los resultados del análisis de la AMOVA entre grupos organizados según el criterio geográfico 2 a 2 entre las regiones establecidas en el mapa de la *figura 37* de Material y métodos.

Según los resultados obtenidos tras el análisis de la Amova 2 a 2, se observa que el grupo geográfico que más diverge del resto es el de la Región 5, mostrando las varianzas moleculares más elevadas respecto de las Regiones 1, 3 y 4; no así respecto de la Región 2, con la que comparte una varianza molecular inferior (3,92). Por lo general parece que las varianzas moleculares entre distintas regiones no son elevadas, lo que indica que no parece haber diferencias genéticas notables entre los grupos que constituyen las diferentes regiones geográficas. El único grupo regional ligeramente distinto es el que se ubica en la Región 5.

	% de variación	Región 1	Región 2	Región 3	Región 4
Región 1	Grupos				
	Poblaciones				
	Individuos				
Región 2	Grupos	-3,65			
	Poblaciones	-30,76			
	Individuos	134,41			
Región 3	Grupos	-9,81	1,04		
	Poblaciones	5,95	-4.21		
	Individuos	103,86	103.17		
Región 4	Grupos	-9,68	4,87	-1.81	
	Poblaciones	8,89	-2,97	8,45	
	Individuos	100,79	98,10	93,36	
Región 5	Grupos	**13,60**	3,92	**11.30**	**15,63**
	Poblaciones	20,44	7,12	11,28	14,39
	Individuos	65,95	88,96	77,42	69,98

Tabla 57. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2, siguiendo un criterio geográfico. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos, dentro de cada grupo (entre yacimientos o poblaciones) y entre individuos (dentro de cada yacimiento o población).

En este caso, también se ha llevado a cabo el análisis de las distancias genéticas FSTs, atendiendo a la agrupación fundamentada en las distintas áreas geográficas estudiadas, de manera global y posteriormente comparando 2 a 2 cada pareja de regiones geográficas. De este modo podemos valorar si realmente las distancias geográficas están jugando un papel importante en la composición genética de la Submeseta en las poblaciones analizadas. Para observar los resultados de una manera más intuitiva, la matriz de distancias FSTs (disponible en el archivo S.1, hoja MFST2, del material suplementario) de Slatkin se ha representado en forma de MDS en la *figura 53*. Por lo general se observan también mayores distancias genéticas entre los yacimientos del norte (regiones 1 y 2) y los del sur (regiones 4 y 5), a excepción de los yacimientos de la región 3, que se encuentran próximos a los de la región 4.

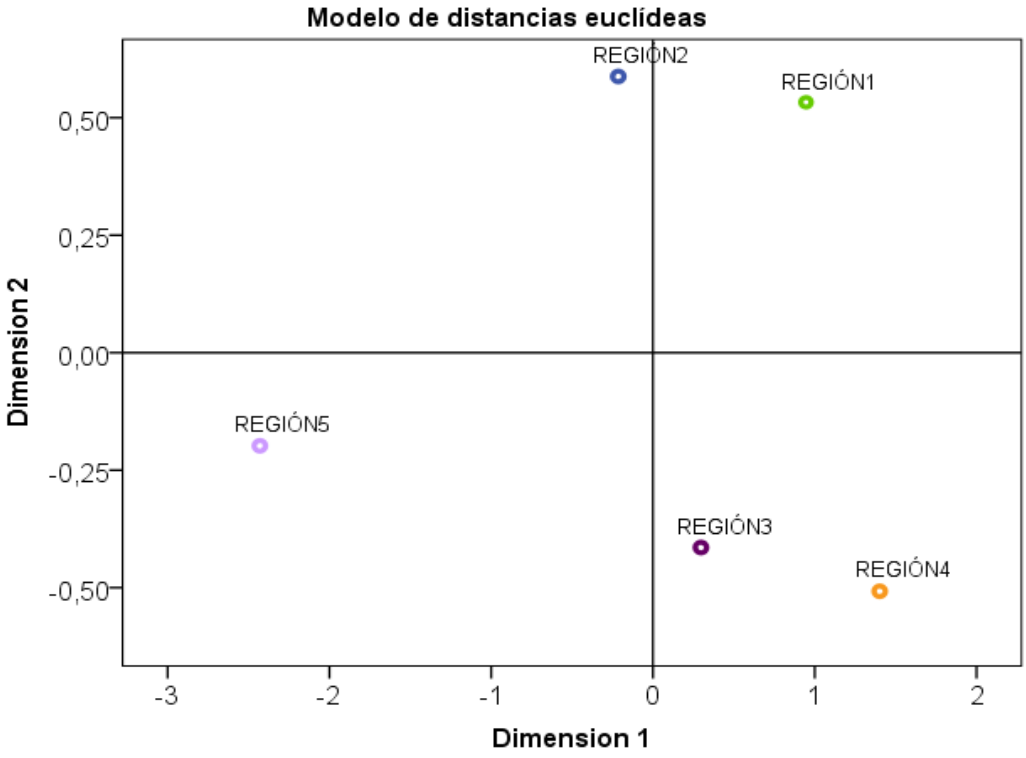
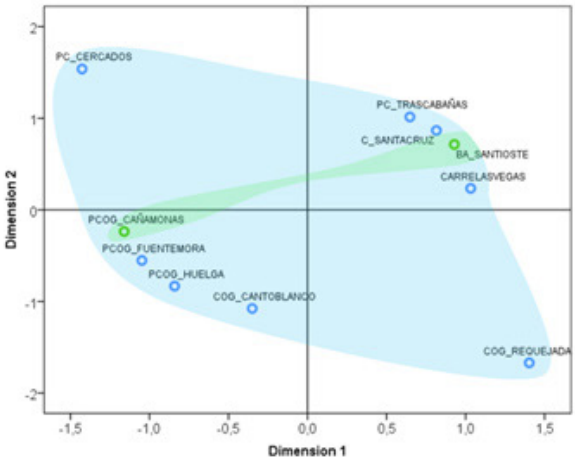
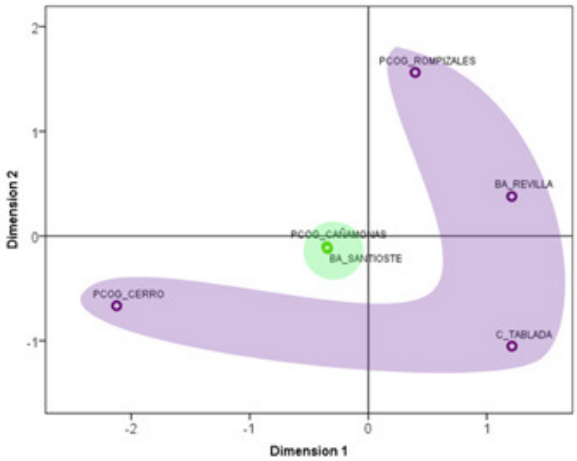


Figura 53. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre las 5 regiones geográficas establecidas. La región 1 representada en verde comprende los yacimientos de Cañamonas y Santioste. La región 2, representada en azul, comprende los yacimentos de: Santa Cruz de Cabezón, Fuente de la Mora, Los Cercados, Trascabañas, Carrelasvegas, La Huelga, Cantoblanco y La Requejada. La región 3, representada en morado oscuro, comprende los yacimientos de: El Cerro, Tablada de Rudrón, La Cueva de la Revilla y Los Rompizales. La región 4, en naranja, está formada por: El Tomillar, Pajares de Adaja, Perro Alto, Tordillos y El Cerro de San Pelayo. Finalmente la región 5, representada en color violeta claro, comprende los yacimientos de: Los Areneros, El Mirador, El Cementerio y Los Tolmos.

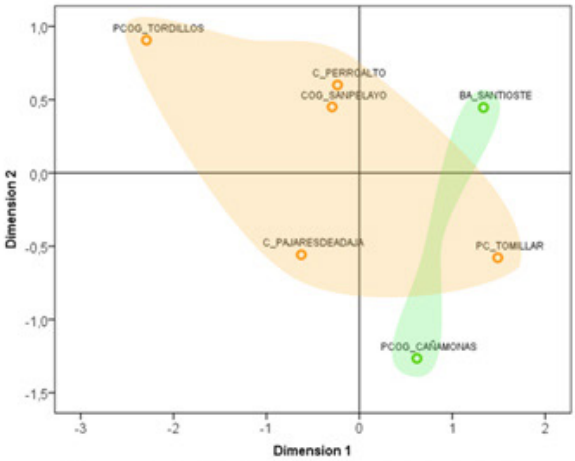
De igual modo, a continuación pueden observarse las representaciones multidimensionales correspondientes al estudio de distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los yacimientos ubicados en las distintas regiones geográficas que han sido analizadas 2 a 2 (*Figura 54*) y cuyas matrices de distancias genéticas pueden consultarse en el material suplementario (Archivo S.1, hojas: MFST6, MFST7, MFST8, MFST9, MFST10, MFST11, MFST12, MFST13, MFST14 y MFST15).



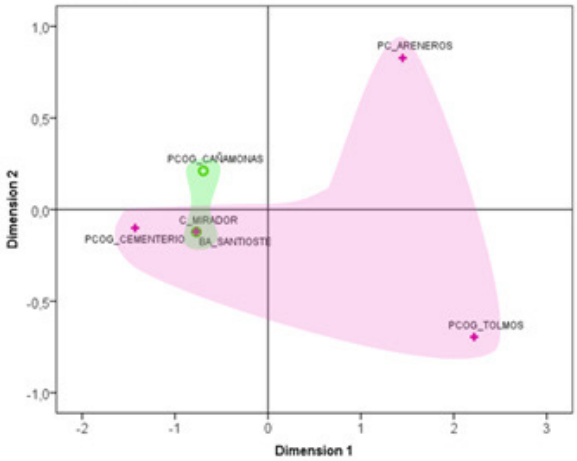
a. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 1 (verde) y la región 2 (azul).



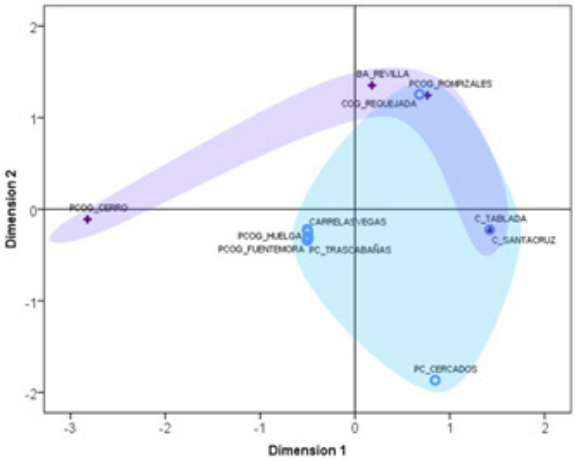
b. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 1 (verde) y la región 3 (morada).



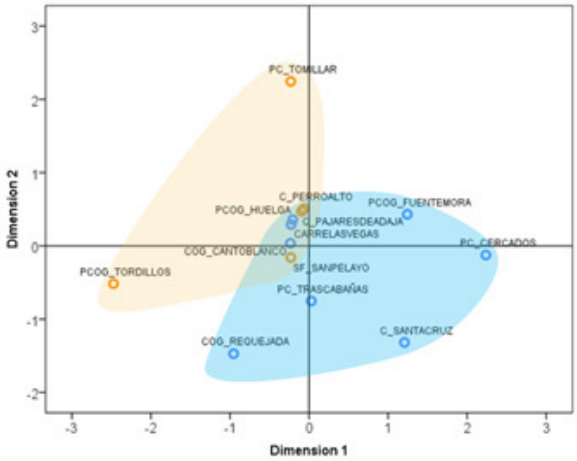
c. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 1 (verde) y la región 4 (naranja).



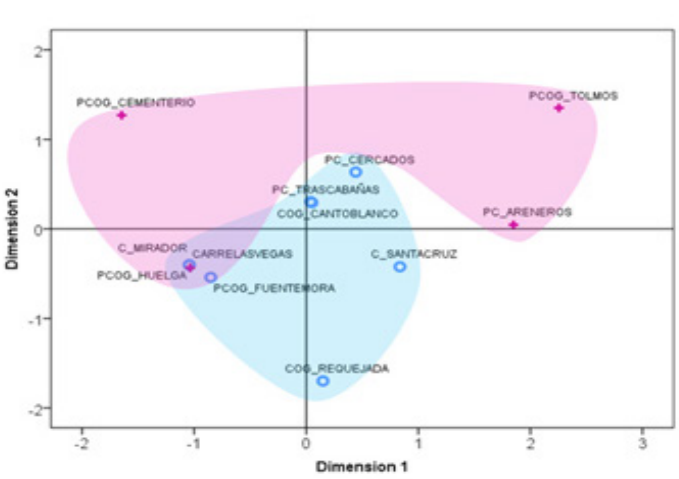
d. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 1 (verde) y la región 5 (rosa).



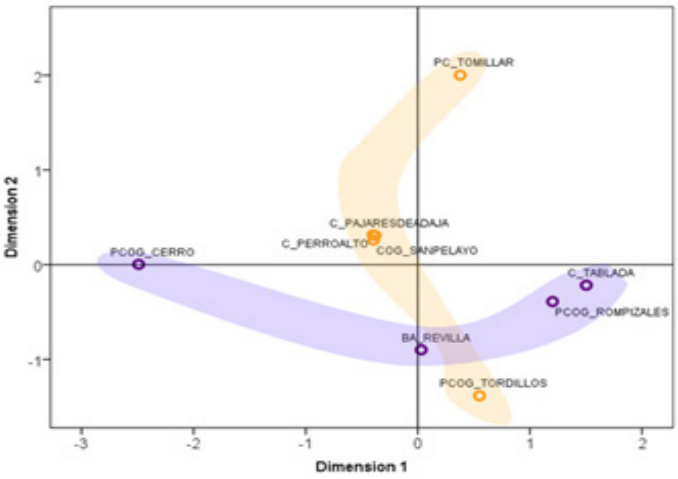
e. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 2 (azul) y la región 3 (morada).



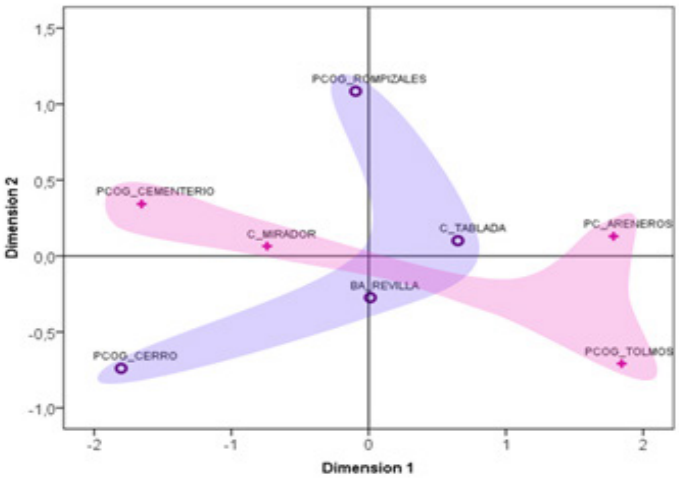
f. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 2 (azul) y la región 4 (naranja).



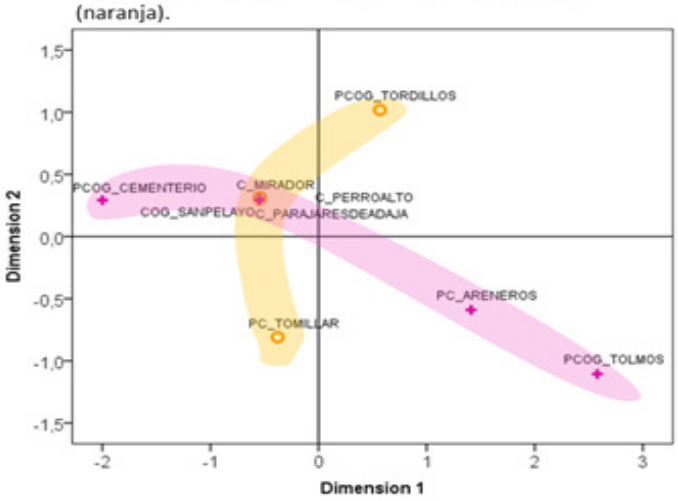
g. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 2 (azul) y la región 5 (rosa).



h. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 3 (morada) y la región 4 (naranja).



i. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 3 (morada) y la región 5 (rosa).



j. Representación MDS de las distancias genéticas entre los yacimientos situados en la región 4 (naranja) y la región 5 (rosa).

Figura 54. Representaciones MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin establecidas entre los yacimientos ubicados en las distintas áreas o regiones geográficas establecidas. En las 10 representaciones MDS, numeradas de la a a la j, se representan bajo un mismo área de color aquellos yacimientos pertenecientes a la misma región geográfica, de acuerdo a los colores establecidos en el mapa de la Figura 36, de modo que las regiones donde se superponen las áreas de los dos colores será dónde podemos encontrar los yacimientos genéticamente más próximos entre sí a pesar de pertenecer a Regiones diferentes. Además, los nombres de cada uno de los yacimientos vienen precedidos de unas siglas que resumen su pertenencia a cada uno de los distintos periodos crono-culturales (PC: Precampaniforme; C: Campaniforme; BA: Bronce Antiguo; PCOG: Protocogotas; COG: Cogotas I; SF: Soto Formativo).

En las gráficas MDS de la *Figura 54*, podemos observar las distancias genéticas entre las poblaciones de la región 1 y el resto de regiones. Observamos que las áreas coloreadas de la región1 y la región 2 se integran perfectamente, lo cual indica una gran proximidad genética entre ambas, siendo especialmente cercana la población del Bronce antiguo de Santioste a poblaciones como las Campaniformes de Carrelasvegas y Santa Cruz de Cabezón, aunque estos datos no son estadísticamente significativos dado el reducido tamaño muestral de cada uno de los yacimientos, pero pueden ser orientativos; y por otro lado la población de Las Cañamonas situada en la región 1, se encuentra próxima genéticamente a la de Fuente de la Mora y la Huelga, siendo todas ellas Protocogotas I. La región 1 se encuentra algo más alejada genéticamente de la región 3, aunque el reducido tamaño muestral de cada yacimiento tampoco permite obtener valores significativos de distancias genéticas (hojas MFST6 y MFST7 del archivo S.1 del material suplementario) (*Figura 54*). Lo mismo sucede en la comparación entre los yacimientos de la región 1 y la 4, entre los que no se observan distancias genéticas significativas, teniendo lugar la única distancia genética significativa entre el yacimiento PreCampaniforme del Tomillar y el Protocogotas I de Tordillos (distancia genética FST de Slatkin de 0,32239; p = 0,027) (hoja MFST8 del archivo S.1 del material suplementario), ambos de la región 4, pero a su vez lejanos en el tiempo.

En las gráficas de la *Figura 54* se pueden observar representadas las distancias genéticas de la **región 2** respecto del resto de regiones. En la gráfica e de esa figura, se observa una interacción cercana, con distancias genéticas muy próximas entre el yacimiento Protocogotas I de Los Rompizales y el Cogotas I de La Requejada, y por otro lado entre los yacimientos campaniformes de Tablada de Rudrón y Santa Cruz de Cabezón. Por otro lado, muestran distancias genéticas significativamente elevadas el Yacimiento PreCampaniforme de los Cercados respecto del yacimento del Bronce Antiguo - Protocogotas I de la Cueva de la Revilla (0,1927), sin embargo esta distancia seguramente tenga más que ver también con cuestiones cronológicas que geográficas. La otra distancia genética significativa que se observa se da entre los yacimientos Protocogotas I de El Cerro y Los Rompizales, aunque en este caso ambos yacimientos se localizan en la región 3, por lo que no son las fronteras hidrográficas las que están causando esta diferenciación entre dos yacimientos coetáneos y del mismo grupo crono-cultural, quizá en este caso podrían estar interviniendo otras cuestiones de índole cultural para que se produzca esta diferenciación genética.

En el gráfico f de la *Figura 54* observamos distancias genéticas muy cortas entre los yacimientos Campaniformes de Perro Alto y Pajares de Adaja, ambos en la región 4; y entre el yacimiento Cogotas I de Cantoblanco y el del Soto Formativo de San Pelayo en regiones 2 y 4 respectivamente, aunque en ninguno de esos casos los valores obtenidos son significativos. Sí es significativa la distancia genética entre los yacimientos PreCampaniformes de Los Cercados y El Tomillar (0,337; p= 0,05) (matriz de distancias de la hoja MFST11 del archivo S.1 del material suplementario) ambos en la región 2; y entre El Tomillar y Tordillos; y entre este último y Los Cercados, aunque en este caso se debe a una cuestión temporal y no geográfica (ya que Tordillos es Protocogotas, mientras que los otros dos son preCampaniformes). Si observamos las distancias genéticas establecidas entre la región 2 y la región 5 (en la gráfica g de la *figura*

54 y la matriz de la hoja MFST12 del archivo S.1 del material suplementario), se observa gran proximidad entre el yacimiento Campaniforme de El Mirador y los yacimientos de Protocogotas I de La Huelga y Carrelasvegas, pero de nuevo este dato no es significativo debido al reducido tamaño muestral. En general en el resto de casos se observa cierto distanciamiento entre las dos región (2 y 5), aunque no han resultado significativas en ningún caso (matriz de la hoja MFST12 del archivo S.1 del material suplementario).

En las gráficas h e i de la *Figura 54*, podemos observar las distancias genéticas existentes entre los yacimientos localizados en la **región 3** respecto de los localizados en el resto de regiones. Entre las regiones 3 y 4 (gráfico h de la *Figura 54*) se observa una gran dispersión de los yacimientos, no observándose una asociación clara entre los yacimientos pertenecientes a la misma región, como ocurría entre las regiones 2 y 5; sin embargo en este caso si se aprecia una distancia genética significativa entre el yacimiento de El Tomillar y la Cueva de la Revilla (distancia FST de 0,1417; p = 0,027) (matriz de distancias genéticas de la hoja MFST13 del archivo S.1 del material suplementario), explicable seguramente en términos cronológicos, por ser el primero del periodo PreCampaniforme y el segundo del Bronce Antiguo y del Protocogotas I.

Finalmente en las gráficas MDS i y j de la *Figura 54*, podemos analizar las distancias genéticas entre las regiones 3 y 5, y 4 y 5 respectivamente. La primera de ellas no muestra interacciones cercanas entre ninguno de los yacimientos de las dos regiones (3 y 5), de hecho existen distancias genéticas significativamente elevadas entre el yacimiento PreCampaniforme de Los Areneros, y los yacimientos Protocogotas I de Rompizales (0,3839; p =0,009), El Cerro (1; p = 0,027) y la Cueva de la Revilla (0,19; p= 0,027) (ver matriz de distancias de la hoja MFST14 del archivo S.1 del material suplementario). Aquí se observa claramente que esa diferenciación entre la región 3 y la región 5, viene marcada por cuestiones cronológicas y no geográficas; ya que los yacimientos que presentan distancias genéticas significativamente altas son yacimientos a su vez pertenecientes a periodos cronológicos separados en el tiempo, por lo que lo que aquí se observa no es una barrera geográfica que impida la mezcla poblacional, sino un claro reflejo de una distancia temporal. En el último gráfico, apartado j de la *Figura 54*, observamos una enorme proximidad entre los yacimientos Campaniformes de El Mirador (n=1), Perro Alto (n=1) y Pajares de Adaja (n=1), estando situado el primero en la región 5 y los otros dos en la región 4, lo cual evidencia que poblaciones del mismo periodo temporal se asemejan a pesar del distanciamiento geográfico, al menos durante el periodo Campaniforme. Sin embargo durante el PreCampaniforme sí que se observa un distanciamiento genético significativo, que se aprecia de forma clara entre la población de Los Areneros (n=8) y El tomillar (n=5) (distancia genética de 0,44483; p = 0,009) (ver matriz de distancias genéticas de la hoja MFST15 del archivo S.1 del material suplementario). Del mismo modo, también se aprecia una distancia significativa entre los yacimientos Protocogotas I de las regiones 4 y 5, concretamente entre Tordillos (n=2) y Los Tolmos (n=4) (con una distancia genética de 0,4875; p=0,009) (ver matriz de distancias genéticas de la hoja MFST15 del archivo S.1 del material suplementario).

Tras el análisis sincrónico-espacial llevado a cabo se ha considerado la posibilidad de que los ríos no ejerzan una función de barrera, sino una función comunicadora entre regiones alejadas pero surcadas por la misma cuenca de determinados ríos. Por ello se ha realizado un nuevo análisis mediante una agrupación

diferente de los yacimientos estudiados, atendiendo únicamente a aquellos yacimientos que se localizan en la cuenca de determinados ríos, tal y como se expone en la segunda parte del apartado 4.2.3.2.3.2 de material y métodos y localizados tal y como se muestra en la *Figura 37* de ese mismo apartado. En este caso solamente se han considerado los 9 yacimientos (32 individuos) con localización próxima a la cuenca de ríos.

En primer lugar se ha realizado el análisis de varianza molecular, cuyos resultados se muestran en la *Tabla 58.*

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	3	4,993	-0,03415 Va	-2,41
Entre poblaciones	5	8,519	0,14198 Vb	10,00
Entre individuos	23	30,175	1,31196 Vc	92,41

Tabla 58. Amova. Análisis de la varianza molecular entre grupos formados por los distintos yacimientos ubicados en determinadas cuencas hidrográficas.

Al igual que en los casos anteriores, a continuación se realiza un análisis más detallado de la varianza molecular confrontando 2 a 2 cada grupo formado por los yacimientos ubicados en una misma cuenca hidrográfica (*Tabla 59*).

Tanto las mayores diferencias como las mayores similitudes las presenta el Río Tormes, hay que tener encuentra que en este rio solamente encontramos el yacimiento Protocogotas de Tordillos, aunque en él se han analizado restos de 12 individuos. Se observa que la varianza molecular es bastante elevada respecto del río Adaja y del Duero. En el caso del Adaja hay que tener en cuenta que los yacimientos del Tormes y el Adaja son de diferentes periodos temporales (Protocogotas y Campaniforme), lo cual podría influir con toda seguridad. Por la contra, la menor varianza se halla entre el Tormes y el Arlanzón, a pesar de su distancia geográfica, bastante más alejada que el Adaja.

	% de variación	Duero	Adaja	Arlanzón
Duero	Grupos			
	Poblaciones			
	Individuos			
Adaja	Grupos	-9,51		
	Poblaciones	45,93		
	Individuos	63,58		
Arlanzón	Grupos	3,26	-7,92	
	Poblaciones	8,06	-8,78	
	Individuos	88,68	116,70	
Tormes	Grupos	**-26,85**	**-20**	**0,82**
	Poblaciones	55,12	10	-0,60
	Individuos	71,73	110	99,79

Tabla 59. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos (Cada cuenca hidrográfica), entre yacimientos o poblaciones y entre individuos (dentro de cada yacimiento o población).

5.2.1.4 Combinación Del Análisis Diacrónico Y Sincrónico

Con el software *Arlequin* podemos obtener una matriz de distancias FSTs entre los distintos yacimientos estudiados, sin atender a agrupaciones de espacio ni tiempo. Una vez llevado a cabo este análisis es posible representarlo gráficamente en forma de MDS (*Multidimensional scaling*) para poder observar de manera rápida y directa si existen claras diferenciaciones entre los distintos yacimientos estudiados.

Por ello en la *Figura 55* se ha realizado una representación de este tipo, en la que cada uno de los puntos señalados en la gráfica representa uno de los yacimientos estudiados. Para poder identificar el periodo temporal al que pertenecen, así como la localización geográfica, se ha empleado un código de colores y formas que está representado en la leyenda que acompaña a la gráfica. De este modo podemos distinguir con colores las 5 regiones geográficas a las que pertenecen los yacimientos (con los mismos colores empleados anteriormente en el mapa de la *figura 37*, para representar cada región), y con formas los distintos periodos estudiados.

Además, en la *Figura 55* se establece un área de color sobre todos los yacimientos pertenecientes a una misma región geográfica, siendo cada una de las áreas del color correspondiente a dicha región geográfica según lo establecido en la *Figura 37*. De este modo resulta más sencillo visualizar los puntos de interacción entre distintas regiones geográficas, que coincidirán con aquellas regiones del gráfico en

que se superponen dos áreas de color diferentes. Una vez localizadas esas regiones debemos centrar la atención en los símbolos que nos indican si los yacimientos próximos genéticamente son además pertenecientes al mismo periodo crono-cultural o a diferentes periodos. La matriz de distancias genéticas FSTs correspondiente al gráfico MDS de la *Figura 55* se puede consultar en la hoja MFST16 del archivo S.1 del material suplementario.

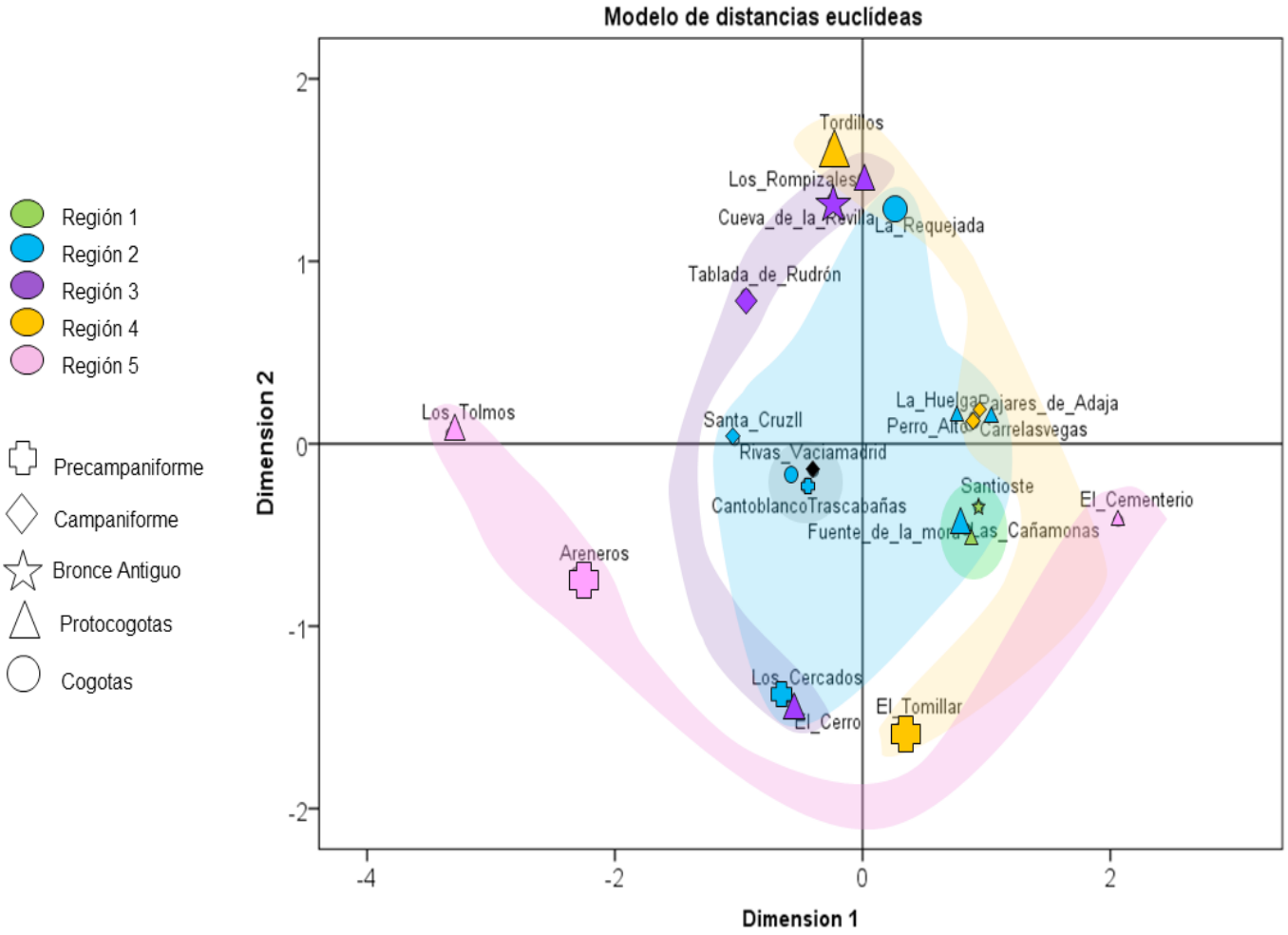


Figura 55. MDS en el que se representan las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los distintos yacimientos estudiados. Se indica mediante colores la región geográfica a la que pertenece cada yacimiento, así como con formas su pertenencia a los diferentes periodos temporales. Además el tamaño de las figuras es relativo al tamaño de cada población siendo la más grandes de entre 8 y 17 individuos, las medianas de entre 3 y 7 individuos, y las pequeñas de 1 o 2 individuo.

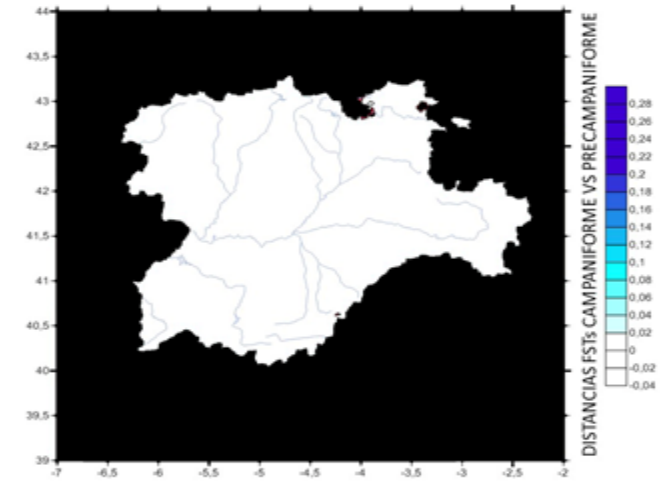
Se ha considerado de utilidad, no únicamente conocer las variaciones en el tiempo y/o en el espacio de manera independiente; sino además poder visualizar como la composición genética de las poblaciones de la Submeseta norte entre el periodo Precampaniforme y el final de la Edad del Bronce, han ido cambiando a lo largo del tiempo, y en qué regiones geográficas ha surgido y ha sido más fuerte ese cambio, si lo hubiera.

Para ello, se ha realizado un estudio de distancias genéticas FSTs entre los distintos periodos estudiados, pero se han considerado dos posibles enfoques:

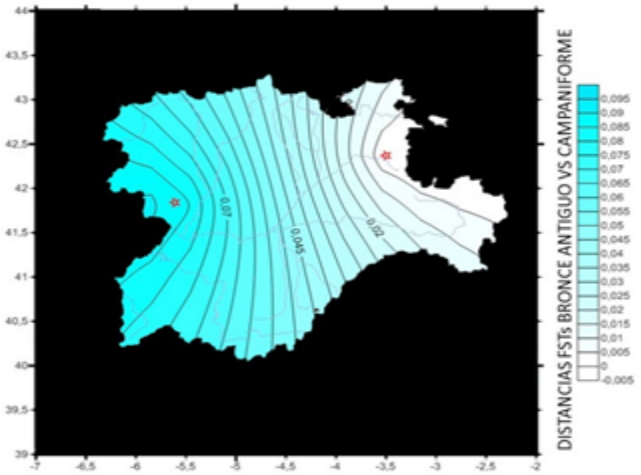
1. Enfoque 1: El primer enfoque aplicado considera que pueden surgir cambios en la composición genética de las poblaciones de manera brusca, debido a fenómenos puntuales o espontáneos. Por ello si analizamos diferencias entre conjuntos de individuos que son inmediatamente consecutivos en el tiempo (por ejemplo: entre los individuos del periodo Precampaniforme y los individuos del periodo Campaniforme), podremos observar si ha tenido lugar o no un cambio brusco-puntual entre esos dos periodos. De este modo, se ha llevado a cabo un estudio de distancias genéticas FSTs, entre los individuos correspondientes a yacimientos de periodos temporales consecutivos 2 a 2. Es decir, se han analizado las distancias genéticas entre: Precampaniformes y Campaniformes; Campaniformes y Bronce Antiguo; Bronce Antiguo y Protocogotas; y entre Protocogotas y Cogotas I; y finalmente entre Cogotas I y Soto Formativo (sin embargo esta última comparación no se ha podido representar por el pequeño tamaño muestral del grupo Soto Formativo, constituido por un individuo). Una vez obtenida la matriz de distancias genéticas FSTs de Slatkin, se ha procedido a la elaboración de mapas mediante el software *Surfer v. 11 (*apartado 4.2.3.2.8 de material y métodos) para localizar los puntos geográficos concretos (mediante las coordenadas de los yacimientos implicados) dónde se observa una determinada distancia genética respecto del periodo inmediatamente anterior en el tiempo. En la *figura 56* podemos observar los mapas resultantes de este análisis.

2. Enfoque 2: Segundo planteamiento propone que los cambios en la composición genética de las poblaciones estudiadas que hayan podido tener lugar, pueden no haber ocurrido de manera puntual o brusca, sino de manera gradual. Por ejemplo con una escasa pero continua llegada de genes desde otro lugar, o una pérdida de los mismos. Para poder detectar un cambio de este tipo, hemos planteado que las diferencias entre conjuntos de individuos inmediatamente consecutivos en el tiempo no tienen por qué ser especialmente grandes; pero sin embargo las diferencias a largo plazo si podrían serlo. Para analizar la posible existencia de cambios espacio-temporales de la composición genética de la población desde este segundo enfoque, se ha llevado a cabo un análisis de distancias genéticas FSTs con una agrupación diferente a la del primer enfoque. En este caso se han llevado a cabo comparación entre cada uno de los grupos temporales (Precampaniforme, Campaniforme, etc.) respecto del conjunto de todos los anteriores. Es decir, se ha comparado el conjunto de los yacimientos del Bronce antiguo con la suma de los del Precampaniforme y el Campaniforme; los Protocogotas, respecto de los del Bronce Antiguo, Precampaniforme y Campaniforme; y así sucesivamente.

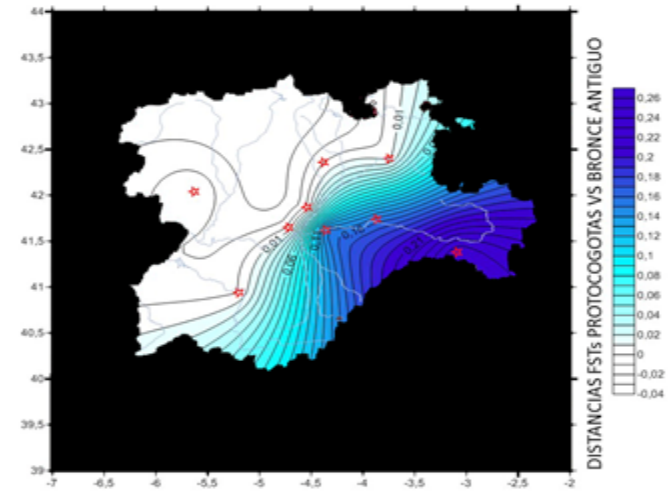
   De nuevo, la matriz de distancias de Slatkin ha sido empleada para crear un conjunto de mapas en los que podemos observar la representación de las distancias genéticas en el área geográfica analizada, tal como se puede observar en la *Figura 57*.



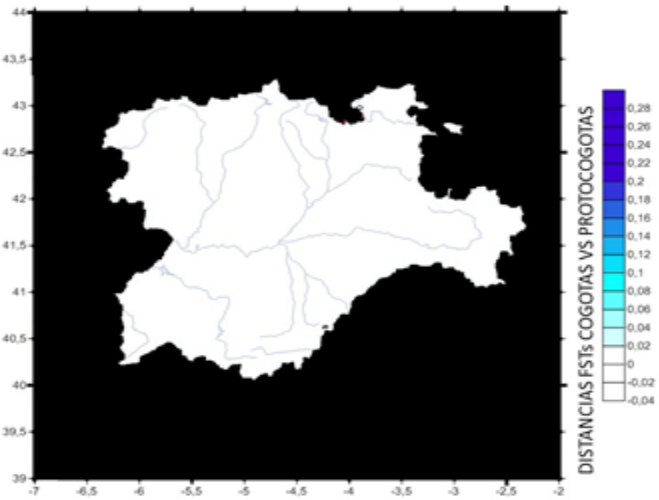
a. Distancias FSTs Campaniforme vs. Precampaniforme



b. Distancias FSTs Bronce Antiguo vs. Campaniforme

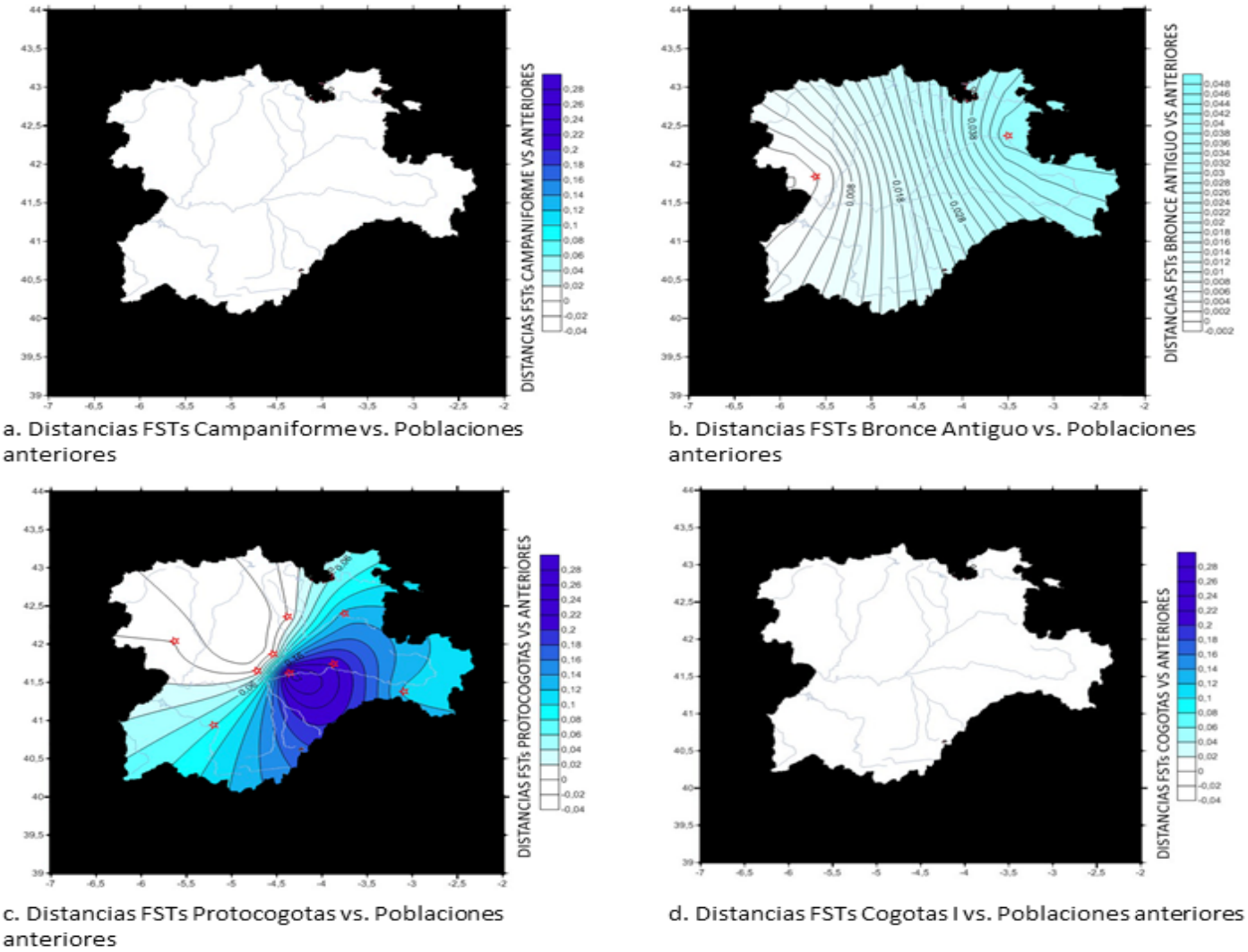


c. Distancias FSTs Protocogotas vs. Bronce Antiguo



d. Distancias FSTs Cogotas I vs. Protocogotas

Figuras 56. Cada uno de estos mapas , representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del inmediatamente anterior de manera puntual. Aplicando el enfoque 1. En las leyendas de cada uno de los mapas se observa a qué transición termporal corresponde y en el lateral de cada mapa podemos observar la gradación que va desde el blanco (correspondiente una distancia FST baja) al azul intenso (correspondiente a la distancia FST más elevada). Los números que aparecen en los ejes X e Y de cada mapa se corresponden con las coordenadas geográficas. En estas comparaciones no se ha incluido el grupo Soto Formativo por ser poco significativo al estar constituido por un único individuo.



a. Distancias FSTs Campaniforme vs. Poblaciones anteriores

b. Distancias FSTs Bronce Antiguo vs. Poblaciones anteriores

c. Distancias FSTs Protocogotas vs. Poblaciones anteriores

d. Distancias FSTs Cogotas I vs. Poblaciones anteriores

Figuras 57. Cada uno de estos mapas representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del conjunto de todos los anteriores en el tiempo. Aplicando el enfoque 2. En las leyendas bajo cada uno de los mapas se observa el periodo cronológico al que hace referencia cada mapa, y a la derecha de cada mapa se observa la gradación que va desde el blanco (correspondiente una distancia FST baja) al azul intenso (correspondiente a la distancia FST más elevada). En este análisis no se ha considerado grupo Soto Formativo por estar constituido por un único individuo y no ser representativo.

5.2.1.5 Análisis De Los Haplogrupos

Hasta ahora todos los análisis realizados se han basado exclusivamente en los haplotipos mitocondriales establecidos. No obstante, empleando los haplotipos de ADN mitocondrial obtenidos y validados, es

posible determinar los haplogrupos a los que pertenecen. Por ello, mediante la herramienta *Haplogrep (http://haplogrep.uibk.ac.at)*, se ha realizado una búsqueda en el *Phylotree* (*Phylotree build 16*) del haplogrupo al que pertenecen cada uno de los individuos estudiados con una validez determinada. En la *Tabla 60* se muestran los haplogrupos correspondientes a cada individuo.

Una vez conocidos los haplogrupos que conforman cada una de las poblaciones estudiadas, se ha querido analizar la composición de haplogrupos en el tiempo y en el espacio, y para ello se ha empleado de nuevo el software *Surfer V. 11*. De este modo se puede visualizar la distribución de cada uno de los haplogrupos obtenidos a lo largo del tiempo y en el espacio. En las *figuras 58, 59, 60, 61, 62 y 63* es posible visualizarlo.

PERIODO	YACIMIENTO	INDIVIDUO	HAPLOTIPO	HAPLOGRUPO
PCAMP	Los Cercados	1CER	16126C 16193T 16278T 73G 150T 263G 295T 315.1C	H
PCAMP	Los Cercados	2CER	16224C 16311C 16319A 73G 152C 263G 315.1C	K
PCAMP	Los Cercados	4CER	16224C 16311C 16319A	K1a1
PCAMP	Trascabañas	1TC	73G 150T 263G 315.1C 338T	U5b2a1a2
PCAMP	El Tomillar	4BTOM	16311C	I1d
PCAMP	El Tomillar	5BTOM	16126C 73G	J
PCAMP	El Tomillar	6BTOM	16126C 16299G 150T 239C 263G 291.1A	H7d2
PCAMP	El Tomillar	7BTOM	16183C 16189C 16234A 16299G 263G 291.1A	H7d2
PCAMP	El Tomillar	9BTOM	16183C 16189C 16234A 16299G 263G 291.1A	H7d2
PCAMP	Los Areneros	1ARE	16224C 16311C 73G 263G	K
PCAMP	Los Areneros	2ARE	16224C 16311C 16319A 73G 152C 263G 277T 315.1C	K1a4c
PCAMP	Los Areneros	5ARE	16224C 16311C 16319A 73G 152C 263G 309.1C 315.1C	K1a4c
PCAMP	Los Areneros	6ARE	16224C 16311C 73G 150T 239C 263G 309.1C 315.1C	K1a
PCAMP	Los Areneros	7ARE	16126C 150T 239C 263G 309.1C	H14b1
PCAMP	Los Areneros	8ARE	263G 315.1C	H2a2a
PCAMP	Los Areneros	20ARE	16224C 16311C 73G 263G 309.1C 315.1C	K
PCAMP	Los Areneros	24ARE	16126C 309.1C 315.1C	H14b1
CAMP	El Mirador	1MIR	16298C 72C 309.1 315.1C	HV0
CAMP	Cabezón	1CAB	16224C 16311C 73G 309.1C 315.1C	K
CAMP	Cabezón	2CAB	73G	H1e2c
CAMP	Pajares de Adaja	1PAD	16189C 263 315.1C	H1
CAMP	Rivas Vaciamadrid	1RV	263G 315.1C	H2a2a
CAMP	Tablada de Rudrón	2TR	16145A 16224C 16311C 150T 263G 291.1A	H7d2
CAMP	Tablada de Rudrón	1TR	16362C 239C 263G 291.1A	H7d2
CAMP	Tablada de Rudrón	3TR	263G 291.1A	H7d2
BA	Santioste	1ST	16234T 263G 315.1C	H13a1d
BA	Cueva de la Revilla	1REV	16270T 16304C 73G 150T 228A 263G 291.1A	U5b3
BA	Cueva de la Revilla	2REV	64T 263G 291.1A	H7d2
BA	Cueva de la Revilla	3REV	16172C 16183C 16189C 16219G 16278T	U6a1a
BA	Cueva de la Revilla	4REV	16298C 72C 263G 291.1A	HV0
BA	Cueva de la Revilla	5REV	16224C 16311C 66A 73G 263G 291.1A 315.1C	K
BA	Cueva de la Revilla	6REV	263G 291.1A	H7d2

BA	Cueva de la Revilla	7REV	16129A 16223T 73G 152C 199C 204C 207A 250C 263G 315.1C	I1d
BA	Cueva de la Revilla	8REV	16192T 16270T 73G 150T 263G 291.1A	U5b
PCOG	Fuente de La Mora	1FM	16126C 73G	T
PCOG	El Cementerio	1QUO	16189C 16270T 16311C 73G 150T 263G	U5b2a5
PCOG	El Cerro	1ELC	16298C 64T 72C	HV0
PCOG	El Cerro	2ELC	16298C 64T 72C	HV0
PCOG	El Cerro	3ELC	16298C 64T 72C	HV0
PCOG	Los Tolmos	LTB3	16224C 16311C 16362C 73G	K1a5a
PCOG	Los Tolmos	LTB2	16224C 16311C	K
PCOG	Los Tolmos	LTB1	16224C 16311C 16362C 73G	K1a5a
PCOG	Los Tolmos	LTA4	263G 315.1C	H2a2a
PCOG	Tordillos	1TOR	16189C 16192T 16270T 16362C 73G 263G 315.1C	U5
PCOG	Tordillos	2TOR	16362C 73G 150T 263G 291.1A	U5b2a1a2
PCOG	Tordillos	5TOR	16270T 73G 150T 263G 291.1A	U5b1d1a
PCOG	Tordillos	6TOR	263G 315.1C	H2a2a
PCOG	Tordillos	7TOR	16362C 73G 150T 263G 291.1A	U5b2a1a2
PCOG	Tordillos	8TOR	263G 315.1C	H2a2a
PCOG	Tordillos	9TOR	16343G 73G 150T 263G 291.1A	U3
PCOG	Tordillos	10TOR	16298C 72C	HV0
PCOG	Los Rompizales	1RPZ	16192T 16270T 16304C 73G	U5b3
PCOG	Los Rompizales	2RPZ	152C 263G 315.1C	H1c
PCOG	Los Rompizales	3RPZ	16192T 16270T	U5
PCOG	Los Rompizales	4RPZ	16126C 16292T 16294T 73G 146C 152C 263G 279C 309.1C 315.1C	T2c1d+152
PCOG	Los Rompizales	5RPZ	16126C 16286T 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C	J1c
PCOG	La Huelga	1HU	16189C 263G 315.1C	H1
PCOG	Carrelasvegas	1CRV	16298C 72C	HV0
PCOG	Las Cañamonas	1CÑ	16126C 73G	T
COG	Canto Blanco	1CB	263G 309.1C 315.1C	H2a2a
COG	La Requejada	2LR	16293T 16298C	HV0
COG	La Requejada	3LR	73G	H1e2c
SF	San Pelayo	1SP	16298C 72C	HV0

Tabla 60. Relación de haplotipos y haplogrupos determinados.

En la figura 58 se puede observar que el haplogrupo K alcanza su máximo durante el periodo preCampaniforme en la región este de la Submeseta norte, concretamente en el yacimiento de los Areneros, teniendo menos prevalencia hacia el oeste. Su frecuencia se ve reducida durante el Campaniforme y el Bronce antiguo para reaparecer de nuevo hacia el este en el yacimiento de los Tolmos durante el periodo Protocogotas I, aunque de modo menos intenso. Durante el periodo correspondiente a la cultura Cogotas I el haplogrupo K desaparece por completo, aunque esta observación debe matizarse por el efectivo mucho menos numeroso conjunto de Cogotas I.

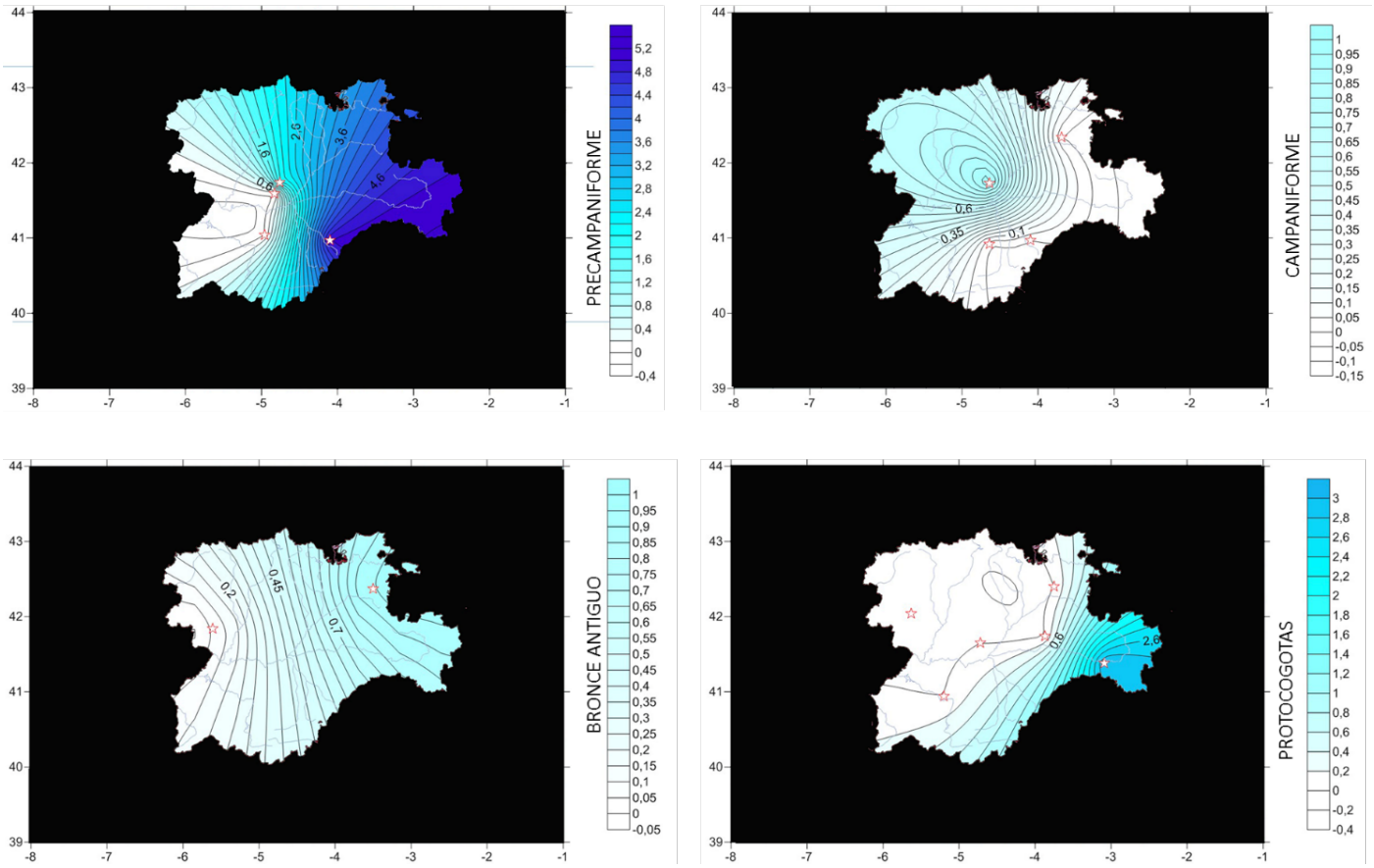


***Figura 58**. Distribución espacio – temporal del haplogrupo K. Se representa la frecuencia del haplogrupo K en el espacio y a lo largo de los distintos periodos temporales. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población.*

El haplogrupo H está presente a lo largo de todos los periodos analizados con mayor o menor incidencia. Su frecuencia es máxima en ciertos puntos del sur durante el Precampaniforme y más al noreste durante el Campaniforme. Posteriormente su distribución se vuelve más uniforme y su frecuencia se ve levemente reducida tras el Campaniforme y aún más durante el periodo correspondiente a la cultura Cogotas I (Ver *Figura 59*).

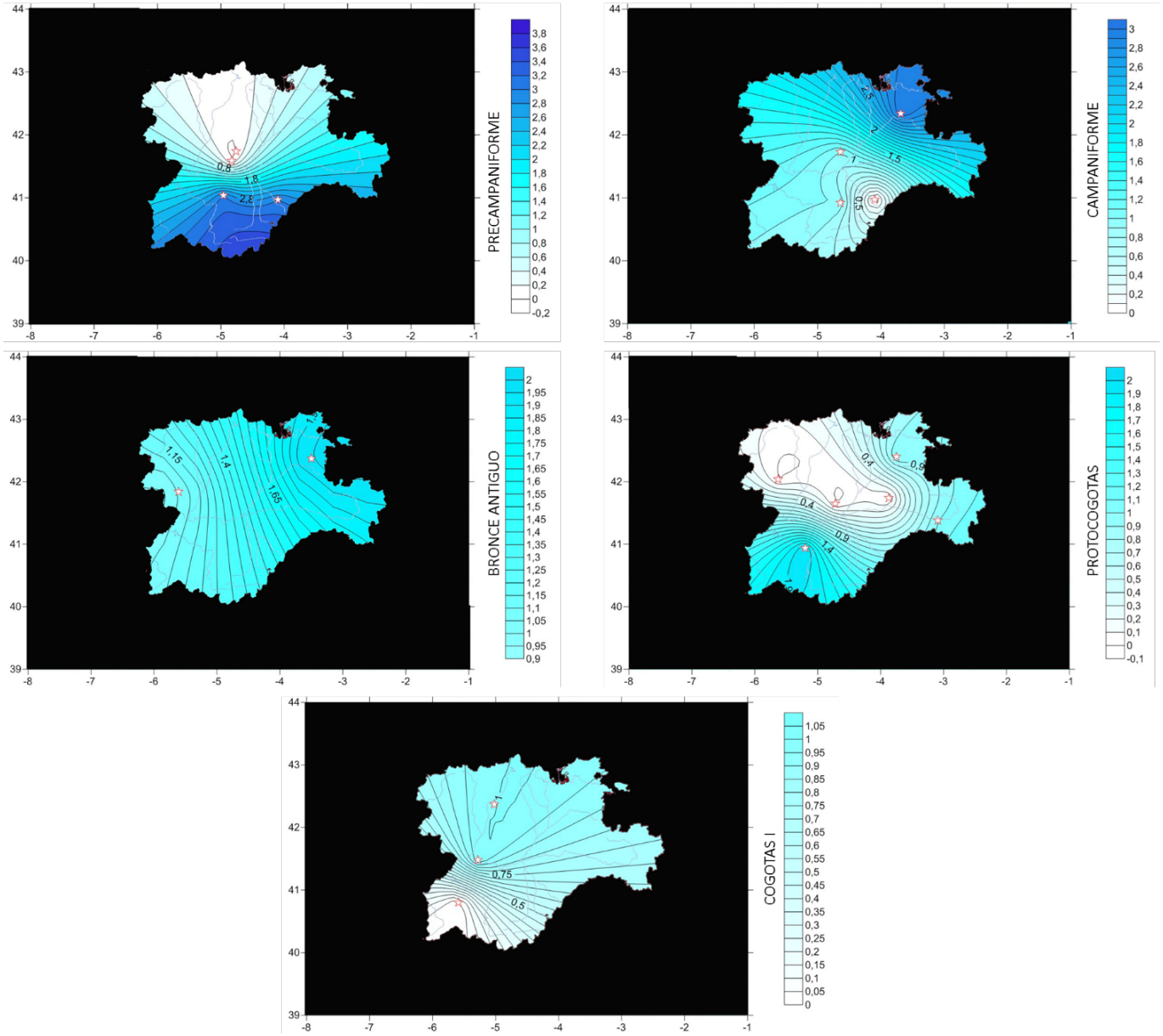


Figura 59. Distribución espacio – temporal del haplogrupo H. . Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población.

El haplogrupo HV0 presenta frecuencias moderadas a bajas durante todo el tiempo a excepción del periodo Precampaniforme durante el cual está ausente, manteniéndose constante durante el resto de periodos, sin picos notables. Si observamos la *Figura 60*, este haplogrupo está completamente ausente durante el preCampaniforme, apareciendo un primer foco débil durante el Campaniforme hacia el sur, aunque con una frecuencia bastante baja (en el yacimiento de El Mirador, con un único individuo). La frecuencia de este haplogrupo se va incrementando, alcanzando su máximo durante el periodo Protocogotas I, estando

presenteen el yacimiento de El Cerro (Burgos) (n=3) y en menor grado también en un individuo de Tordillos (Salamanca). Durante la cultura Cogotas I las frecuencias de HV0 disminuyen pero se mantiene durante el Soto Formativo en el Cerro de San Pelayo (Salamanca). En cualquier caso el número de muestras es muy reducido, y la discusión sobre esta continuidad genética debería completarse más aún para analizar en profundidad la continuidad o discontinuidad entre el final de Cogotas I y la aparición del Soto Formativo.

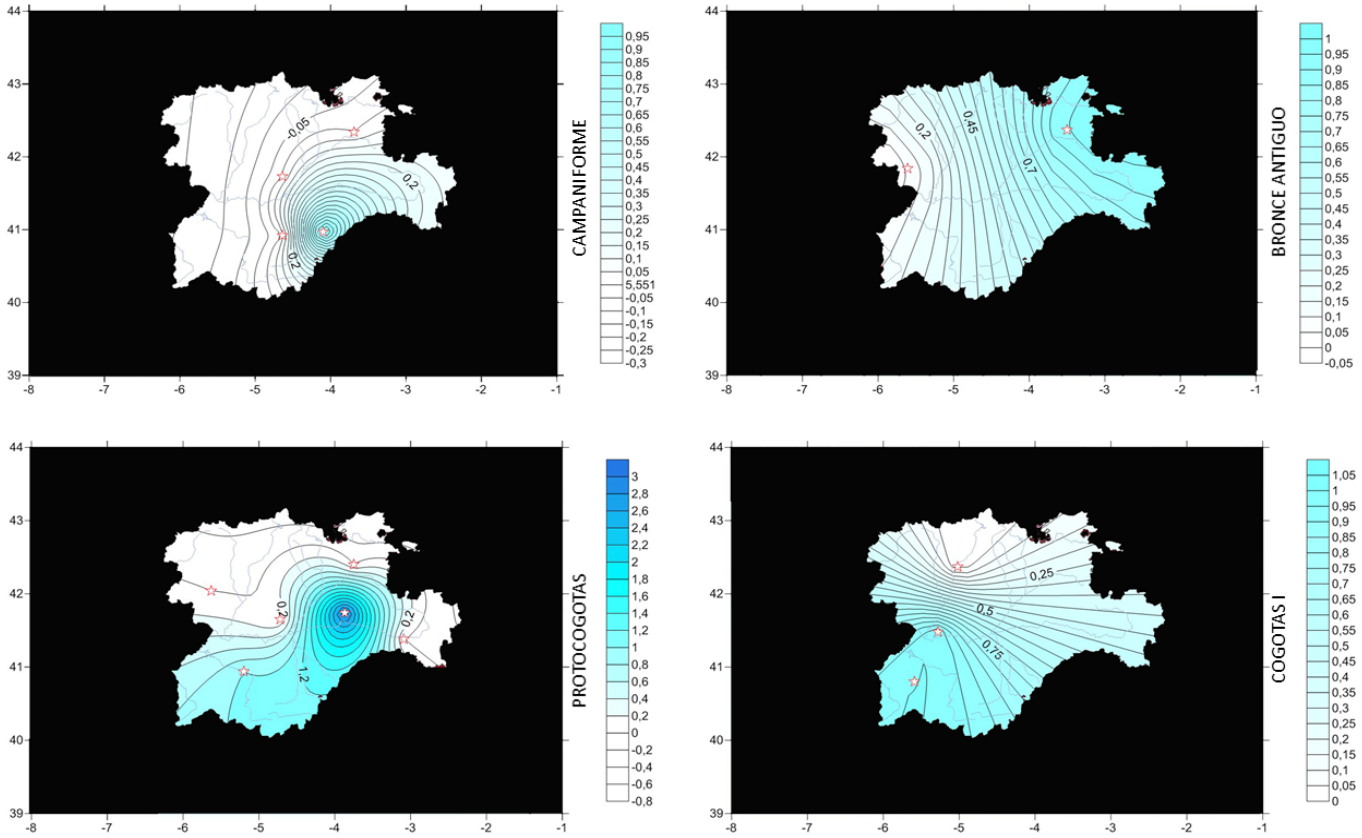


Figura 60. Distribución espacio – temporal del haplogrupo HV0. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población.

El haplogrupo J (*Figura 61*) en general muestra frecuencias bajas, y sólo se percibe levemente en los conjuntos de los que disponemos de mayores tamaños muestrales. Durante el preCampaniforme aparece de manera uniforme en toda la Submeseta norte pero con frecuencias iguales o inferiores a 1 y en menor medida durante el periodo Protocogotas I, en una región muy reducida al noreste con frecuencias inferiores a 1 (Ver *Figura 61*).

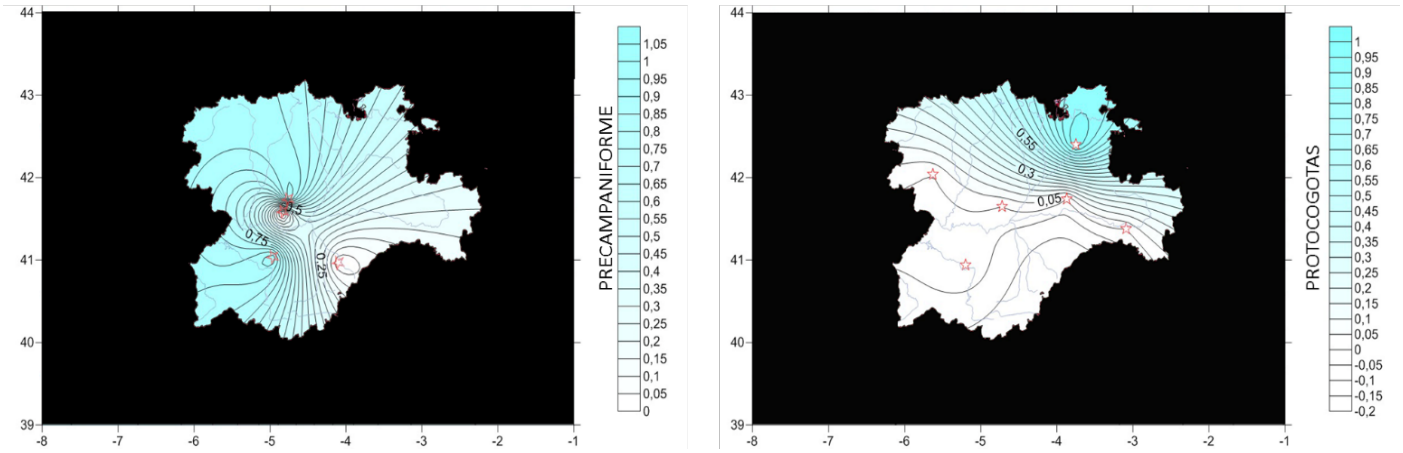


Figura 61. Distribución espacio – temporal del haplogrupo J. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población.

Otro haplogrupo con escasa presencia en la mayoría de los periodos es el haplogrupo U, que únicamente aparece durante el Bronce Antiguo en la región noreste y el periodo Protocogotas I con dos núcleos, uno en el noreste y otro muy intenso en el suroeste. Llama la atención la intensidad que el haplogrupo U muestra durante estos dos periodos, estando completamente ausente con anterioridad y también tras los Protocogotas I (aunque en este contexto hay que tener en cuenta que el tamaño poblacional del grupo Cogotas I es reducido) (*Figura 62*).

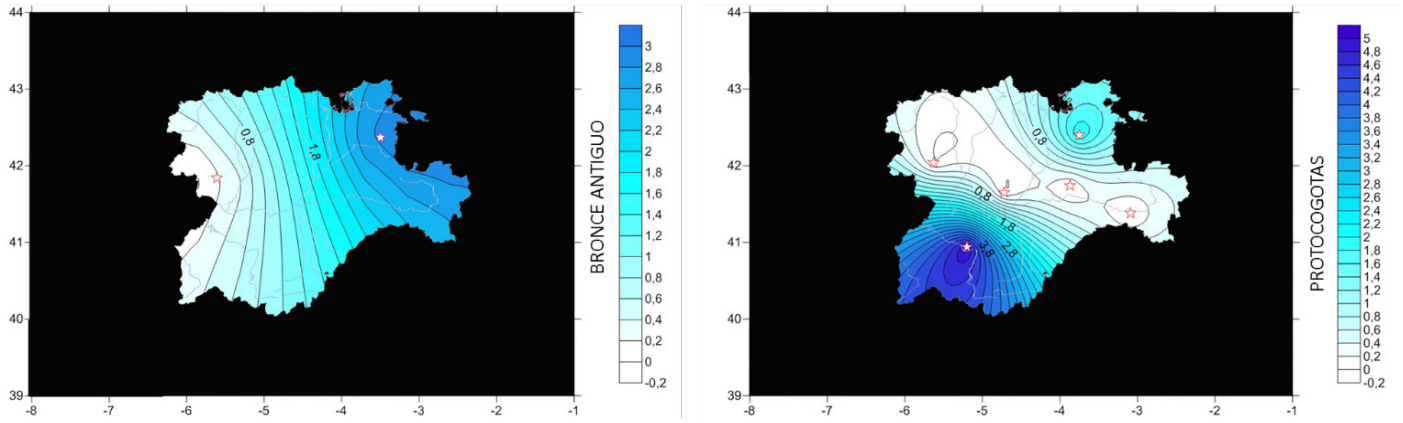


Figura 62. Distribución espacio – temporal del haplogrupo U. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población.

Finalmente, los haplogrupos I y T aparecen de forma muy minoritaria, el primero de ellos durante el Bronce Antiguo y el segundo durante el periodo Protocogotas I, pero sus frecuencias de aparición son muy reducidas, iguales o inferiores a 1, y no parecen aportar información relevante (*Figura 63*).

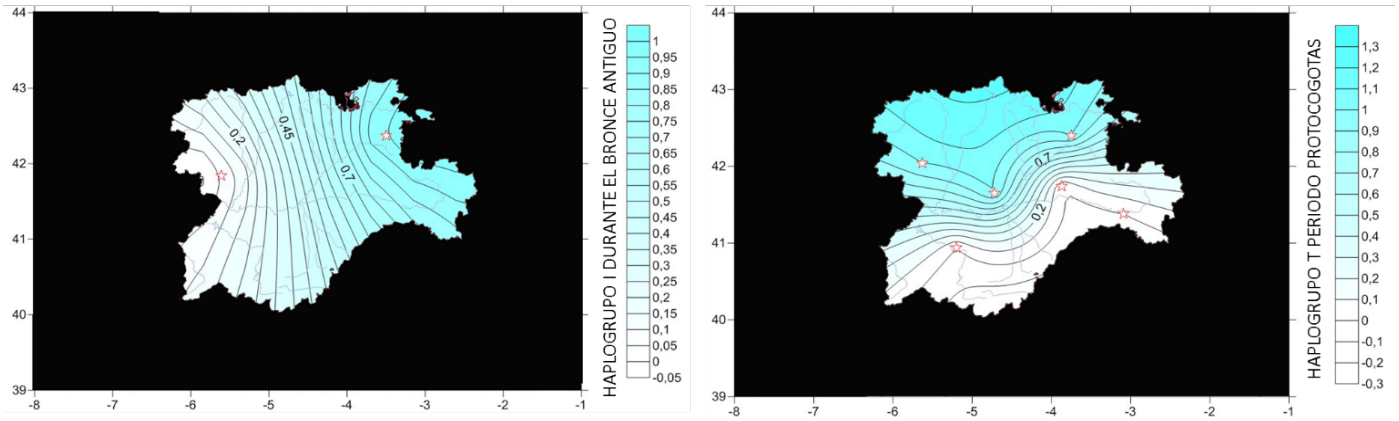


Figura 63. Distribución espacio – temporal de los haplogrupos I y T. Cuando la frecuencia es baja presenta un color blanco que se va tornando de un azul cada vez más intenso conforme se incrementa la frecuencia de dicho haplogrupo en la población.

Por último, los haplogrupos minoritarios son el I y el T, apareciendo el primero únicamente durante el Bronce Antiguo y el segundo durante el periodo Protocogotas.

Para tener una visión más clara de los haplogrupos más representativos asociados a cada uno de los periodos estudiados, se ha realizado un análisis de correspondencias mediante el software *SPSS Statistics 20*. La representación de dicho análisis se observa en la siguiente figura (*Figura 64*).

En la *figura 64* se puede observar una asociación clara entre el Periodo Precampaniforme y el haplogrupo K, tal como ya venía apuntando lo observado en los mapas de la *figura 57*. Del mismo modo el haplogrupo H se asocia con el periodo Campaniforme y la cultura Cogotas I de manera más intensa que con el resto de periodos y los haplogrupos U y HV0 con los Protocogotas. El haplogrupo J parece estar a medio camino entre el Precampaniforme y el Bronce antiguo y el I algo más próximo al Bronce antiguo aunque tampoco de una forma muy íntima (*Figura 64*).

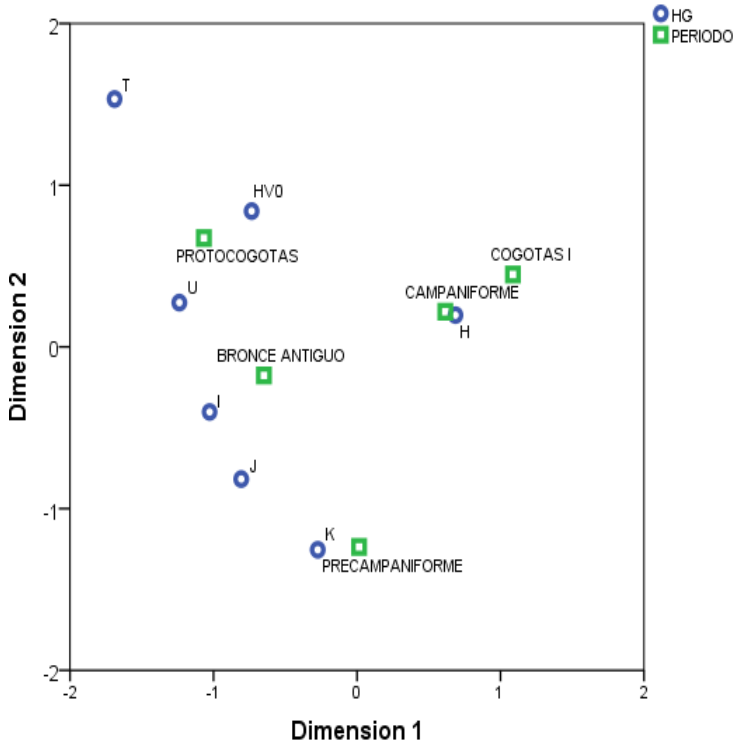


Figura 64. Análisis de correspondencias. Haplogrupos – Periodos temporales.

Del mismo modo que con los haplogrupos, se ha querido conocer si existe una asociación más o menos clara entre haplotipos concretos y determinados periodos temporales. Para ello hemos asignado un nombre a cada uno de los haplotipos, y se ha realizado un análisis de correspondencias del mismo modo que en el caso anterior. Podemos observar el análisis en la *Figura 65*. En la *tabla 60* se encuentran los haplotipos con los correspondientes nombres asignados para el análisis de correspondencias.

En la *figura 65* observamos un núcleo compuesto por el conjunto preCampaniforme, marcado en amarillo, y asociado principalmente a los siguientes haplotipos: ht7 (16126C, 73G), ht34 (16126, 16299G, 150T, 239C, 263G, 291.1a), ht90 (16183C, 16189C, 16234A, 16299G, 263G, 291.1A), ht134 (16224C, 16311C, 16319A, 73G, 263G, 315.1C) y en menor medida con el ht133 (16224C, 16311C 73G, 263G, 309.1C, 315.1C). Tal como se observa, haplotipos propios de los haplogrupos J, K y H.

Los núcleos coloreados en verde y violeta corresponden al Campaniforme y Protocogotas I respectivamente, y además se encuentran muy próximos entre sí, asociándose a haplotipos cercanos a ambos. El periodo Protocogotas I se asocia más íntimamente con los haplotipos ht28, ht29, ht96 y ht158 (J, T, U y HV0 respectivamente) y el Campaniforme a los haplotipos ht172 y ht174 (U y H), pero especialmente a los del haplogrupo U.

Por encima del núcleo verde del Campaniforme, se observa un núcleo rosa reducido al conjunto Cogotas I, que está asociado al haplotipo ht156, correspondiente al haplogrupo HV0; y en cierto grado también al 56 (haplogrupo H) (*Figura 65*).

Finalmente en la zona inferior izquierda de la gráfica de la Figura 65, se observa el núcleo rojizo formado por el Bronce Antiguo, asociado a los haplotipos: ht111 (16192T, 16270T, 73G, 150T, 263G, 291.1A) correspondiente al haplogrupo U; y también, aunque en menor medida, asociado a los haplotipos ht45, ht70, ht136 y ht150 (I, U y H)

NOMBRE	HAPLOTIPO	HAPLOGRUPO
Ht7	16126C 73G	J/T
Ht22	16126C 16193T 16278T 73G 150T 263G 295T 315.1C	J/T
Ht28	16126C 16286T 73G 185A 228A 263G 295T 315.1C	J
Ht29	16126C 16292T 16294T 73G 146C 152C 263G 279C 309.1C 315.1C	T
Ht34	16126C 16299G 150T 239C 263G 291.1A	H
Ht45	16129A 16223T 73G 152C 199C 204C 207A 250C 263G 315.1C	I
Ht56	16145A 16224C 16311C 150T 263G 291.1A	H
Ht70	16172C 16183C 16189C 16219G 16278T	U
Ht90	16183C 16189C 16234A 16299G 263G 291.1A	H
Ht96	16189C 16192T 16270T 16362C 73G 263G 315.1C	U
Ht103	16189C 16270T 16311C 73G 150T 263G	U
Ht111	16192T16270T 73G 150T 263G 291.1A	U
Ht133	16224C 16311C 73G 263G 309.1C 315.1C	K
Ht134	16224C 16311C 16319A 73G 263G 315.1C	K
Ht136	16234T 263G 315.1C	H
Ht150	16270T 16304C 73G 150T 228A 263G 291.1A	U
Ht156	16293T 16298C	HV0
Ht158	16298C 72C	HV0
Ht172	16362C 73G 150T 263G 291.1A	U
Ht174	263G 315.1C	H

Tabla 60. Haplotipos correspondientes a cada uno de los nombres asignados en el análisis de correspondencias. Así como los haplogrupos con a los que pertenece cada uno de los haplotipos.

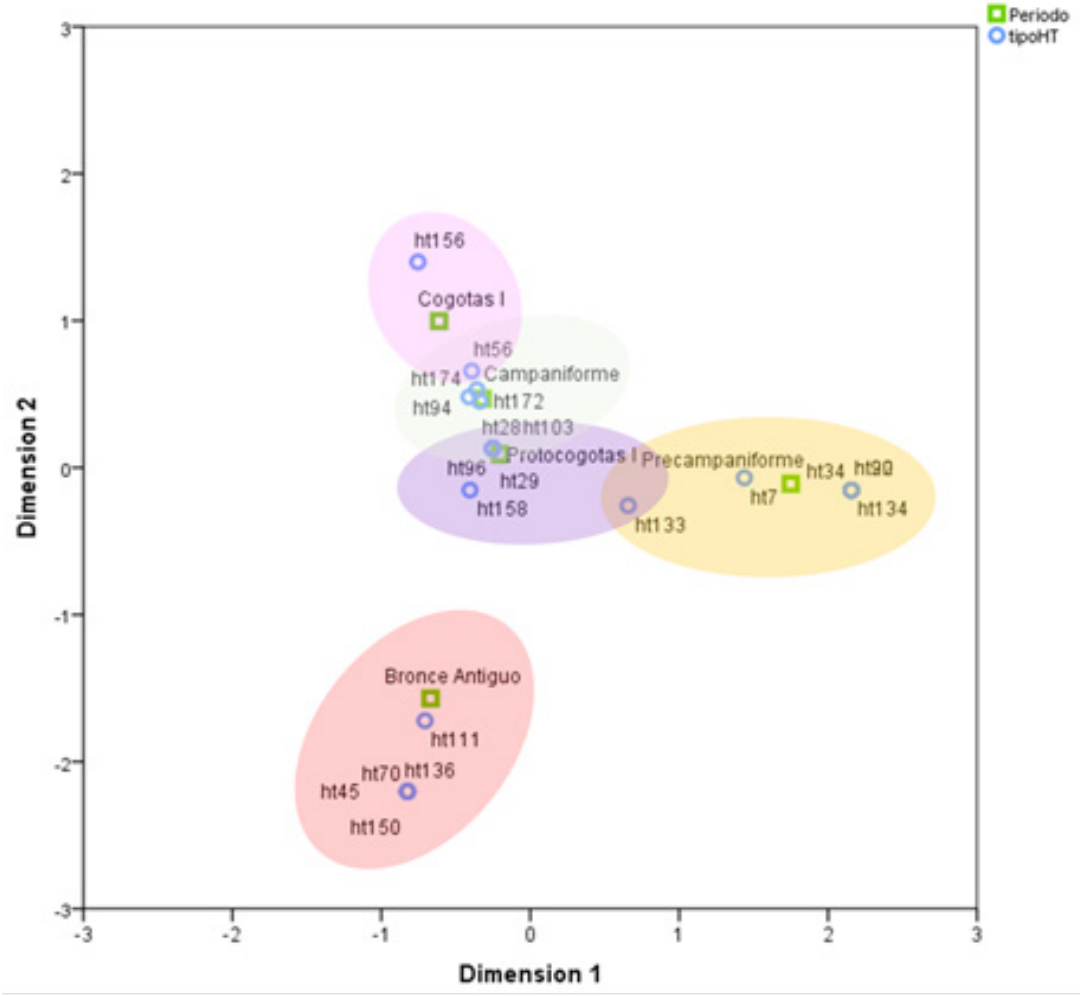


Figura 65. Análisis de correspondencias: Haplotipos – Periodos temporales. Con cuadrados verdes están representados los periodos cronológicos, y con círculos azules los haplotipos.

Con los datos proporcionados por la aplicación *Haplogrep (*http://haplogrep.uibk.ac.at) disponible en la red, y mediante el software *Network 4.6* se han creado árboles para cada uno de los haplogrupos más representativos, para poder valorar su evolución (*Figuras 66, 67, 68 y 69*) .

- Network haplogrupo H

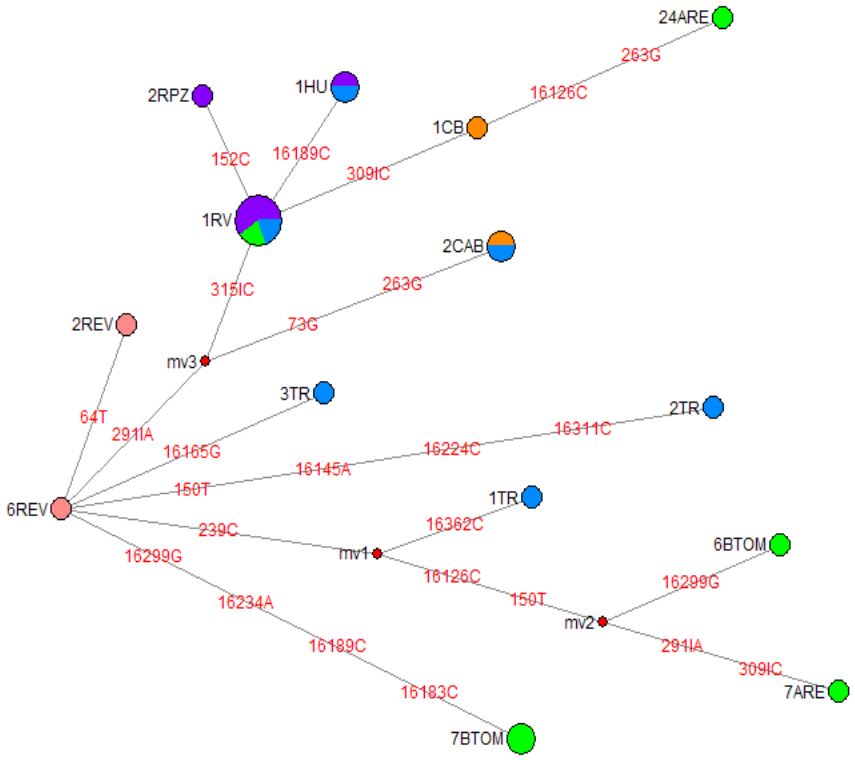


Figura 66. Network. Haplogrupo H. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en azul los del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas y en naranja los correspondientes a la cultura Cogotas I.

- Network haplogrupo HV0

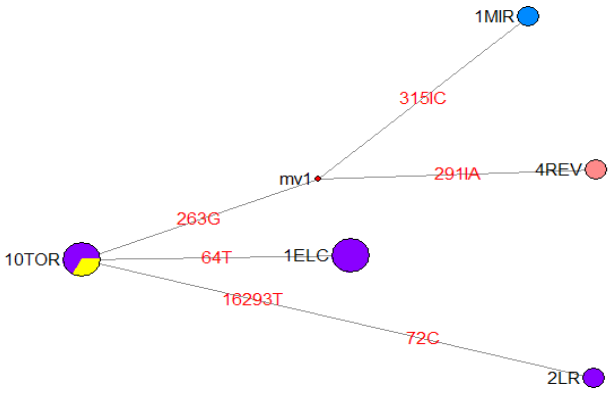


Figura 67. Network. Haplogrupo HV0. Se indican en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas y en amarillo el individuo correspondiente al Soto Formativo.

- Network haplogrupo K

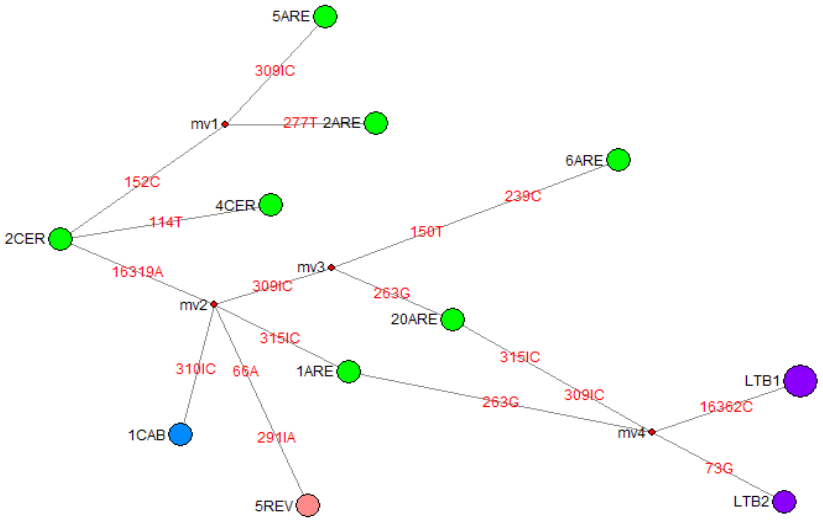


Figura 68. Network. Haplogrupo K. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en azul los del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce y en violeta los Protocogotas.

- Network haplogrupo U

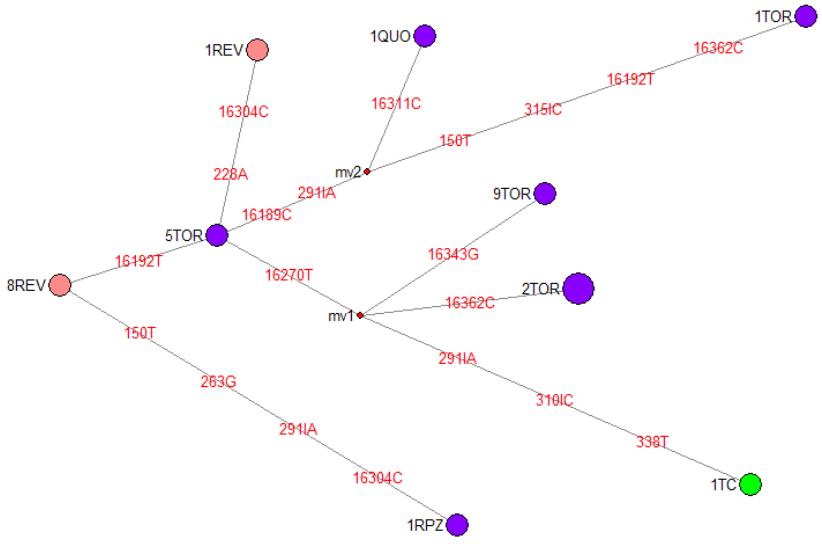


Figura 69. Network. Haplogrupo U. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce y en violeta los Protocogotas.

5.2.2 Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones De La Península Ibérica

Para llevar a cabo comparaciones de nuestra población de estudio con poblaciones anteriores y posteriores en el tiempo se ha creado una base de datos, tal y como se indica en el apartado 4.2.3.2.4.1 del material y métodos. A partir de esa base de datos formada por los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis, más los datos aportados por otros autores, se han llevado a cabo análisis diacrónicos y sincrónicos cuyos resultados serán expuestos en los siguientes puntos.

5.2.2.1 Análisis Diacrónico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones De La Península Ibérica

Siguiendo las pautas establecidas en el punto 4.2.3.2.4.2 de material y métodos, se ha llevado a cabo el estudio de las variaciones en la composición genética de las poblaciones a lo largo de los diferentes periodos cronológicos propuestos (desde el Paleolítico, hasta la población actual). La finalidad principal de este análisis es conocer las similitudes o diferencias de nuestra población de interés respecto de sus antepasados y respecto de las poblaciones humanas que habitaron la península posteriormente. Los diferentes grupos poblacionales establecidos pueden consultarse en el punto 4.2.3.2.4.2 de material y métodos. Los resultados obtenidos tras el primer análisis general, se recogen en la *tabla 61*.

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	8	16,336	0,03224 Va	1,97559
Entre poblaciones	24	36,951	-0,00756 Vb	-0,46346
Entre individuos	276	443,557	1,670709 Vc	98,48787

Tabla 61. Amova. Análisis de la varianza molecular entre grupos formados por los distintos periodos temporales analizados.

En la *Tabla 62* se muestran los resultados del análisis de la varianza molecular enfrentando grupos dos a dos.

Podemos observar que el Precampaniforme muestra varianzas moleculares relativamente elevadas (por encima de 10) respecto de sus predecesores del Paleolítico (11,28) y el Neolítico (11,36), lo que apuntaría a un cambio poblacional en cierto grado a partir de ese momento; respecto de los periodos posteriores los Precampaniformes no muestran varianzas moleculares tan elevadas. Por otro lado también se aprecia una elevada varianza molecular entre el periodo Campaniforme y las poblaciones inmediatamente posteriores del Bronce Antiguo (15,50). Sin embargo a pesar de que la varianza sea mayor entre Precampaniforme y Neolítico final, durante el periodo Campaniforme las poblaciones vuelven a asimilarse a las del Neolítico Final, observándose una varianza molecular muy baja entre estas dos poblaciones (Amova 0,06). Por otro

lado las poblaciones actuales del siglo XXI son las que presentan valores de la varianza molecular más bajos, pero esto probablemente venga dado a causa de tener un tamaño muestral bastante mayor que el resto de conjuntos. En cuanto a los pobladores el periodo Cogotas I parecen asemejarse a los pobladores del Campaniforme, con los que comparten una varianza molecular muy baja (0,77).

	% de variación	PAL/MES	NF	PCAMP	CAMP	BA	PCOG	COG
PAL/MESO	Grupos							
	Poblaciones							
	Individuos							
NF	Grupos	10,28						
	Poblaciones	3,58						
	Individuos	86,14						
PCAMP	Grupos	11,28	11,36					
	Poblaciones	10,81	12,57					
	Individuos	77,90	76,08					
CAMP	Grupos	8,63	0,06	3,94				
	Poblaciones	-26,49	-2,29	5,41				
	Individuos	117,86	102,23	90,66				
BA	Grupos	11,39	2,25	5,21	15,50			
	Poblaciones	-51,27	-3,81	8,78	-48,43			
	Individuos	139,87	101,56	86,01	132,93			
PCOG	Grupos	-7,78	0,15	7,79	-4,45	-6,03		
	Poblaciones	21,45	14,65	19,27	12,79	12,65		
	Individuos	86,33	85,20	72,94	91,66	93,38		
COG	Grupos	7,84	2,65	3,28	0,77	19,44	-11,80	
	Poblaciones	-9,80	-2,17	14,77	-43,44	-58,68	21,23	
	Individuos	101,96	99,52	81,94	142,67	139,24	90,57	
XXI	Grupos	-3,31	0,88	8,58	-1,60	-2,64	0,23	-8,95
	Poblaciones	-0,52	-0,39	1,46	-1,68	-0,55	1,18	-0,25
	Individuos	103,83	99,51	89,95	103,28	103,19	98,59	109,19

Tabla 62. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos 2 a 2. En la intersección entre cada dos grupos pueden observarse las varianzas entre dichos grupos, dentro de cada grupo y entre individuos. Los grupos se denominan de manera abreviada con los siguientes códigos: PAL/MES: Paleolítico / Mesolítico; NF: Neolítico Final; PCAMP: Precampaniforme; CAMP: Campaniforme; BA: Bronce Antiguo; PCOG: Protocogotas; COG: Cogotas; SF: Soto Formativo y XXI: Siglo XXI. Se marcan en blanco aquellas varianzas superiores a 10 o inferiores a 1.

Para poder valorar las diferencias entre grupos temporales, se ha realizado una matriz de distancias FSTs de Slatkin, y se ha representado mediante MDS empleando el software SPSS (*Figura 57*).

En la gráfica MDS de la *Figura 70* se pueden observar a grandes rasgos las distancias genéticas entre periodos crono-culturales, observándose que los más alejados del núcleo central son los pobladores del Paleolítico, del Neolítico y del periodo Precampaniforme, que además están también alejados entre sí.

No obstante este dato en bruto es poco informativo. Otras aportaciones interesantes son la observación de una distancia genética muy próxima entre los individuos que forman parte del periodo Campaniforme y los de la cultura Cogotas I. Del mismo modo también los individuos del Bronce antiguo se asemejan mucho ya a los de la cultura Protocogotas, que por otro lado son los más similares a la población actual. Sin embargo a pesar de su proximidad temporal Protocogotas y Cogotas I se encuentran ligeramente distanciados.

Para poder valorar las distancias genéticas de un modo más preciso se han valorado de manera concreta entre los yacimientos de cada periodo dos a dos, es decir enfrentando los periodos crono-culturales consecutivos en el tiempo para observar las distancias genéticas relativa entre cada uno de los yacimientos de que se componen. Los resultados obtenidos de este estudio de distancias genéticas se han representado mediante gráficas MDS (Multidimensional Scaling) que se pueden observar en la *Figura 71*. En cada una de estas gráficas se han representado las distancias genéticas entre los yacimientos de dos periodos consecutivos en el tiempo; de modo que a todos los yacimientos pertenecientes a un mismo periodo crono-cultural se les ha asignado un color (azul o verde) y se ha establecido un área que abarca todos los yacimientos pertenecientes a ese mismo periodo y que se observa en cada gráfico representado por el color característico de ese periodo (en unos casos azul y en otros verde). De este modo, es posible observar la mayor o menor proximidad genética, siendo los más próximos genéticamente aquellos yacimientos que se encuentren en las áreas dónde se superpongan los dos colores.

No se han mostrado gráficas MDS de aquellos resultados no significativos, por lo que no se han incluido resultados sobre el Soto Formativo, dada la escasez de datos, ni de las poblaciones del Siglo XXI, por no obtener distancias genéticas significativas.

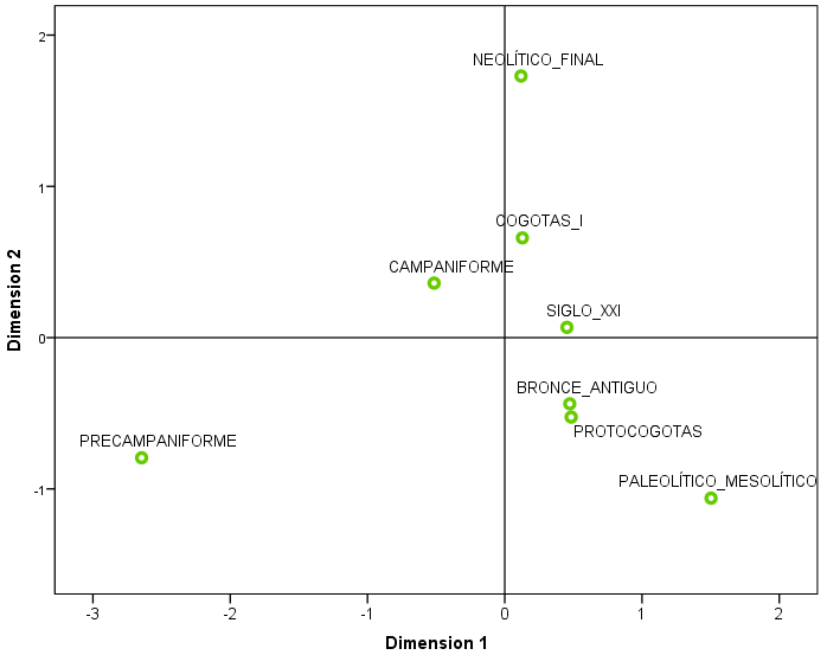
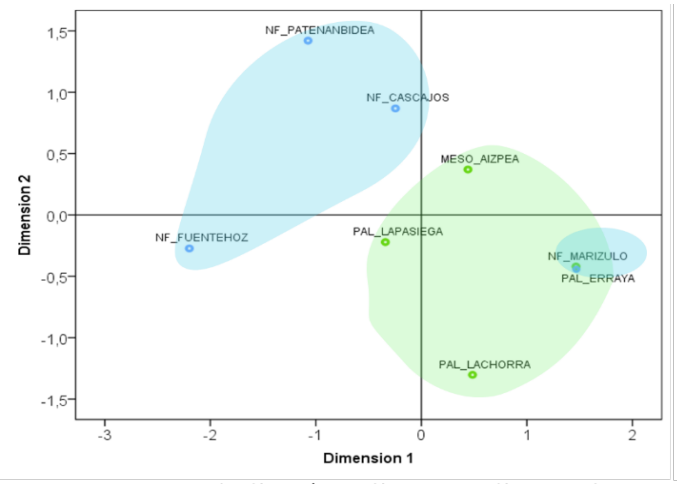
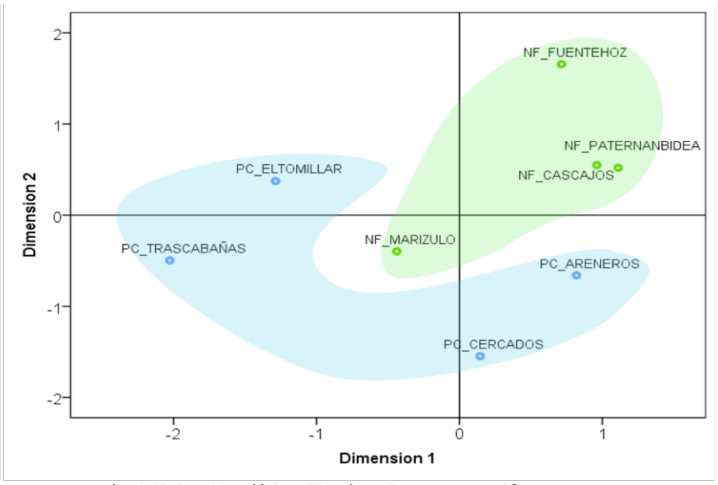


Figura 70. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los 9 periodos temporales

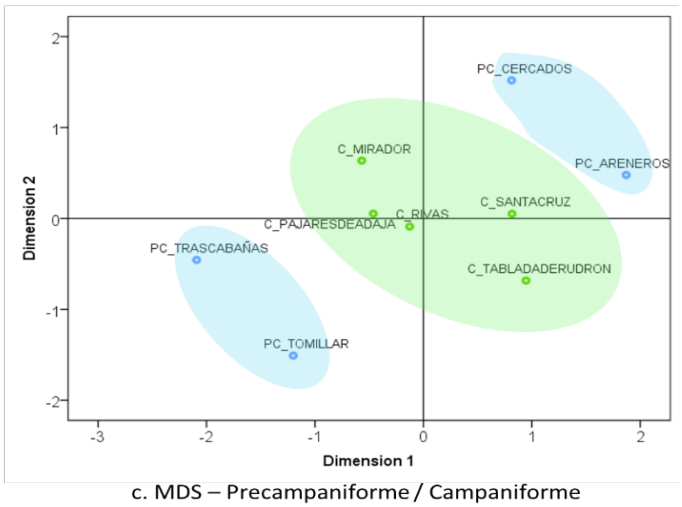
estudiados.



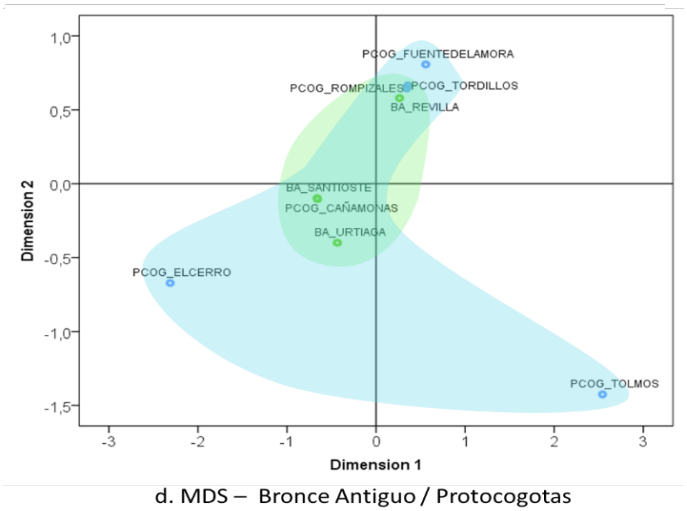
a. MDS – Paleolítico /Mesolítico vs Neolítico Final



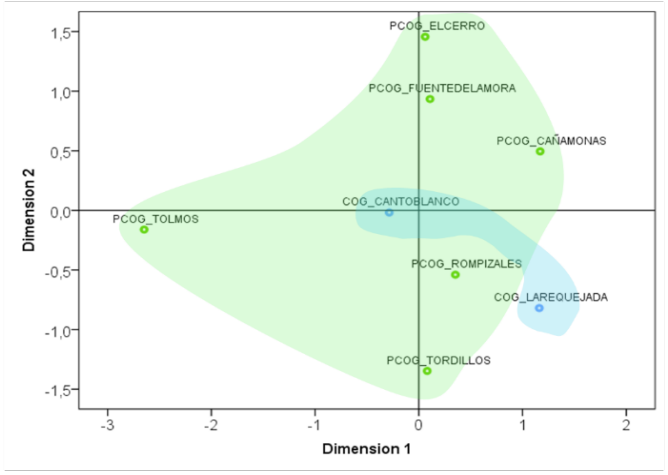
b. MDS – Neolítico Final vs Precampaniforme



c. MDS – Precampaniforme / Campaniforme



d. MDS – Bronce Antiguo / Protocogotas



e. MDS – Protocogotas / Cogotas I

Figura 71. Representación MDS de las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre diferentes periodos temporales. Se han representado únicamente aquellos conjuntos con distancias genéticas significativas entre alguno de sus yacimientos.

5.2.2.2 Análisis Sincrónico-Espacial De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones De La Península Ibérica

Las pautas seguidas para llevar a cabo la comparación espacial entre las diferentes poblaciones, pueden verse en el apartado 4.2.3.2.4.3 de material y métodos, así como los diferentes grupos de poblaciones establecidos para realizar los siguientes análisis con el software *Arlequin v. 35*.

En primer lugar, se llevó a cabo una AMOVA general entre los grupos establecidos, cuyos resultados se recogen en la *tabla 63.*

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	6	16,305	0,08125 Va	6,02
Entre poblaciones	26	39,069	0,09408 Vb	6,97
Entre individuos	94	110,453	1,17503 Vc	87,02

Tabla 63. Resultados obtenidos del análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos organizados por criterios geográficos.

Tal como podemos observar si comparamos la AMOVA entre grupos en la *tabla 63* (6,02) con la de la *tabla 61* (1,97), comprobamos que existe una mayor variabilidad entre los distintos grupos que conforman las distintas regiones geográficas, que entre los diferentes periodos. Sin embargo hay que tener en cuenta que en esta división geográfica encontramos distintas cantidades de individuos en cada uno de los grupos crono-culturales por cada una de las áreas geográficas establecidas.

No obstante, en este caso también se ha llevado a cabo un análisis AMOVA por pares, para poder establecer más de cerca qué regiones geográficas son más divergentes genéticamente y cuáles de ellas son más parecidas, pudiendo observar si aquellas más cercanas geográficamente también comparten unas características genéticas similares o si por el contrario se trata de poblaciones diferenciadas a pesar de la proximidad. En la *tabla 64* podemos observar los resultados obtenidos en este análisis de la AMOVA por pares.

	% de variación	1	2	3	4	5	6
1	Grupos						
	Poblaciones						
	Individuos						
2	Grupos	-5,47					
	Poblaciones	6,23					
	Individuos	99,23					
3	Grupos	**-13**	**0,59**				
	Poblaciones	23,46	13,55				
	Individuos	89,54	85,86				
4	Grupos	**13,54**	**11,10**	5,65			
	Poblaciones	-10,46	5	14,48			
	Individuos	96,92	83,90	79,87			
5	Grupos	4,23	**-10,07**	**-14,52**	-0,13		
	Poblaciones	-22,54	7,7	28,70	-4,69		
	Individuos	118,31	102,37	85,82	104,82		
6	Grupos	**29,08**	**18,72**	7,27	**12,93**	**19,45**	
	Poblaciones	-68,38	3,87	15,79	-12,82	-32,27	
	Individuos	139,30	77,41	76,94	99,88	112,82	
7	Grupos	**12,67**	**10,84**	**-0,85**	**19,97**	5,98	3,46
	Poblaciones	-24,60	5,62	20,02	-4,65	-2,16	-12,35
	Individuos	111,93	83,53	80,83	84,68	96,18	108,88

Tabla 64. Resultados obtenidos del análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre grupos organizados por criterios geográficos 2 a 2. Cada número representa cada una de las regiones establecidas en el mapa de la figura 65. Se han marcado en blanco aquellos valores por encima de 10 o por debajo de 1, sin atender a signos negativos.

En este caso, también se ha realizado un análisis de las distancias genéticas entre grupos geográficos. En una primera etapa se han estudiado distancias genéticas FSTs entre todos los conjuntos, sin atender a su temporalidad; y a partir de los datos obtenidos se han realizado gráficas MDS (Multidimensional Scaling) para representar dichas distancias. En la *Figura 72* se pueden observar las distancias genéticas establecidas entre las diferentes regiones a grandes rasgos. Por otro lado, en la *Figura 73* es posible observar las distancias genéticas entre los yacimientos de diferentes áreas geográficas comparadas dos a dos. En una segunda etapa, se han querido conocer las diferencias y/o similitudes entre el Calcolítico del interior peninsular (Submeseta Norte) y la región levantina, resultados que se representan en la gráfica MDS de la *Figura 74*.

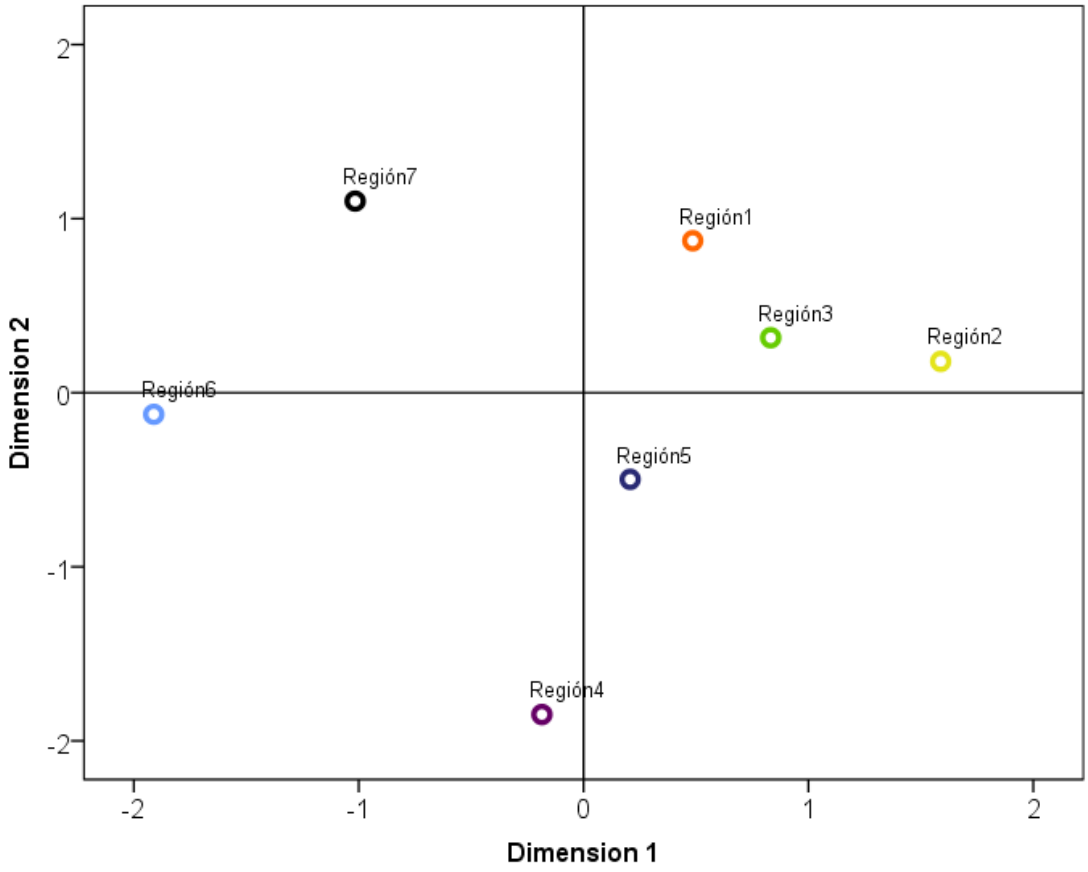
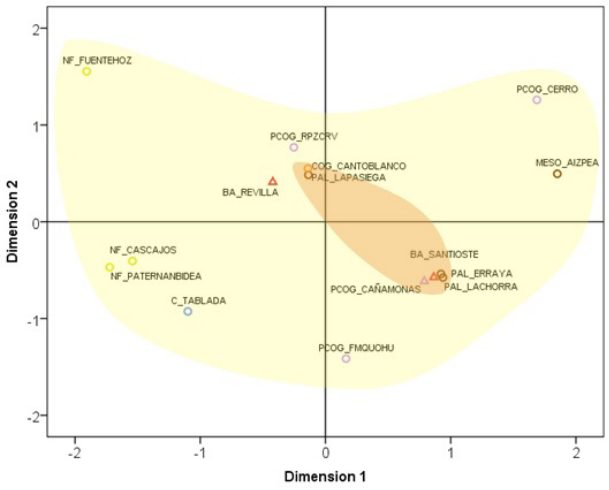
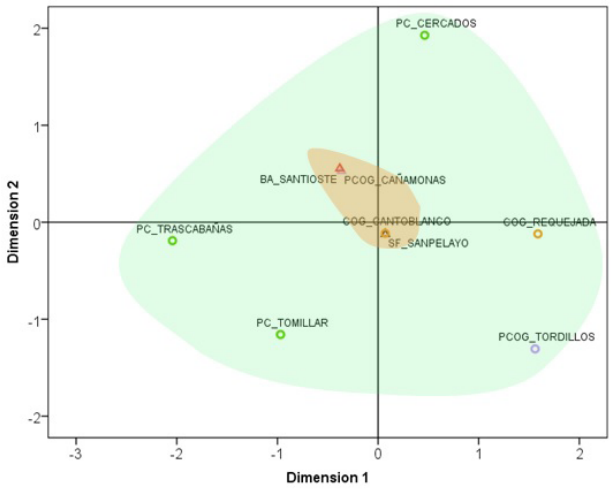


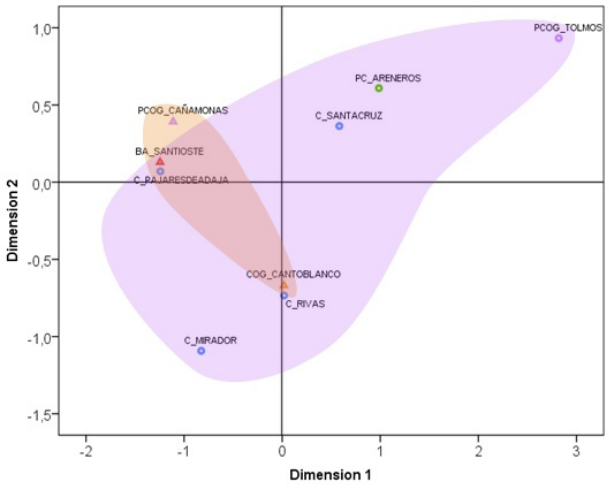
Figura 72. Representación MDS de las distancias FSTs de Slatkin entre las distintas regiones geográficas establecidas en la Figura 58.



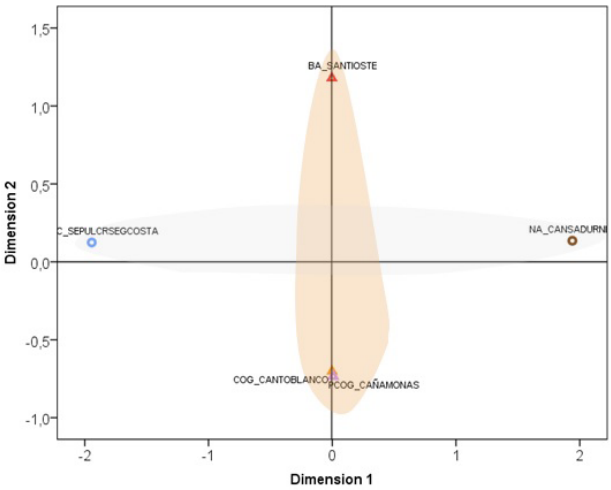
a. MDS distancias genéticas entre la Región 1 (área en naranja) y la Región 2 (área en amarillo)



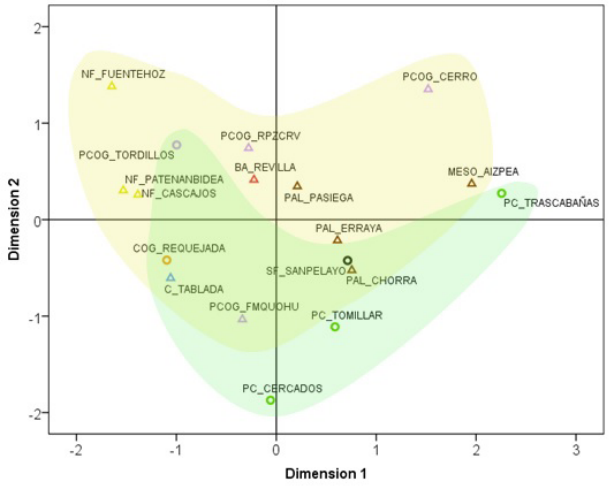
b. MDS distancias genéticas entre la Región 1 (área en naranja) y la Región 3 (área en verde)



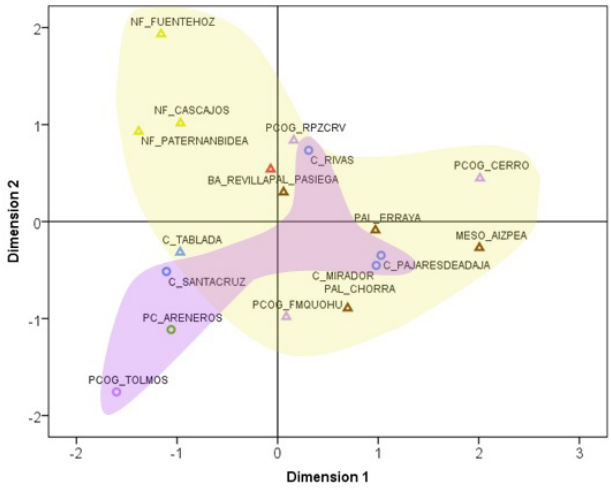
c. MDS distancias genéticas entre la Región 1 (área en naranja) y la Región 4 (áre en morado)



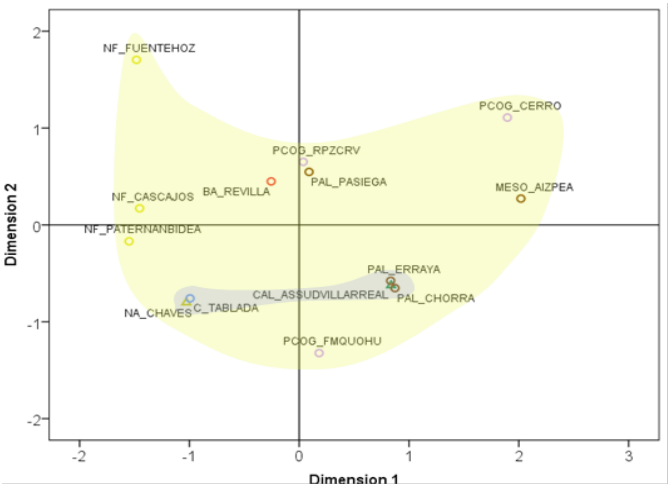
d. MDS distancias genéticas entre la Región 1 (área en naranja) y la Región 7 (área en gris)



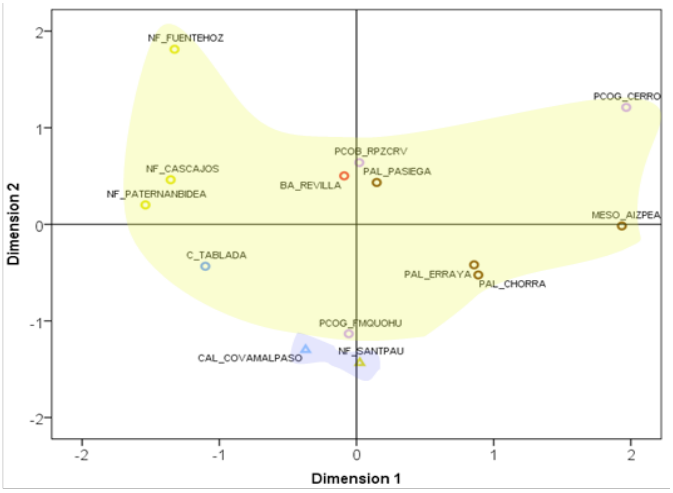
e. MDS distancias genéticas entre la Región 2 (área en amarillo) y la Región 3 (área en verde)



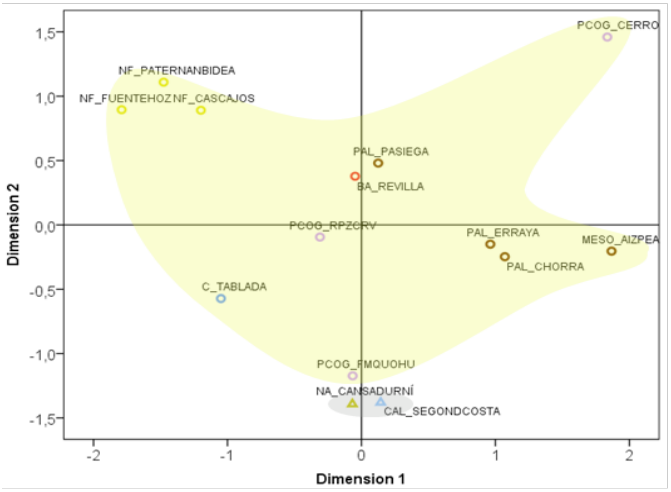
f. MDS distancias genéticas entre la Región 2 (área en amarillo) y la Región 4 (área en morado)



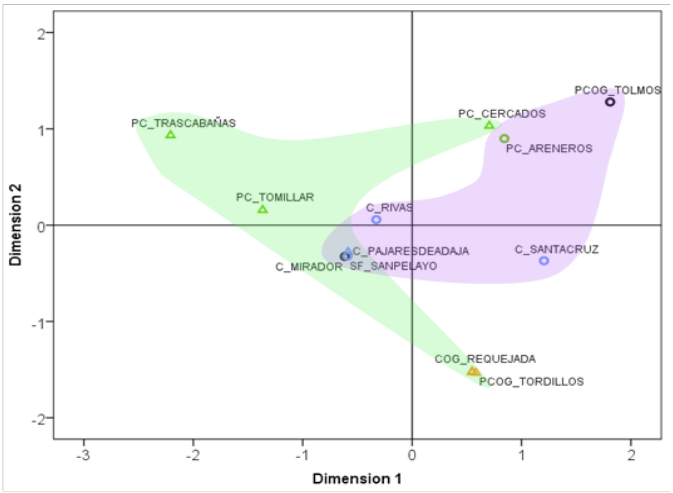
g. MDS distancias genéticas entre la Región 2 y la Región 5



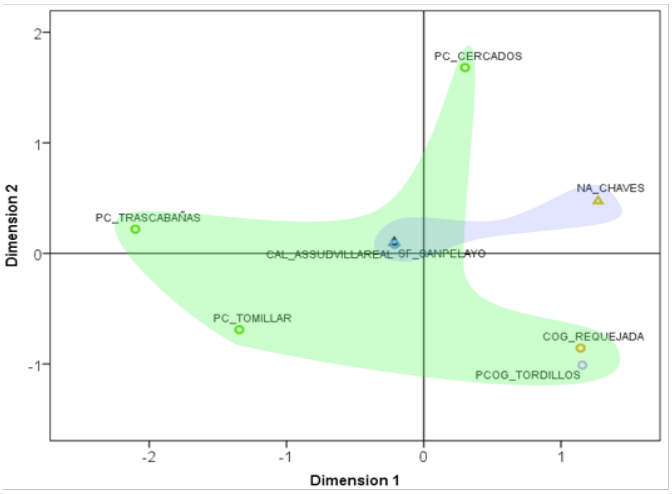
h. MDS distancias genéticas entre la Región 2 y la Región 6



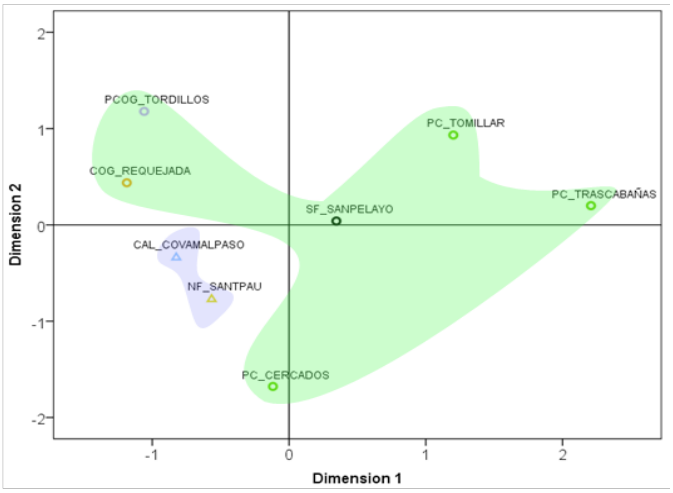
i. MDS distancias genéticas entre la Región 2 (área en amarillo) y la Región 7 (área en gris)



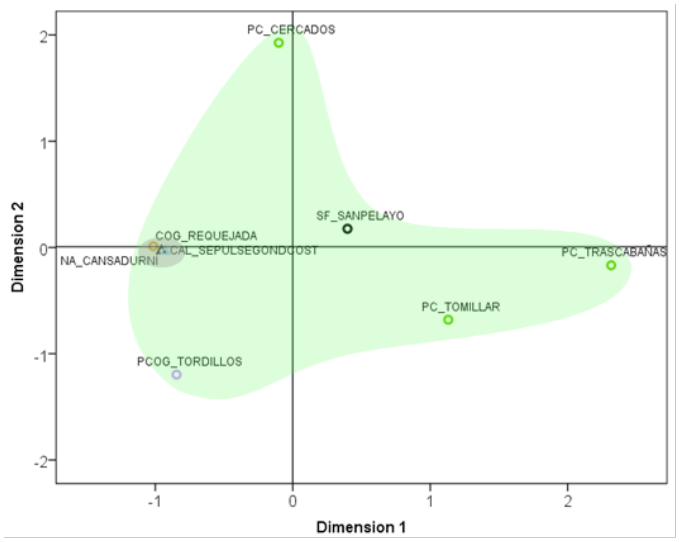
j. MDS distancias genéticas entre la Región 3 (área en verde) y la Región 4 (área en morado)



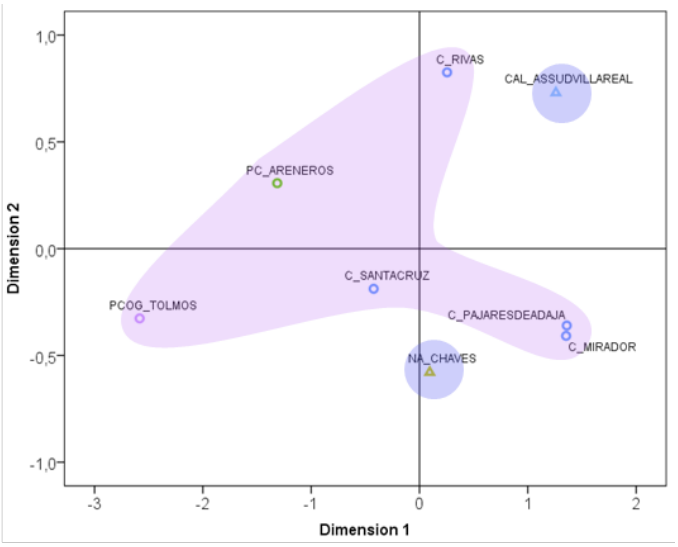
k. MDS distancias genéticas entre la Región 3 (área en verde) y la Región 5 (área en azul)



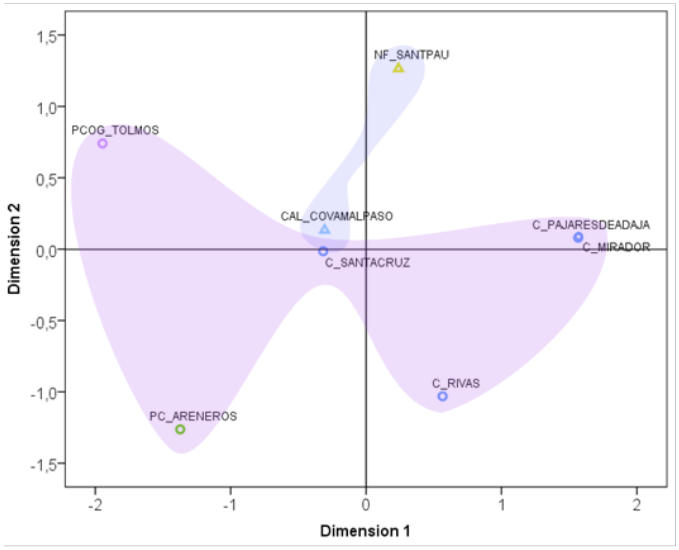
l. MDS distancias genéticas entre la Región 3 (área en verde) y la Región 6 (área en azul)



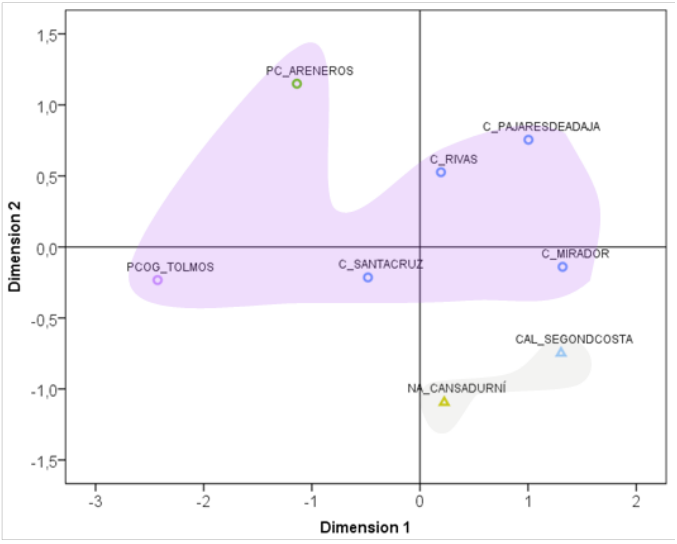
m. MDS distancias genéticas entre la Región 3 (área en verde) y la Región 7 (área en gris)



n. MDS distancias genéticas entre la Región 4 (área en morado) y la Región 5 (áreas azules)



ñ. MDS distancias genéticas entre la Región 4 (área en morado) y la Región 6 (área azul)



o. MDS distancias genéticas entre la Región 4 (área morada) y la Región 7 (área gris)

Figura 73. Representaciones MDS de las distancias genéticas establecidas entre los yacimientos de las diferentes áreas geográficas definidas. En cada una de las gráficas se han marcado con diferentes áreas de color las dos regiones contrastadas en cada una de las gráficas MDS, correspondiéndose cada una a los colores que definen cada área geográfica según la Figura 40. También en la leyenda situada bajo cada una de las gráficas se puede leer a que regiones corresponde el análisis. Además podemos observar cada yacimiento marcado en distintos colores en función del periodo cronológico al que pertenece, siendo los colores correspondientes a los siguientes periodos: Paleolítico y Mesolítico, color marrón; Neolítico antiguo y final, amarillo; Precampaniforme, verde; Campaniforme, azul; Calcolítico, azul claro; Bronce antiguo, rojo; Protocogotas, violeta; Cogotas, naranja; Soto formativo, negro. Se han representado únicamente aquellas relaciones que dieron lugar a distancias significativas en alguno de los casos. Las matrices de distancias correspondientes pueden consultarse en el material complementario (hojas MFST6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15, del archivo S.1).

Tal como se planteó anteriormente, se ha llevado a cabo una comparación entre los yacimientos del periodo Calcolítico (Precampaniforme y Campaniforme de la Submeseta Norte) del interior frente a los de la costa Levantina; para poder valorar si existen diferencias significativas en la composición genética de las poblaciones de estos dos territorios. La representación MDS de las distancias genéticas obtenidas entre dichos yacimientos, se representa en la siguiente figura (*Figura 74*).

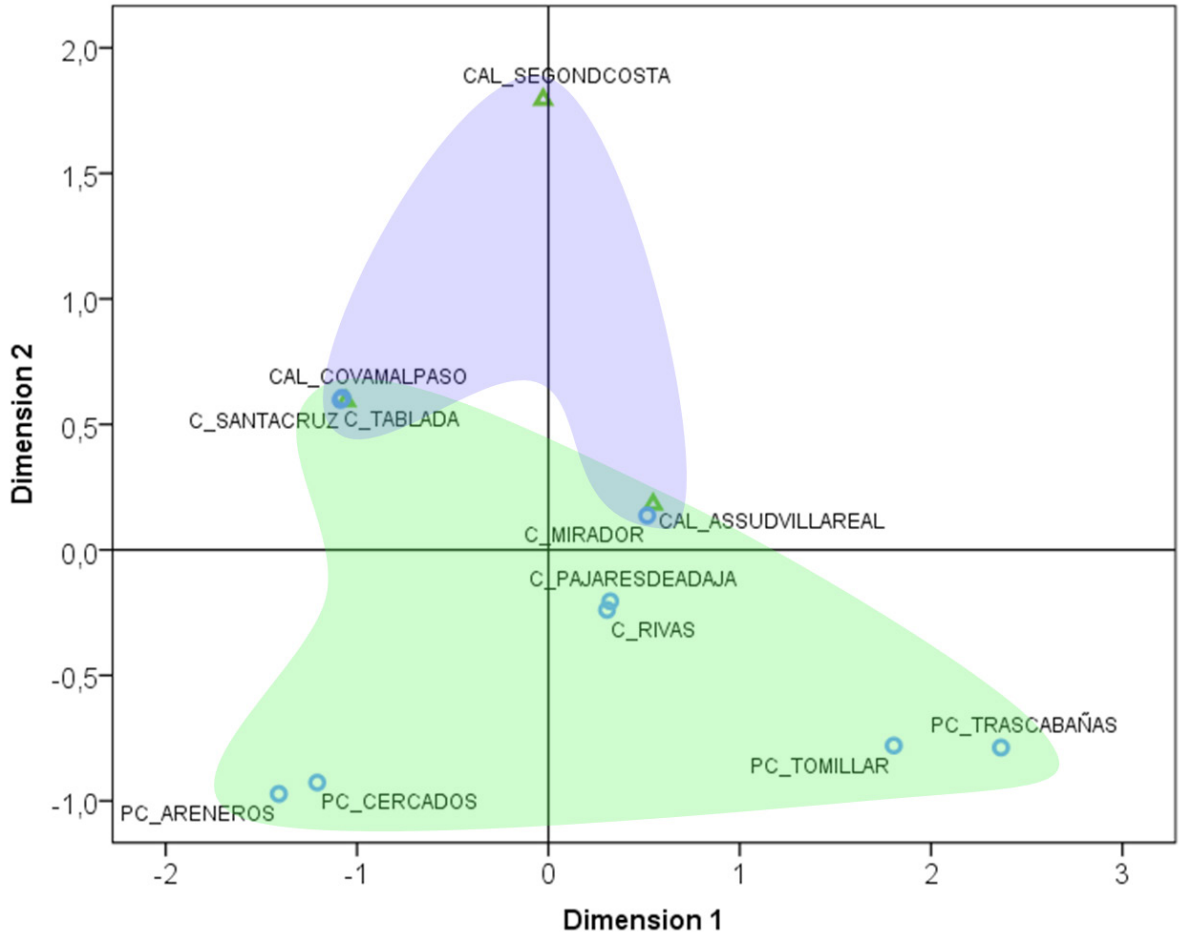


Figura 74 . Representación MDS de las distancias genéticas existentes entre los yacimientos Calcolíticos de la Submeseta norte y la región Levantina.

Tal como se observa en la *figura 74* la población Calcolítica de la Cova de Malpaso es muy similar genéticamente a las de Santa Cruz de Cabezón y Tablada de Rudrón. Del mismo modo la Población de Assud de Villareal también es muy similar a la del Mirador. Sin embargo la población del yacimiento de San Segónd de la Costa es la que difiere en mayor medida de las poblaciones Calcolíticas del interior.

5.2.2.3 Combinación De Datos De Los Análisis Diacrónico Y Sincrónico

Mediante el software *Arlequin V. 35* se han analizado las distancias genéticas FSTs entre todos los yacimientos analizados dentro de este apartado, sin atender a ninguna organización temporal y geográfica. Después se ha aplicado un MDS para representar los resultados obtenidos (*Figura 75*), para ello se han empleado las distancias genéticas FSTs de Slatkin. En la representación se observan de manera independiente cada uno de los yacimientos o poblaciones analizadas, y se indica su pertenencia a una determinada región geográfica o a un periodo de tiempo concreto según diferentes colores y formas indicadas en la leyenda.

Las regiones geográficas son las establecidas en el mapa de la *figura 40* del análisis sincrónico-espacial (apartado 4.2.3.2.4.3 de material y métodos). Los colores empleados en dicho mapa (*figura 41*) para la identificación de cada región geográfica, son los mismos empleados en el gráfico MDS de la *Figura 73* para identificar la ubicación geográfica de cada yacimiento representado. Además se ha representado una serie de áreas con esos mismos colores, que abarcan a todos los yacimientos ubicados en una misma región geográfica.

Los periodos temporales empleados son los utilizados en el análisis diacrónico (4.2.3.2.4.2), en este caso cada uno de los periodos viene dado por una figura geométrica diferente (*Figura 75).* De este modo en la *figura 75* podemos observar una representación gráfica de las distancias FSTs de Slatkin considerando la ubicación geográfica y el periodo temporal de cada yacimiento.

Al igual que durante el análisis del apartado 5.2.1.4, en esta ocasión también se quiere valorar las variaciones geográficas a lo largo del tiempo mediante los dos enfoques allí establecidos. Una vez obtenidas las matrices de distancias FSTs de Slatkin mediante el software *Arlequin V.35*, se ha utilizado el programa *Surfer v.11* para crear un conjunto de mapas que representen dichas distancias en el espacio a lo largo del tiempo. En la *Figura 76* se muestran los mapas resultantes para el enfoque 1 y en la *Figura 77* los correspondientes al enfoque 2.

Esta página se ha dejado en blanco de manera intencional

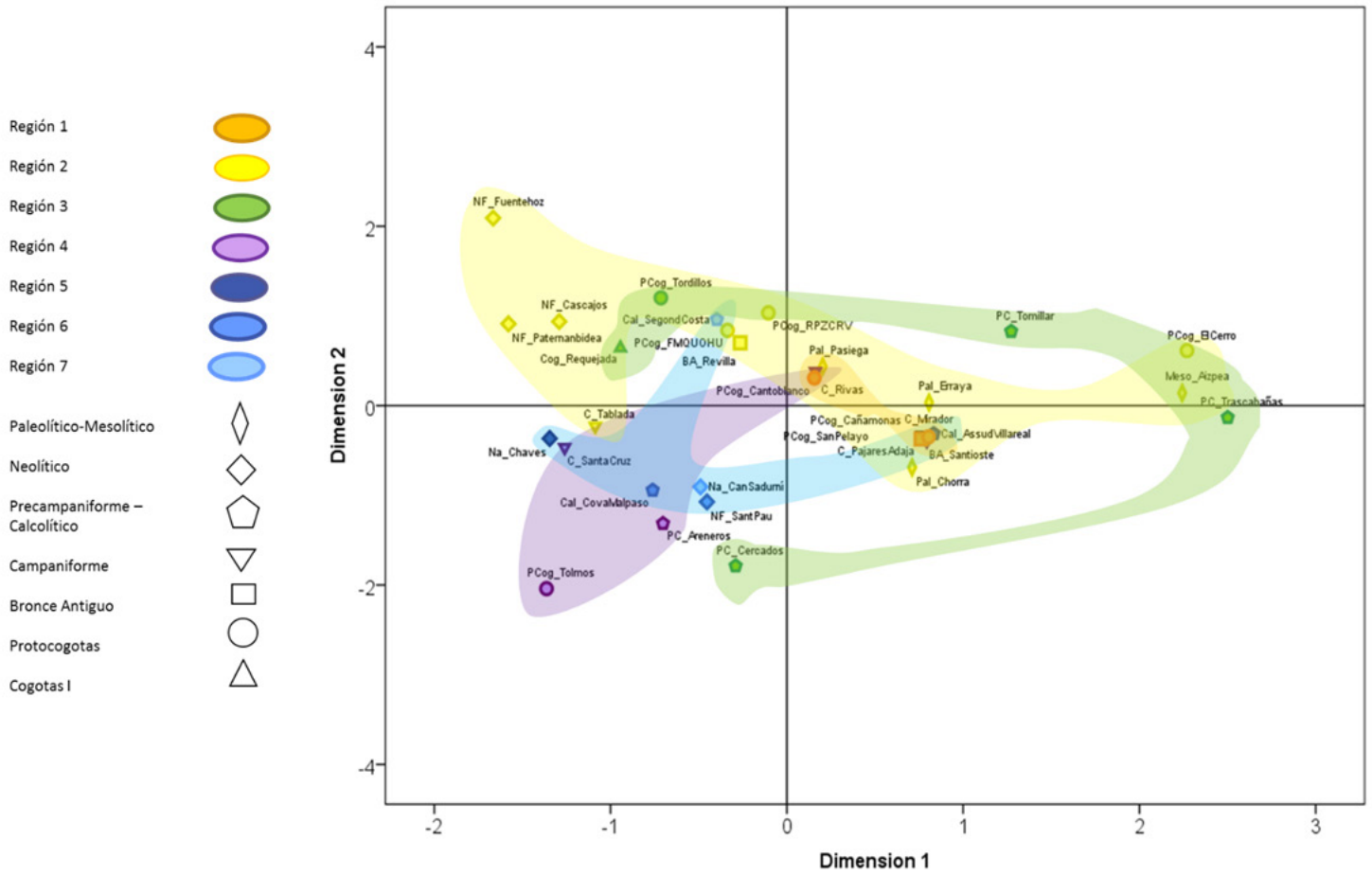
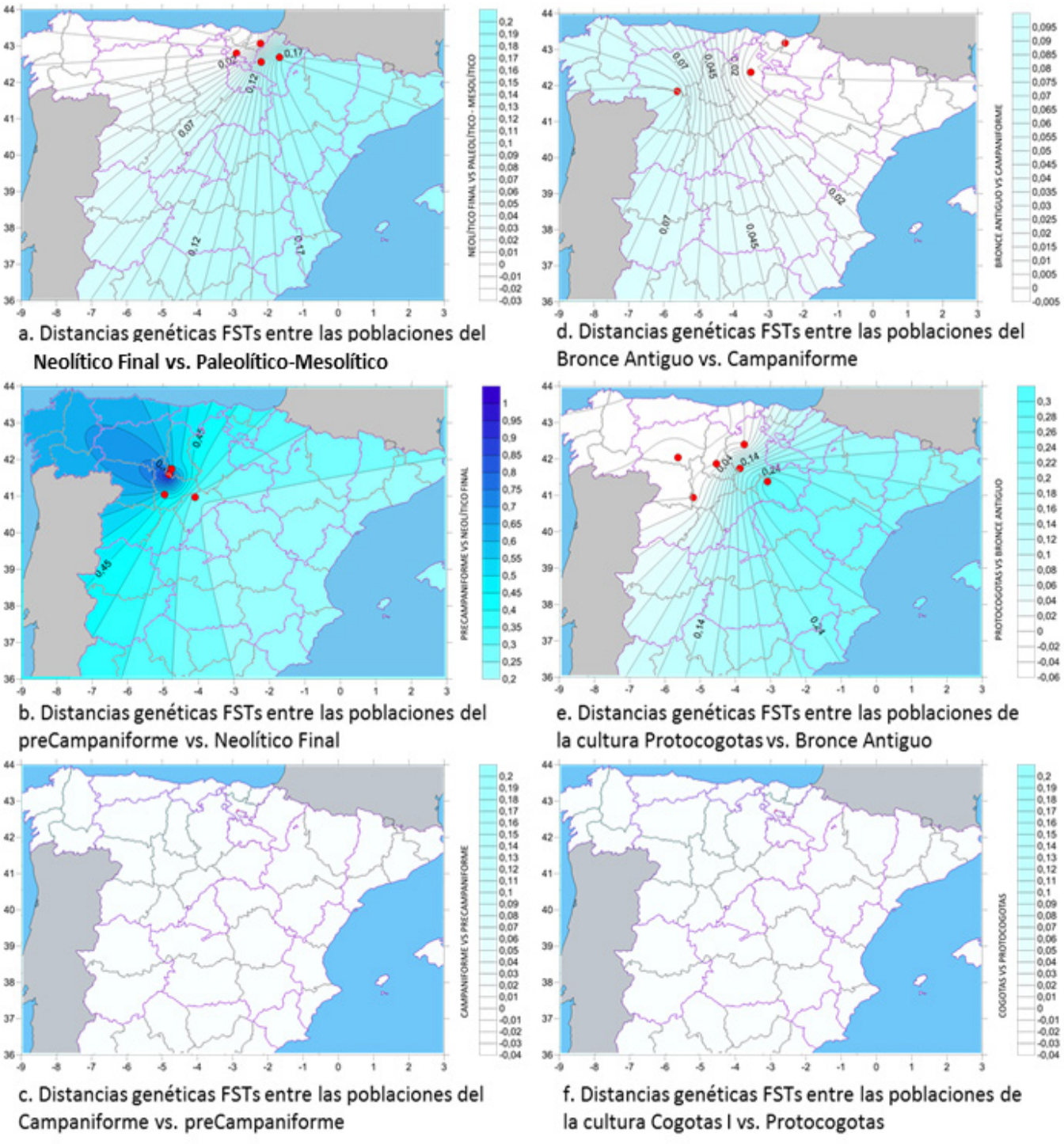
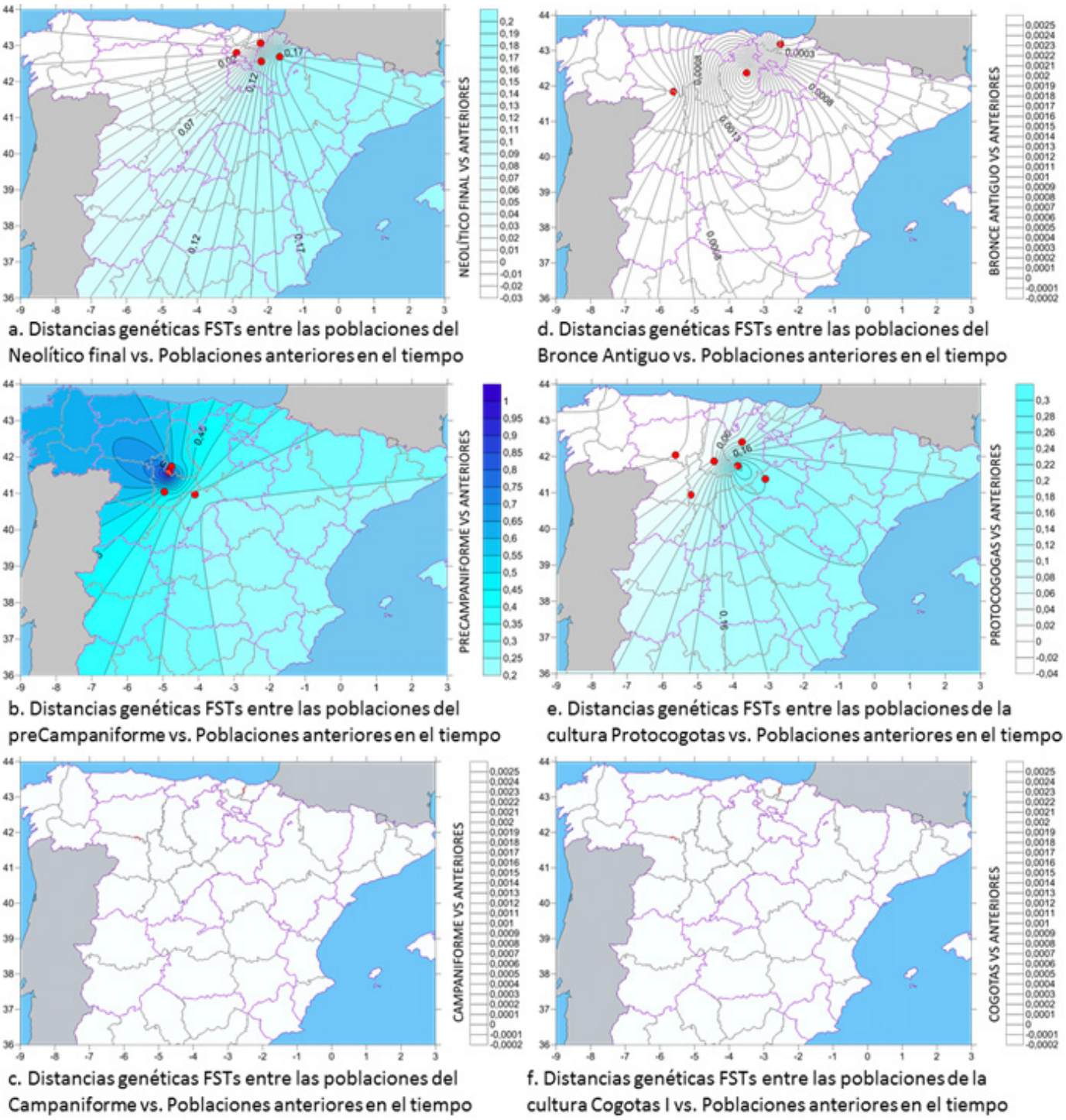


Figura 75. MDS en el que se representan las distancias genéticas FSTs de Slatkin entre los distintos yacimientos estudiados. Se indica mediante colores la región geográfica a la que pertenece cada yacimiento, así como con formas su pertenencia a los diferentes periodos temporales.



Figuras 76. Cada uno de estos mapas representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del inmediatamente anterior de manera puntual. En la leyenda bajo cada una de las gráficas se puede observar a que periodos corresponde. A la derecha de cada una de las representaciones se observa una gradación de color que indica la distancia genética existente entre las poblaciones del periodo analizado respecto de la población inmediatamente interior, siendo el blanco el color que indíca una menor distancia genética y el azul cada vez más intenso indica una mayor distancia genética entre las dos poblaciones. Los números en los ejes X e Y de cada gráfica indican las coordenadas geográficas.



a. Distancias genéticas FSTs entre las poblaciones del Neolítico final vs. Poblaciones anteriores en el tiempo

d. Distancias genéticas FSTs entre las poblaciones del Bronce Antiguo vs. Poblaciones anteriores en el tiempo

b. Distancias genéticas FSTs entre las poblaciones del preCampaniforme vs. Poblaciones anteriores en el tiempo

e. Distancias genéticas FSTs entre las poblaciones de la cultura Protocogotas vs. Poblaciones anteriores en el tiempo

c. Distancias genéticas FSTs entre las poblaciones del Campaniforme vs. Poblaciones anteriores en el tiempo

f. Distancias genéticas FSTs entre las poblaciones de la cultura Cogotas I vs. Poblaciones anteriores en el tiempo

Figuras 77. Cada uno de estos mapas representa las distancias FSTs establecidas entre los distintos periodos de tiempo respecto del conjunto de todas las poblaciones anteriores en el tiempo.. En la leyenda bajo cada una de las gráficas se puede observar a que periodo corresponde cada una.. A la derecha de cada una de las representaciones se observa una gradación de color que indica la distancia genética existente entre las poblaciones del periodo analizado respecto del conjunto de poblaciones anteriores en el tiempo, siendo el blanco el color que indica una menor distancia genética y el azul cada vez más intenso indica una mayor distancia genética entre las dos poblaciones. Los números en los ejes X e Y de cada gráfica indican las coordenadas geográficas.

Si analizamos los cambios puntuales entre periodos consecutivos en el tiempo (*Figura 76)* podemos observar que en el transcurso del Paleolítico al Neolítico hay un cierto incremento de las distancias genéticas, aunque es suave (máxima distancia genética de 0,2). En el paso del Neolítico Final al Precampaniforme la distancia genética se incrementa de manera notable hacia la región noroeste (alcanzando la máxima distanciación genética posible entre estos grupos), siendo este el cambio más importante percibido. El siguiente cambio se percibe es más suave, y tiene lugar con la llegada de la cultura Protocogotas I, respecto del Bronce Antiguo (entre los que se observan distancias genéticas de hasta 0,3), esta vez hacia el este, que posteriormente se suaviza de nuevo, no observándose grandes distancias genéticas entre Protocogotas y Cogotas I.

Si centramos la atención en la *Figura 77,* observamos que los cambios en distancias genéticas de forma gradual son prácticamente los mismos que se observaban en las comparaciones puntuales. La única diferencia, muy tenue, es una ligera reducción de las distancias genéticas en la cultura del Bronce Antiguo respecto de todas las poblaciones anteriores (distancia genética de 0,0025), que era un poco más intensa si comparábamos las poblaciones del Bronce Antiguo respecto de sus inmediatos predecesores del Campaniforme (distancia máxima de 0,095). Pero de nuevo en este caso se aprecian dos cambios importantes marcados por un incremento en las distancias genéticas, el primero de ellos con la llegada del preCampaniforme, y el segundo con la cultura Protocogotas I.

5.2.2.4 Estudio De los Haplogrupos: Análisis De Correspondencias

A partir de los haplotipos obtenidos a partir de las muestras analizadas en esta tesis, se llevó a cabo una búsqueda de los haplogrupos correspondientes en el *Phylotree build 16* empleando la herramienta *Haplogrep (http://haplogrep.uibk.ac.at/).* Por otro lado, se tuvieron en cuenta los haplogrupos aportados por las fuentes bibliográficas empleadas. Con toda esta información, se ha tratado de ver cuáles son los más representativos de cada uno de los periodos estudiados y cómo varían en el tiempo. Mediante el software SPSS se ha elaborado el gráfico visible en la *Figura 78*, que representa la evolución temporal de los haplogrupos más representativos.

El haplogrupo H parece alcanzar su máximo entre el Mesolítico y el Neolítico final, después sufre una reducción aunque se mantiene más o menos presente durante el resto de periodos, para volver a incrementar su presencia durante el periodo correspondiente a la cultura Protocogotas I. El HV0 por su parte se mantiene constante a lo largo del tiempo en bajas proporciones, incrementándose durante el periodo Protocogotas. Durante este mismo periodo Protocogotas se observan también incrementos en las frecuencias de los haplogrupos T y U. Éste último (U) e ya había sido importante durante el Neolítico final, durante el cual alcanzó su máxima frecuencia, pero después su frecuencia decayó, y había estado prácticamente ausente desde entonces. En cuanto al haplogrupo K se sigue observando su pico máximo durante el Precampaniforme, mientras que en esta transición del Neolítico a la Edad de Cobre se reduce la frecuencia del resto de haplogrupos, siendo el K el más característico.

Otra forma de observar la vinculación de ciertos haplogrupos a determinados periodos crono-culturales es mediante un análisis de correspondencias, que puede observarse en la *figura 79*.

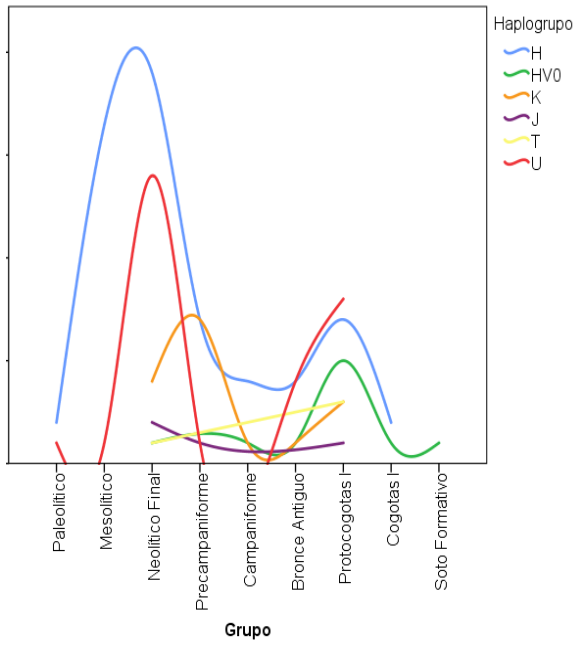


Figura 78. Representación gráfica de la evolución de la prevalencia de los haplogrupos más significativos a lo largo del tiempo, de más antiguo a la izquierda a más reciente a la derecha.

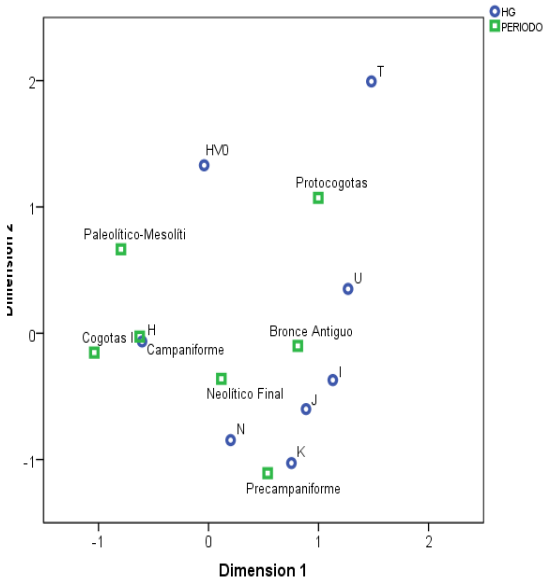


Figura 79. Análisis de correspondencias

En esta última representación (*Figura 79*), a diferencia de la *Figura 78*, se han representado la totalidad de haplogrupos y no únicamente aquéllos más frecuentes, por ello en esta representación de la *Figura 79* se observan los haplogrupos N e I que son muy minoritarios.

5.2.2.5 Elaboración De Networks

Del mismo modo que se llevó a cabo anteriormente, también con los resultados obtenidos a partir de Haplogrep se han creado árboles mediante el software Network 4.6. *Figuras 80, 81, 82 y 83*.

- Haplogrupo H

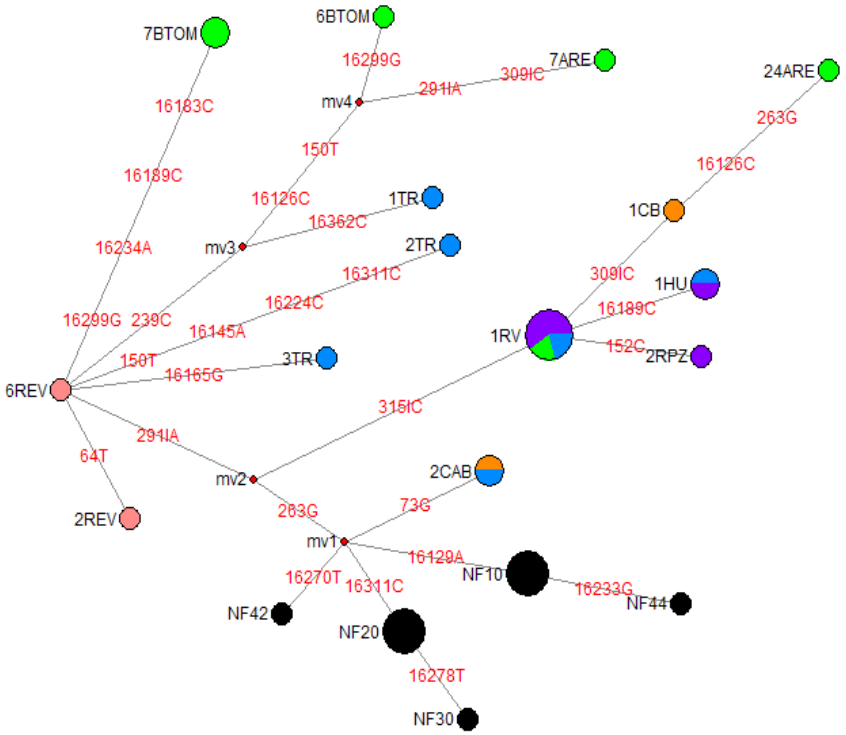


Figura 80. Network. Haplogrupo H. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo preCampaniforme, en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, en naranja los individuos correspondientes a la cultura Cogotas I y en negro los que corresponden al Neolítico Final.

Según el árbol de la *figura 80* no parece que los individuos pertenecientes al haplogrupo H de la Edad del Bronce en adelante procedan de un origen anterior en el tiempo dentro de la Península Ibérica, ya que el haplogrupo H de las poblaciones del Bronce no parece tener un origen en el haplogrupo H de las poblaciones Neolíticas ni Calcolíticas, sino que parece que tuviera otro origen , a partir del cual si se van a desarrollar los conjuntos de haplogrupo H de Protocogotas y Cogotas. Esto indicaría un posible nuevo flujo de población durante la Edad del Bronce Antiguo que traerían un haplogrupo H que nada tiene que ver con los haplogrupos H que había en la región durante el Neolítico y el Calcolítico.

- Haplogrupo HV0

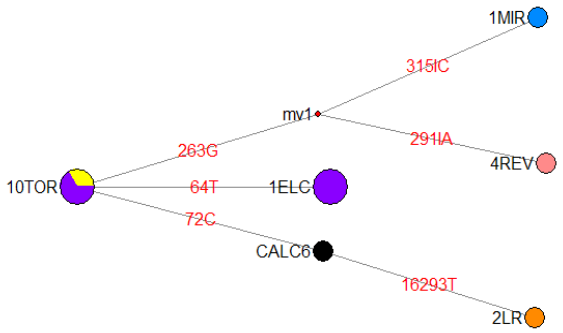


Figura 81. Network. Haplogrupo HV0. Se indican en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, en naranja los individuos correspondientes a la cultura Cogotas I, y en negro los que corresponden al Calcolítico. En amarillo se ha incluido el individuo del San Pelayo, del Soto Formativo.

Según lo observado en el árbol de la *figura 81*, es posible que los individuos Cogotas I con haplogrupo HV0 tengan su origen en las poblaciones HV0 del periodo Protocogotas. Sin embargo, parece que los Protocogotas con haplogrupo HV0 son una población nueva, no derivada de las poblaciones Calcolíticas que presentaban ese haplogrupo. No obstante, el número de individuos con este haplogrupo es reducido, por lo que este resultado puede estar sesgado en cierta medida.

- Haplogrupo K

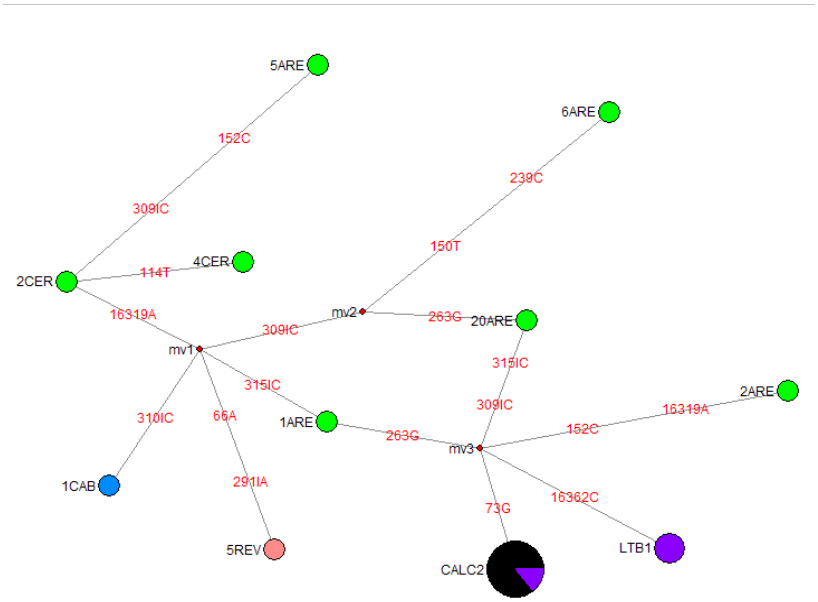


Figura 82. Network. Haplogrupo K. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en azul los individuos del Campaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, y en negro los que corresponden al Neolítico Final.

Tal como se pude observar en el Network de la *figura 82*, el haplogrupo K es mayoritario en la población preCampaniforme, y parece que los individuos que presentan haplogrupo K de poblaciones posteriores del Campaniforme, la edad de Bronce y Protocogotas proceden de la misma raíz filogenética, probablemente de esos mismos haplogrupos K preCampaniformes. Sin embargo, no parece que ese haplogrupo K preCampaniforme tenga el mismo origen que los individuos que presentaban ese haplogrupo durante el Neolítico Final. Esto soportaría la teoría de que tuvo lugar una entrada de nueva población durante el preCampaniforme asociada al haplogrupo K, y que esa población del haplogrupo K continuaría presente en épocas posteriores.

- Haplogrupo U

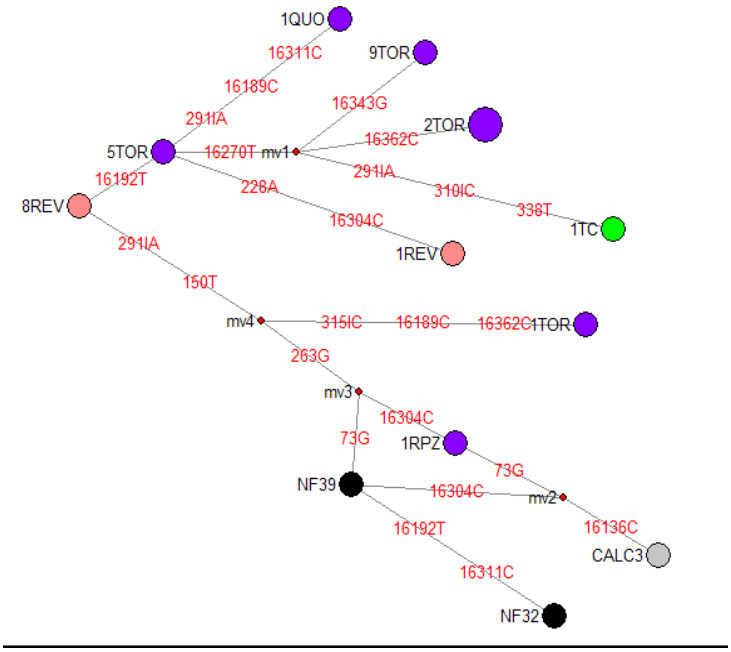


Figura 83. Network. Haplogrupo U. Se indican en verde los individuos pertenecientes al periodo Precampaniforme, en rosa los individuos que datan de la Edad del Bronce, en violeta los Protocogotas, y en negro los que corresponden al Calcolítico Levantino y Neolítico Final.

El haplogrupo U parece tener un origen durante la edad del Bronce antiguo, y a partir de ahí parecen derivar los haplogrupos U del periodo Protocogotas I. No obstante no parece que esos U tengan el mismo origen que los presentes durante el Neolítico y el Calcolítico, incluido el Precampaniforme (*Figura 83*).

5.2.3 Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones Coetáneas De La Submeseta Norte Y Europa

Los análisis realizados en este apartado se centran fundamentalmente en la comparación con la población de la Cueva del Mirador, situada en el complejo arqueológico de Atapuerca (Burgos). La importancia de incluir en esta tesis este análisis de comparación entre las poblaciones aquí analizadas y la de la Cueva del Mirador, se debe a que se trata de los únicos restos Calcolíticos de la Submeseta norte de la Península Ibérica a partir de los cuales ha sido posible la obtención de perfiles de ADN mitocondrial hasta el momento (*Gómez-Sánchez et al., 2014)*.Por ello se ha considerado de interés comparar las poblaciones estudiadas en esta tesis con las de esta cueva y de este modo poder tener una visión más amplia del desarrollo del periodo Calcolítico en la región.

Otra cuestión importante que se ha introducido en este apartado ha sido la comparación con poblaciones contemporáneas de otras regiones europeas, para poder valorar las similitudes y diferencias así como buscar un posible origen de las culturas Precampaniformes y Campaniformes peninsulares, que tal como se ha podido observar anteriormente difieren sustancialmente de las Neolíticas y de las de la Edad del Bronce en la Península Ibérica.

Para tener una visión de la proximidad o divergencia de la población Calcolítica del Mirador así como de las poblaciones Europeas incluidas, respecto de nuestras poblaciones de estudio, se ha llevado a cabo un análisis de componentes principales a partir de las frecuencias de los Haplogrupos de cada una de las poblaciones. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 84.*

Para llevar a cabo el análisis de componentes principales se han utilizado las poblaciones europeas empleadas en el análisis de *Gómez-Sánchez et al., 2014,* y fundamentalmente son: Calcolíticas ((representadas en la gráfica con las siglas: BBC) Cultura Campaniforme Alemana), Poblaciones cazadoras-recolectoras de Europa Central (en la representación las encontramos con las siglas HGC); poblaciones cazadoras-recolectoras de España y Portugal (HGS); poblaciones cazadoras-recolectoras del Este (Rusia, en la gráfica aparecen con las siglas HGE); Cultura Schöningen (con las siglas SCG); Cultura de la cerámica cordada (CWC) y Cultura Pitted-Ware (abreviada en la gráfica como PWC). Poblaciones Neolíticas y Mesolíticas, anteriores al Calcolítico; que son las siguientes acompañadas de las siglas empleadas en el gráfico: Cultura Cardial-Epicardial de España (CAR); Cultura Bernburg de Alemania (BEC); Cultura Baalberge de Alemania (BAC); Cultura Rossën (RSC); Cultura Salzmünde (SMC); Neolítico de Portugal (NPO); Neolítico del País Vasco (NBQ); Cultura de Treilles (TRE). Finalmente, se incluyen yacimientos complementarios de la Edad del Bronce, concretamente de la Edad del Bronce de Siberia (abreviado en la gráfica como BAS) y de Kazakhstan (con las siglas BAK) (*Figura 84*).

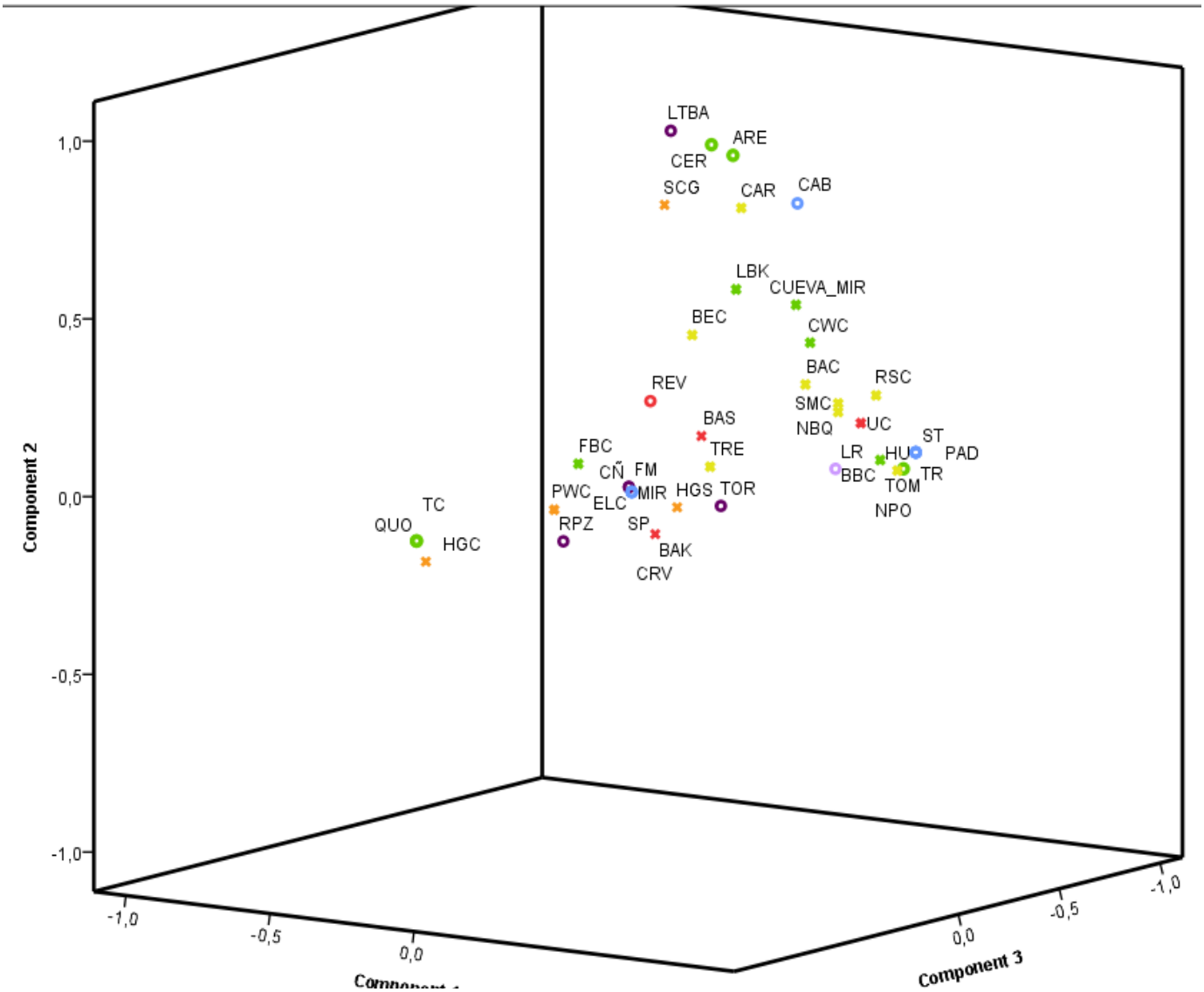


Figura 84. Análisis de componentes principales. Cada punto representa uno de los yacimientos analizados. Los yacimientos correspondientes a esta tesis están marcados con círculos, mientras que los yacimientos dela bibliografía se representan mediante cruces. Representados con círculos verdes aparecen los correspondientes al periodo Precampaniforme de la Submeseta norte.). Representados con círculos azules, los correspondientes al periodo Campaniforme. Con círculos rojos, aparecen los yacimientos correspondientes al Bronce antiguo). Con círculos violetas están representados los yacimientos Protocogotas). Los Cogotas están representados mediante círculos rosas)..Con cruces verdes aparecen las poblaciones de la bibliografía (Gómez-Sánchez et al., 2014) que son calcolíticas; con cruces naranjas las poblaciones cazadoras-recolectoras de diferentes regiones. Con cruces amarillas se han representado las poblaciones Neolíticas y Mesolíticas, anteriores al Calcolítico. Finalmente, con cruces rojas están representados los yacimientos complementarios de la Edad del Bronce.

5.3 ANÁLISIS DE RELACIONES FAMILIARES EN ENTERRAMIENTOS COLECTIVOS Y MÚLTIPLES

5.3.1 Enterramientos Colectivos. Localización Y Periodo

En este punto, se ha llevado a cabo el estudio STRs de ADN nuclear con diferentes finalidades. La principal ha sido el establecimiento de relaciones de parentesco cercano. Sin embargo, según en qué caso, se ha querido resolver otro tipo de cuestiones que se irán definiendo en cada uno de los casos.

Los yacimientos e individuos analizados en este estudio de STRs nucleares están definidos en el apartado 4.2.3.3.1 de material y métodos y la localización exacta de cada uno de los yacimientos puede observarse en la *figura 41* de ese mismo apartado.

Los individuos seleccionados para este análisis (76) han sido aquellos que por el contexto arqueológico en el que se encontraban resultaba de interés realizar un estudio de relaciones de parentesco cercano, bien por su pertenencia a un enterramiento múltiple o colectivo, así como aquellos que a pesar de encontrarse en enterramientos individuales pudiera sospecharse que tuvieran algún tipo de relación con otros por proximidad, u otras cuestiones. Cada caso concreto se explicará en los sucesivos apartados, dentro de este punto.

5.3.2 Eficiencia Del Análisis De STRs Autosómicos

Se ha realizado análisis de STRs autosómicos en los 76 individuos pertenecientes a los 12 yacimientos visibles en el mapa de la *Figura 42*. Del total, solamente se han obtenido resultados parcialmente completos en 6 de los 12 yacimientos que presentaban enterramientos colectivos con interés para el estudio de STRs (estos 6 yacimientos son: Los Tolmos, Los Areneros, Los Rompizales, Tordillos, Los Cercados y La Cueva de la Revilla). El resto de yacimientos mostró resultados nulos o muy escasos, y en cualquier caso irrelevantes para llevar a cabo un estudio de relaciones familiares. Por ello, en este apartado se muestran los resultados relativos a los yacimientos que han proporcionado resultados favorables.

A continuación se muestran caso por caso cada uno de ellos, con los resultados válidos organizados según los 5 criterios de establecimiento de perfiles consenso establecidos en esta tesis y resumidos en el apartado 4.2.3.3.3 del material y métodos. Los electroferogramas, así como los resultados completos obtenidos, están disponibles en el material complementario de esta tesis.

5.3.3 El Estudio De Relaciones Familiares, Caso Por Caso

En cada uno de los siguientes apartados encontramos en primer lugar una tabla que contiene los 5 posibles perfiles obtenidos según los 5 criterios para el establecimiento de consensos a partir de perfiles parciales de STRs en muestras críticas.

A continuación, dentro de cada apartado, se observan los resultados del análisis de relaciones de parentesco cercano para cada uno de los 5 perfiles obtenidos (según los 5 criterios establecidos en el apartado 4.2.3.3.3 de material y métodos). El cálculo de relaciones familiares se ha llevado a cabo mediante la herramienta denominada "*Blind search*" de la última versión del software Familias 3.0 (ver apartado 4.2.3.3.4 de material y métodos.

De este modo se han evaluado las diferencias en los resultados en función de la selección de un criterio u otro. Así como poder establecer o descartar relaciones de parentesco, u otros datos clave tales como la determinación del número de individuos.

5.3.3.1 Los Tolmos

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
LTB1	1	-	28/29	14/15	-	9	-	10/12	19	X	13/14	15/16	14	15/16	12/14	9	11	16	-	-	-
	2	18/23	28/29	14/15	-	9	12	10/12	19	X	13/14	15/16	14	15/16	12/14	9	11	16	-	-	-
	3	18/23	28/29	14/15	-	9	12	10/12	19/21	X	13/14	15/16	14	15/16	12/14	6/9	11	16	12/15	19	-
	4	18/23	28/29	14/15	11	9	12	10/12	19/21	X	13/14	15/16	13/14	15/16	12/14	9	11	16	12/15	19	-
	5	18/23	28/29	14/15	11	9	12	10/12	19/21	X	13/14	15/16	13/14	15/16	12/14	6/9	11	16	12/15	19	-
LTB2	1	17	-	-	-	-	-	11	-	X	13	-	-	11/15	-	-	14	-	-	-	-
	2	17	-	12/13	8/10	-	-	11/12	22	X	13	-	14	11/15	-	-	14	-	-	-	-
	3	17	-	12/13	8/10	-	-	11/12	22/24	X	13	16/17	14	11/15	-	-	14	-	-	-	-
	4	17	-	12/13	8/10	-	-	11/12	22	X	13	16	14	11/15	13	-	14	15	-	-	-
	5	17	-	12/13	8/10	-	-	11/12	22/24	X	13	16/17	14	11/15	13	-	14	15	-	-	-
LTB3	1	-	-	-	-	-	-	10/12	-	X	13/14	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-
	2	18	-	12/15	-	9	-	10/12	-	X	13/14	-	-	16/17	-	-	11/14	-	-	-	-
	3	18	-	12/15	-	9	-	10/12	-	X	13/14	16/17	-	16/17	12	-	11/14	-	-	19	-
	4	18	-	12/15	-	9	-	10/12	-	X	13/14	-	-	16/17	-	-	11/14	18*	-	17/19	-
	5	18	-	12/15	-	9	-	10/12	-	X	13/14	16/17	-	16/17	12	-	11/14	18*	-	17/19	-
LTA4	1	25/27	29	13	10	9/12	12/15	11	19	X/Y	14/15	17	-	16	-	6	11.3/15	15/18	-	-	-
	2	25/27	29/31.2	13	10	9/12	12/15	11	19	X/Y	14/15	17	-	16	-	6	11.3/15	15/18	-	-	-
	3	25/27	29/31.2	13	10	9/12	12/15	11	19	X/Y	14/15	17	12	16	-	6/7	11.3/15	15/18	-	-	-
	4	25/27	29/31.2	13	10	9/12	12/15	11	19	X/Y	14/15	17	12	16	-	6	11.3/15	15/18	-	18/18.3	-
	5	25/27	29/31.2	13	10	9/12	12/15	11	19	X/Y	14/15	17	12	16	-	6/7	11.3/15	15/18	-	18/18.3	-

*Los siguientes alelos no aparecen en la base de datos de población española actual empleada: El alelo 15 del marcador D13S317 y el alelo 27 del marcador D2S1338.

Tabla 65. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de Los Tolmos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el establecimiento de relaciones familiares entre los individuos (*Tabla 66*). En los resultados aquí expuestos únicamente se han mostrado aquellas relaciones que para alguno de los criterios muestren un LR superior a 100, omitiendo el resto (que pueden ser consultados en el material complementario). En la *Tabla 66* podemos observar en la primera y segunda columnas respectivamente el nombre de cada uno de los dos individuos implicados en la relación de parentesco analizada. La tercera columna nos muestra, separados por barras, el número de alelos compartidos éntrelos dos individuos según cada uno de los 5 criterios aplicados (de izquierda a derecha del 1 al 5). En la cuarta columna se indica si los dos individuos implicados en la relación comparten o no a su vez el haplotipo de ADN mitocondrial. En la quinta columna se especifica el tipo de relación estudiada. Y finalmente, de la sexta a la décima columnas se muestran los LRs obtenidos para la relación de parentesco estudiada según cada uno de los cinco criterios establecidos. Esta misma estructura de tabla se repetirá en los casos posteriores.

INDV 1	INDV 2	ALELOS COMPARTIDOS	MISMO mtDNA	RELACIÓN	*LR CRIT 1	*LR CRIT 2	*LR CRIT 3	*LR CRIT 4	*LR CRIT 5
LTB3	LTB1	3 / 6 / 10 / 8 / 10	Sí	Hermandad	6.06725 (0.8585)	543.692 (0.9982)	26472.7 (0.99996)	326.443 (0,9969)	688.911 (0.9986)
LTB3	LTB1	3 / 6 / 10 / 8 / 10	Sí	Medio-hermanos	2.14622 (0,6822)	64.4718 (0,9847)	952.54 (0.9990)	85.4792 (0,9884)	262.923 (0.9962)
LTB3	LTB1	3 / 6 / 10 / 8 / 10	Sí	Hermandad	6.06725 (0.8585)	25.998 (0.9629)	90.994 (0.9891)	150.766 (0.9934)	528.095 (0.9981)
LTB3	LTB1	3 / 6 / 10 / 8 / 10	Sí	Maternidad	3.91 (0.7963)	47.54 (0,9794)	0 (0)*[2]	1427.47 (0.9993)	14284.71 (0.9999)

Tabla 66. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Tolmos, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias.

Tal como se explicó en el apartado 4.2.3.3.4 de material y métodos, esta herramienta no siempre muestra todas las posibilidades de parentesco posible; y en este caso concreto, a pesar del elevado número de alelos compartidos entre los individuos, no ha detectado la existencia de una posible relación de maternidad. Por ello se ha empleado el test de maternidad clásico de este mismo software (*Familias*) para calcular la probabilidad de que la relación entre los individuos LTB1 y LTB3 sea una relación madre-hija. También se ha querido analizar la probabilidad de hermandad mediante este otro método y el resultado es el que aparece en la tercera fila de la *tabla 66*.

Para poder conocer relaciones familiares a través de la línea paterna entre LTB2 y LTB3, así como para confirmar la hipótesis de parentesco entre LTB1 y LTB3, se analizaron marcadores STRs del cromosoma X (*Tabla 67*).

	INDIVIDUOS		
SISTEMAS	LTB1	LTB2	LTB3
DXS8378	12	-	-
DXS9898	11/15	11	11
DXS7133	-	-	-
GATA31E08	15	11	-
GATA172D05	3/5	-	-
DXS7423	15	15	-
DXS6809	33	-	-
DX132	6/7	13/14	-
DXS9902	12/13	-	12
DXS6789	20	21	-

Tabla 67. Resultado del análisis de marcadores del cromosoma X en los individuos LTB1, LTB2 y LTB3.

5.3.3.2 Los Areneros

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
1ARE	1	-	-	8	-	-	16	12	-	X/Y	12	-	13	19	13	-	11/14	-	-	-	-
	2	-	-	8/11	-	-	13/16	12	-	X/Y	12	-	13	19	13	-	11/14	-	-	-	-
	3	17	29	8/11	9	-	13/16	12	-	X/Y	10/12	-	13	17/18/19	13	-	11/14	-	-	-	-
	4	-	-	8/11	9	-	13/16	12	-	X/Y	12	-	13/15	18/19	12/13	9.3	11/14	-	-	19.3	-
	5	17	29	8/11	9	-	13/16	12	-	X/Y	10/12	-	13/15	17/18/19	12/13	9.3	11/14	-	-	19.3	-
2ARE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	13/15	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	13/15	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	8	-	-	-	-	-	X	-	-	13/15	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	26	-	-	-	-	-	-	X	18	-	13/15	-	-	-	-	-	16.3	-	-
	5	-	26	8	-	-	-	-	-	X	18	-	13/15	-	-	-	-	-	16.3	-	-
5ARE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	X/Y	13	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	11	-	X/Y	12/13	-	13	-	-	-	11	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	11	-	X/Y	12/13	-	12/13	-	15.2	-	11	-	-	-	-
	4	25	-	-	-	11	14	11	-	X/Y	8/12/13	17	13	-	15.2	-	11	-	-	-	-
	5	25	-	-	-	11	14	11	-	X/Y	8/12/13	17	12/13	-	15.2	-	11	-	-	-	-
6ARE	1	17	28	12/13	-	-	11/14	10/12	19	X/Y	14	15/16	11/13	-	13/14	-	10/11	17	11	-	-
	2	17	28	12/13	-	-	11/14	10/12	19/23	X/Y	14	15/16	11/13	-	13/14	9.3	10/11	17	11	-	-
	3	17	28	12/13	-	-	11/14	10/12	19/23	X/Y	14	15/16	11/13	-	13/14	9.3	10/11	17/18	11	-	-
	4	17	28/30.2	12/13	-	12	11/14	10/12	19/23	X/Y	14	15/16	11/13	-	13/14	7/9.3	10/11	17/18	11	20	-
	5	17	28/30.2	12/13	-	12	11/14	10/12	19/23	X/Y	14	15/16	11/13	-	13/14	7/9.3	10/11	17/18	11	20	-

*Los siguientes alelos no aparecen en la base de datos de población española actual empleada: El alelo 19 del marcador D22S1045, el alelo 26 del marcador D2S211, el alelo 8 del marcador D10S1248 y el alelo 10 del marcador vWA.

***Tabla 68**. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de Los Areneros*

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
7ARE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-
	2	17	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-
	3	17	-	-	-	-	13/15	-	-	X	13	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-
	4	17	-	-	-	-	15	-	-	X/Y	-	10	-	17	13	-	-	-	-	-	-
	5	17	-	-	-	-	13/15	-	-	X/Y	13	10	-	17	13	-	-	-	-	-	-
8ARE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	14	18	12	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	14	18	12	-	-	-	-	-	-
9ARE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	24/25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	24/25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20ARE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13/14	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13/14	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	14/15	11	-	Y	-	-	13/14	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13/14	18/19	-	-	11/12	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	14/15	11	-	Y	-	-	13/14	18/19	-	-	11/12	-	-	-	-
24ARE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Los siguientes alelos no aparecen en la base de datos de población española actual empleada: El alelo 19 del marcador D22S1045, el alelo 26 del marcador D2S211, el alelo 8 del marcador D10S1248 y el alelo 10 del marcador vWA.*

***Tabla 68 (continuación)**. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de Los Areneros*

INDV 1	INDV 2	ALELOS COMPARTIDOS	MISMO mtDNA	RELACIÓN	*LR CRIT 1	*LR CRIT 2	*LR CRIT 3	*LR CRIT 4	*LR CRIT 5
1ARE	7ARE	0 / 0 / 4 / 2 / 4	No	Mismo individuo	128.944 (0.9923)	7.95114 (0.8883)	2.99443 (0.7497)	0 (0)	0 (0)
1ARE	8ARE	0 / 2 / 1 / 2 / 2	No	Mismo individuo	0 (0)	107682 (0.99999)	3931.61 (0.9997)	26.052 (0.9630)	26.052 (0.9630)
1ARE	8ARE	0 / 2 / 1 / 2 / 2	No	Hermanos	0 (0)	20547.2 (0.9999)	71.6714 (0.9862)	51.5868 (0.9809)	51.5868 (0.9809)
1ARE	8ARE	0 / 2 / 1 / 2 / 2	No	Medio hermanos	0 (0)	143.343 (0.9930)	71.9214 (0.9863)	112.524 (0.9912)	112.524 (0.9912)
7ARE	8ARE	0 / 0 / 0 / 0 / 0	No	Mismo individuo	0 (0)	128.944 (0.9923)	128.944 (0.9923)	17.3278 (0.9454)	17.3278 (0.9454)
7ARE0	20ARE	0 / 0 / 1 / 0 / 1	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	128.944 (0.9923)	4.73985 (0.8258)
8ARE	20ARE	0 / 0 / 0 / 2 / 2	No	Hermanos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	25830.9 (0.99999)	25830.9 (0.99999)
8ARE	20ARE	0 / 0 / 0 / 2 / 2	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5010.22 (0.9998)	5010.22 (0.9998)
8ARE	20ARE	0 / 0 / 0 / 2 / 2	No	Medio hermanos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	216.039 (0.9954)	216.039 (0.9954)
1ARE	2ARE	0 / 0 / 2 / 2 / 3	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6307.81 (0.9998)	13459.062 (0.9999)
2ARE	6ARE	0 / 0 / 1 / 1 / 1	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	976.735 (0.9990)	139.3816 (0.9929)

Tabla 69. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Areneros, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias.

Del mismo modo que en el caso anterior en este se muestran también únicamente aquellas relaciones para las que se obtuvo una mayor probabilidad, mostrándose en la tabla únicamente aquellas relaciones que para alguno de los criterios mostrara al menos un LR de 100.

5.3.3.3 La Cueva de la Revilla

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
1REV	1	22/25	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	22/25	-	8/13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	22/25	-	8/13	-	-	-	10	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	22/25	-	8/13	10/14	-	11.2/17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	22/25	-	8/13	10/14	-	11.2/17	10	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2REV	1	17/19	30	8/9	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-
	2	17/19	30	8/9	-	-	11/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-
	3	17/19	30	8/9	-	-	11/16	10	-		-	-	13	-	18.2	-	14	-	-	-	-
	4	17/19	30	8/9	14	-	11/16	10/13	20/21	X/Y	-	17	13	17/18	-	-	14	-	-	-	-
	5	17/19	30	8/9	14	-	11/16	10/13	20/21	X/Y	-	17	13	17/18	18.2	-	14	-	-	-	-
3REV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
4REV	1	20	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	20	-	-	-	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	20	-	-	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	20	-	-	10/14	-	-	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	20	-	-	10/14	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Los siguientes alelos no aparecen en la base de datos de población española actual empleada: El alelo 18.2 del marcador D19S433, el alelo 11.2 del marcador D18S51 y el alelo 16 de FGA.*

Tabla 70. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de la Revilla.

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
5REV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6REV	1	21/23	-	11/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	21/23	-	11/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	21/23	28/29	11/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	21/23	29	11/12	10/14	-	-	10/12	-	-	-	15/16	13/14	17	-	-	11/15	-	-	-	-
	5	21/23	28/29	11/12	10/14	-	-	10/12	-	-	-	15/16	13/14	17	-	-	11/15	-	-	-	-
7REV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8REV	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 70 (continuación). ***Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de la Revilla.***

INDV 1	INDV 2	ALELOS COMPARTIDOS	MISMO mtDNA	RELACIÓN	*LR CRIT 1	*LR CRIT 2	*LR CRIT 3	*LR CRIT 4	*LR CRIT 5
1REV	2REV	1 / 0 / 3 / 3 / 3	No	Hermandad	0 (0)	0 (0)	1.63106 (0.6199)	116.681 (0.9915)	140.391 (0.9929)
1REV	2REV	1 / 0 / 3 / 3 / 3	No	Medios hermanos	1.12666	0 (0)	1.6564 (0.6235)	292.606 (0.9966)	425.216 (0.9977)
1REV	2REV	1 / 0 / 3 / 3 / 3	No	Primos	1.22	0 (0)	1.51798 (0.6029)	104.657 (0.9905)	128.372 (0.9923)
1REV	4REV	0 / 0 / 0 / 2 / 2	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2166.52 (0.9995)	2166.52 (0.9995)
2REV	5REV	0 / 0 / 0 / 0 / 0	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	265.472 (0.9962)	265.472 (0.9962)
4REV	6REV	0 / 0 / 0 / 2 / 2	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1526.8 (0.9993)	1526.8 (0.9993)

Tabla 71. Relaciones familiares más probables, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias.

5.3.3.4 Los Cercados

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
1CER	1	18	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	18	-	-	-	-	-	11	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	18	-	-	-	-	-	-	20	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	18/19	-	-	12/14	-	-	11	-	X	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-
	5	18/19	-	-	12/14	-	-	11	20	X	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-
2CER	1	16/17	30/31.2	12	8/11	11/12	14/18	10	21/24	X	13	16	10/15	16/17/18	13	-	10/13	12/16	18.3	-	-
	2	16/17	30/31.2	12	8/11	11/12	14/18	10	21/24	X	13	16	10/15	16/17/18	13	9	10/13	12/16	18.3	-	-
	3	16/17	30/31.2	12	8/11	11/12	14/18	10	21/24	X	13	16	10/15	16/17/18	13	9/9.3	10/13	12/16	17.3/18.3	-	-
	4	16/17	30/31.2	12	8/11	11/12	14/18	10	21/24	X	13	16	10/15	16/17/18	13	9/9.3	10/13	12/16	17.3/18.3	22/23	-
	5	16/17	30/31.2	12	8/11	11/12	14/18	10	21/24	X	13	16	10/15	16/17/18	13	9/9.3	10/13	12/16	17.3/18.3	22/23	-
3CER	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	17/18/20	-	-	9.2/10/14	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	17/18/20	-	-	9.2/10/14	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4CER	1	17	-	12	-	-	18	10	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	17	-	12	-	-	14/18	10	-	X	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-
	3	17	-	12	-	12	14/18	10	-	X	13	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-
	4	17	30/31.2	12	-	-	14/18	10	-	X	-	-	-	18	-	-	13	-	-	-	-
	5	17	30/31.2	12	-	12	14/18	10	-	X	13	-	-	18	-	-	13	-	-	-	-

***Tabla 72**. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de Los Cercados.*

INDV 1	INDV 2	ALELOS COMPARTIDOS	MISMO mtDNA	RELACIÓN	*LR CRIT 1	*LR CRIT 2	*LR CRIT 3	*LR CRIT 4	*LR CRIT 5
1CER	3CER	0 / 1 / 0 / 3 / 3	¿?	Mismo individuo	0 (0)	10.9886 (0.99999)	10.9886 (0.99999)	50.9556 (0.9807)	338.564 (0.9971)
1CER	3CER	0 / 1 / 0 / 3 / 3	¿?	Hermandad	0 (0)	4.66881 (0.8236)	4.66881 (0.8236)	149.94 (0.9934)	283.008 (0.9965)
1CER	3CER	0 / 1 / 0 / 3 / 3	¿?	Medios hermanos	0 (0)	2.16074 (0.6836)	2.16074 (0.6836)	78.5361 (0.9874)	141.186 (0.9930)
2CER	4CER	4 / 5 / 7 / 7 / 9	Sí*[2]	Mismo individuo	68.97 (0.9857)	82575.5 (0.999987)	24361.8 (0.999958)	5.91065e+010 (0.9999999999)	1.74379e+010 (0.9999999999)
2CER	4CER	4 / 5 / 7 / 7 / 9	Sí*[2]	Hermandad	299.805 (0.9966)	11146.5 (0.999910)	53560.5 (0.999981)	4.72003e+006 (0.999999)	2.26805e+007 (0.9999999)
2CER	4CER	4 / 5 / 7 / 7 / 9	Sí*[2]	Medios hermanos	66.9915 (0.9853)	448.078 (0.9977)	1251.98 (0.99920)	67016.1 (0.999985)	187251 (0.99999)
2CER	4CER	4 / 5 / 7 / 7 / 9	Sí*[2]	Primos	15.867 (0.9407)	61.8882 (0.9840)	111.913 (0.99099)	3473.47 (0.99971)	6282.93 (0.99984)

*[2]*Los individuos 2CER y 4CER comparten el mismo perfil de ADN mitocondrial en lo relativo a HVI, ya que HVII no fue amplificable a partir de 4CER.*

**¿?* *No es posible confirmar que presenten el mismo tipo de ADN mitocondrial ya que no se pudieron validar los resultados de ADN mitocondrial en el individuo 3CER.*

Tabla 73. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Cercados, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias.

En este yacimiento, tal como se describe en el punto 2.1.1.1 de la introducción, se halló un complejo ritual funerario en el que se encontraron tres cráneos definidos antropológicamente como femeninos y una maxila que por su estado de conservación resultaba complicada de asignar a ninguno de los tres cráneos. Por ello, en este caso concreto, además de la búsqueda de relaciones de parentesco entre los individuos allí exhumados, también se plantea la cuestión de determinar el número real de individuos, si realmente la maxila pertenece a un cuarto individuo o pertenece al mismo individuo que uno de los tres cráneos hallados. De modo que nos planteamos el objetivo de definir el número de individuos, así como asignar la maxila a alguno de los cráneos y finalmente determinar la posible existencia de relaciones de parentesco.

5.3.3.5 Los Rompizales

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D13S317	D7S820	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
1RPZ	1	-	-	8	-	-	-	11/12	21	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	8/11	-	-	-	11/12	21	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	25	28	8/11	-	-	14	11/12	21/22	X/Y	-	-	13	15	12	-	-	-	-	-	-
	4	20/25	-	8/11	-	-	11/14	11/12	21/22	X/Y	-	-	14	15/16	14	-	10	-	-	-	-
	5	20/25	28	8/11	-	-	11/14	11/12	21/22	X/Y	-	-	13/14	15/16	12/14	-	10	-	-	-	-
2 RPZ	1	17/20	31/33.2	9/11	-	9	13/16	12	19/20	X	13/15	16/17	12/15	15/16/18	13/15	9.3	14	14/18	16.3	16/18	-
	2	17/20	31/33.2	9/11	-	9/11	13/16	12	19/20	X	13/15	16/17	12/15	15/16/18/19	13/15	9.3	14	14/18	16.3	16/18	-
	3	17/20	31/33.2	9/11	10/12	9/11	13/16	12	19/20	X	13/15	16/17	12/15	15/16/18/19	13/15	9.3	14	14/18	16.3	16/18	-
	4	17/20	31/33.2	9/11	10	9/11	13/16	7/9/12	19/20	X	13/15	16/17	12/15	15/16/18/19	13/15	9.3	14	14/18	16.3	16/18	-
	5	17/20	31/33.2	9/11	10/12	9/11	13/16	7/9/12	19/20	X	13/15	16/17	12/15	15/16/18/19	13/15	9.3	14	14/18	16.3	16/18	-
3 RPZ	1	-	-	-	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-
4RPZ	1	-	-	-	-	-	12/13	12	-	X/Y	-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	12/13	12	-	X/Y	-	-	-	15	15	-	11	-	-	-	-
	3	25	-	8/12	-	-	12/13	12	-	X/Y	-	-	-	15	15	-	11	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	12/13	12	23	X/Y	15	-	10	9/15/16	15	-	10/11	-	-	-	-
	5	25	-	8/12	-	-	12/13	12	23	X/Y	15	-	10	9/15/16	15	-	10/11	-	-	-	-
5RPZ	1	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	11	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	9	-	-	-	11	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	11	-	X	7	-	13	15	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	9	-	-	-	11	-	X	7	-	13	15	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 74. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de los Rompizales.

INDV 1	INDV 2	ALELOS COMPARTIDOS	MISMO mtDNA	RELACIÓN	*LR CRIT 1	*LR CRIT 2	*LR CRIT 3	*LR CRIT 4	*LR CRIT 5
1RPZ	3RPZ	0 / 0 / 0 / 0 / 1	No*[2]	Hermandad	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2.87907 (0.7422)
1RPZ	3RPZ	0 / 0 / 0 / 0 / 1	No*[2]	Medios hermanos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3.12907 (0.7578)
1RPZ	3RPZ	0 / 0 / 0 / 0 / 1	No*[2]	Primos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2.06454 (0.6737)
1RPZ	3RPZ	0 / 0 / 0 / 0 / 1	No*[2]	Primos segundos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.26613 (0.5587)
1RPZ	4RPZ	2 / 2 / 4 / 4 / 5	No	Hermandad	1.04348 (0.5106)	1.04348 (0.5106)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1RPZ	4RPZ	2 / 2 / 4 / 4 / 5	No	Medios hermanos	1.29348 (0.5640)	1.29348 (0.5640)	2.857 (0.7407)	0 (0)	0 (0)
1RPZ	4RPZ	2 / 2 / 4 / 4 / 5	No	Primos	1.14674 (0.5341)	1.14674 (0.5341)	2.84294 (0.7398)	0 (0)	0 (0)
1RPZ	4RPZ	2 / 2 / 4 / 4 / 5	No	Primos segundos	1.03668 (0.5090)	1.03668 (0.5090)	1.60015 (0.6154)	0 (0)	0 (0)
2RPZ	4RPZ	2 / 3 / 4 / 5 / 5	No	Hermandad	4.83103 (0.8285)	2.36881 (0.7032)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2RPZ	4RPZ	2 / 3 / 4 / 5 / 5	No	Medios hermanos	3.56505 (0.7809)	3.94175 (0.7976)	0 (0)	1.06684 (0.5165)	1.06684 (0.5165)
2RPZ	4RPZ	2 / 3 / 4 / 5 / 5	No	Primos	2.06611 (0.6738)	2.48812 (0.7133)	1.39956 (0.5832)	1.42523 (0.5876)	1.42523 (0.5876)
2RPZ	4RPZ	2 / 3 / 4 / 5 / 5	No	Primos segundos	1.22872 (0.5513)	1.32634 (0.5701)	1.16573 (0.5382)	1.16193 (0.5374)	1.16193 (0.5374)
1RPZ	5RPZ	0 / 1 / 1 / 2 / 3	No	Hermandad	0 (0)	1.08037 (0.5293)	0 (0)	0 (0)	1.05562 (0.5135)
1RPZ	5RPZ	0 / 1 / 1 / 2 / 3	No	Medios hermanos	0 (0)	1.33037 (0.5708)	0 (0)	0 (0)	2.04619 (0.6717)
1RPZ	5RPZ	0 / 1 / 1 / 2 / 3	No	Primos	0 (0)	1.16519 (0.5381)	0 (0)	0 (0)	1.46578 (0.5944)
1RPZ	5RPZ	0 / 1 / 1 / 2 / 3	No	Primos segundos	0 (0)	1.0413 (0.5102)	0 (0)	0 (0)	1.1063 (0.5252)
2RPZ	5RPZ	0 / 0 / 1 / 1 / 2	No	Medios hermanos	0 (0)	0 (0)	2.22181 (0.6896)	0 (0)	0 (0)
2RPZ	5RPZ	0 / 0 / 1 / 1 / 2	No	Primos	0 (0)	0 (0)	2.01135 (0.6679)	0 (0)	0 (0)
2RPZ	5RPZ	0 / 0 / 1 / 1 / 2	No	Primos segundos	0 (0)	0 (0)	1.34105 (0.5728)	0 (0)	0 (0)

Tabla 75. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Los Rompizales, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias.

Únicamente se observa una diferencia en una mutación entre los dos haplotipos mitocondriales. Pero, sin embargo únicamente se ha amplificado HV1 en el individuo 3RPZ por lo que se desconoce si comparten la región HVII.

En el caso de los Rompizales a diferencia del resto, en la tabla de resultados se muestran relaciones familiares que han proporcionado resultados con LRs inferiores a 100. Esto es debido a que no se ha encontrado ningún tipo de relación que aporte mayor fiabilidad, lo cual parece indicar que los individuos no comparten ningún parentesco (*Tabla 75*).

5.3.3.6 Tordillos

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
1TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	17	12	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12	17	12	9	14	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	13	17	12/13	-	-	-	-	22	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13	17	12/13	9	14	-	-	22	-
2 TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	13/15	17	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	13/15	17	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	13/15	17	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13/15	17	-	-	11.3	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13/15	17	-	-	11.3	-	-	-	-
3 TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13/14	-	-	-	11	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	12/13/14	-	-	-	11	-	-	-	-
4 TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	13	8/18	12/13	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	13	8/18	12/13	-	-	-	-	-	-

**Los siguientes alelos no aparecen en la base de datos de población española actual empleada: El alelo 8 del marcador D22S1045 no existe en la base de datos de la población Española actual.*

Tabla 76.. Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de Tordillos.

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
5TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	8/14	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	10/13	-	12	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	X/Y	-	-	8/10/13/14	-	12	-	-	-	-	-	-
6 TOR	Crit. 1	-	-	-	-		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-		X	-	-	13	-	-	-	-	15	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-		X/Y	-	-	13	-	-	-	-	15	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-		X	-	-	13	-	-	-	-	15	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-		X/Y	-	-	13	-	-	-	-	15	-	-	-
7 TOR	Crit. 1	-	-	-	-		X	-	-	13/16	17	-	-	11/11.3	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-		X	-	-	13/16	17	-	-	11/11.3	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-		X/Y	16/18	-	13/16	17	-	-	11/11.3	14/15	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-		X	-	-	13/16	17	-	-	11/11.3	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-		X/Y	16/18	-	13/16	17	-	-	11/11.3	14/15	-	-	-
8 TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	13	16	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 76 (continuación). Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de Tordillos.

INDIVIDUO	CRITERIO	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	FGA	AMEL	D10S1248	vWA	D8S1179	D22S1045	D19S433	TH01	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33
9TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-
10TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	12	16	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	12	16	-	-	-	-	-	-	-
11TOR	Crit. 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	24.2	-	-	-	X/Y	-	-	10/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	24.2	-	-	-	X/Y	-	-	10/13	-	-	-	-	-	-	-	-
12TOR	Crit. 1	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 2	-	-	-	-		Y	-	14/16	12/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 3	-	-	-	-		X/Y	-	14/16	12/13	18/19	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 4	-	-	-	-		Y	-	14/16	12/13	-	-	-	-	-	-	-	-
	Crit. 5	-	-	-	-		X/Y	-	14/16	12/13	18/19	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 76 (continuación). Perfiles consensuados según los 5 criterios establecidos para los individuos analizados procedentes del yacimiento de La cueva de Tordillos.

INDV 1	INDV 2	ALELOS COMPARTIDOS	MISMO mtDNA	RELACIÓN	*LR CRIT 1	*LR CRIT 2	*LR CRIT 3	*LR CRIT 4	*LR CRIT 5
1TOR	2TOR	0 / 1 / 1 / 2 / 2	No	Mismo individuo	0 (0)	173.893 (0.9942)	0 (0)	13.674 (0.9319)	0 (0)
1TOR	4TOR	0 / 0 / 0 / 2 / 2	*2	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	666.094 (0.9985)	27.2184 (0.9646)
1TOR	7TOR	0 / 1 / 1 / 2 / 2	No	Mismo individuo	0 (0)	173.893 (0.9943)	7.923114 (0.8879)	67.0949 (0.9853)	1.94529 (0.6604)
1TOR	9TOR	0 / 0 / 0 / 0 / 0	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	128.944 (0.9923)	0 (0)	128.944 (0.9923)
2TOR	7TOR	2 / 2 / 2 / 3 / 3	Sí	Hermandad	34.737 (0.9720)	34.737 (0.9720)	34.737 (0.9720)	105.391 (0.9906)	105.391 (0.9906)
2TOR	9TOR	0 / 0 / 0 / 0 / 0	No	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	128.944 (0.9923)	0 (0)	128.944 (0.9923)
4TOR	8TOR	0 / 0 / 0 / 1 / 1	*2	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1023.38 (0.9990)
4TOR	9TOR	0 / 0 / 0 / 0 / 1	*2	Mismo Individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	107682 (0.99999)
4TOR	9TOR	0 / 0 / 0 / 0 / 1	*2	Hermanos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	20547.2 (0.99995)
4TOR	9TOR	0 / 0 / 0 / 0 / 1	*2	Medio hermanos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	143.343 (0.9930)
4TOR	12TOR	0 / 0 / 0 / 1 / 2	*2	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	127.575 (0.9922)
7TOR	9TOR	0 / 0 / 0 / 0 / 0	*2	Misma persona	0 (0)	0 (0)	128.944 (0.9923)	0 (0)	128.944 (0.9923)
9TOR	12TOR	0 / 0 / 1 / 0 / 1	*2	Mismo individuo	0 (0)	0 (0)	107682 (0.99999)	0 (0)	4748.9 (0.9998)
9TOR	12TOR	0 / 0 / 1 / 0 / 1	*2	hermanos	0 (0)	0 (0)	20547.2 (0.99995)	0 (0)	71.9214 (0.9863)
9TOR	12TOR	0 / 0 / 1 / 0 /1	*2	Medio hermanos	0 (0)	0 (0)	143.343 (0.9930)	0 (0)	71.9214 (0.9863)

** En las columnas se indica el LR de la relación acompañado, entre paréntesis, por la probabilidad en tanto por uno de que tenga lugar esa relación. *2Alguno de los individuos implicados en la relación no presenta resultados válidos de ADN mitocondrial.*

***Tabla 77**. Relaciones familiares más probables en el yacimiento de Tordillos, estimadas mediante la herramienta "Blind Search" del software Familias.*

5.3.4 CONSIDERACIONES SOBRE EL ANÁLISIS DE STRs

Para poder evaluar de un modo más rápido y visual la eficiencia de cada uno de los criterios se ha creado la siguiente tabla (*Tabla 78*), en la cual podemos observar el número de marcadores que se han podido establecer en función de cada criterio empleado para cada uno de los individuos analizados. De este modo podemos valorar cual es el mejor criterio de los 5 propuestos. En la última fila de cada columna, se puede visualizar la media de cada uno de ellos.

Posteriormente, se ha querido evaluar el efecto directo de la selección de un criterio u otro, no ya sobre los perfiles en sí, sino sobre la determinación de relaciones familiares concretas. Por ello se han considerado algunas variables importantes a tener en cuenta como el valor del LR alcanzado empleando cada criterio, el número de alelos en común entre los dos individuos relacionados así como el número de falsos positivos detectados cuando se ha utilizado cada uno de los criterios (Todos estos datos se resumen la *Tabla 79*).

En la primera columna de la *tabla 79* se consideran aquellas relaciones para las cuales se han obtenido LRs más elevados (según los datos extraídos de las tablas anteriores de establecimiento de relaciones de parentesco). En cada una de las siguientes 5 columnas (de la columna 2 a la columna 6) se asignan valores del 1 al 5 a cada uno de los criterios en función del valor relativo del LR obtenido para esa relación concreta, siendo 5 el valor que representa una mayor probabilidad o LR y 1 el menor. Otro factor que se ha tenido en cuenta para evaluar la calidad de cada uno de los criterios, no es solamente el LR obtenido, sino también cómo se ha obtenido ese LR, es decir, se ha considerado de gran importancia conocer a partir de cuántos alelos en común en cada individuo se ha establecido el LR, para ello, en la séptima columna se indica el número de alelos coincidentes en los dos individuos que se han tenido en cuenta para calcular el mayor LR obtenido del criterio que corresponda en cada caso. También es de vital importancia en ciertas relaciones de parentesco, que además de compartir un determinado genotipo nuclear, también se comparta el ADN mitocondrial (por ejemplo en una relación madre-hijo o en una relación de hermandad, entre otras), por ello, en la octava columna se ha indicado si el perfil de ADN mitocondrial es compartido o no por los dos individuos implicados en la relación. Como consecuencia de éste úlitmo factor (el ADN mitocondrial), en la novena columna de la *tabla 79* se señala si la relación es incompatible o no, en relación a los perfiles de ADN mitocondrial.

En las dos últimas filas, se muestra primero los valores promedio de los valores 1-5 establecidos para cada criterio, y en la última fila se indica el número de relaciones que aun presentando un LR por encima de 10000, se consideran falsas por no compartir los perfiles de ADN mitocondrial.

	NÚMERO DE MARCADORES CONSIDERADOS PARA ESTABLECER CADA PERFIL				
INDIVIDUO	CRITERIO 1	CRITERIO 2	CRITERIO 3	CRITERIO 4	CRITERIO 5
1	14	16	18	19	19
2	6	10	11	13	13
3	4	8	11	10	12
4	15	15	16	17	17
5	9	9	12	12	14
6	2	2	3	5	6
7	3	5	6	10	10
8	14	15	15	17	17
9	1	3	5	6	7
10	0	2	2	4	4
11	0	0	0	1	1
12	1	1	4	3	6
13	0	0	0	0	0
14	2	2	4	4	6
15	5	5	8	12	13
16	0	0	0	1	1
17	2	2	2	3	3
18	0	0	0	1	1
19	2	2	3	9	9
20	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0
22	2	3	3	5	6
23	17	18	18	19	19
24	0	1	1	3	3
25	5	7	9	11	12
26	4	4	10	10	11
27	18	18	19	19	19
28	1	1	1	2	2
29	4	6	8	9	11
30	1	2	3	5	6
31	1	3	6	5	7
32	3	3	3	4	4
33	2	2	3	2	3
34	0	0	0	4	4
35	0	1	2	3	3
36	1	3	3	3	3
37	4	4	6	4	6
38	0	0	1	1	2
39	0	0	1	0	1
40	0	0	2	0	2
41	0	0	0	3	3
42	0	3	4	3	4
MEDIAS	3,404761905	4,19047619	5,30952381	6,238095238	6,904761905

Tabla 78. Relación del número de alelos considerados en los perfiles de cada uno de los 42 individuos analizados, según el criterio elegido.

RELACIÓN	CRITERIO 1	CRITERIO 2	CRITERIO 3	CRITERIO 4	CRITERIO 5	ALELOS COMUNES	MISMO ADN mt	INCOMPT. ADNmt
HERMANDAD	1	3	5 (LR>20000)	2	4	10	SI	NO
MEDIO-HERMANOS	1	2	5	3	4	10	SI	NO
HERMANDAD	1	2	3	4	5	10	SI	NO
MATERNIDAD	2	3	1	4	5 (LR>10000)	10	SI	NO
MISMO INDIVIDUO	5	3	2	1	1	0	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	5 (LR>100000)	4	2	2	2	NO	SI
HERMANDAD	1	5(LR>20000)	3	2	2	2	NO	SI
MEDIO-HERMANOS	1	5	2	3	3	2	NO	NO
MISMO INDIVIDUO	1	5	5	2	2	0	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	5	2	1	NO	SI
HERMANDAD	1	1	1	5 (LR>20000)	5 (LR>20000)	2	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	5	5	3	NO	SI
MEDIO-HERMANOS	1	1	1	5	5	3	NO	NO
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	3	5 (LR>10000)	3	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	5	3	1	NO	SI
HERMANDAD	1	1	2	3	5	4	NO	SI
MEDIO-HERMANOS	2	1	3	4	5	4	NO	NO
PRIMOS	2	1	3	4	5	4	NO	NO
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	5	5	2	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	5	5	0	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	5	5	2	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	2	1	3	5	4	NO	SI
HERMANDAD	1	2	1	3	5	4	NO	SI
MEDIO-HERMANOS	1	2	1	3	5	4	NO	NO
MISMO INDIVIDUO	1	4 (LR>1000000)	2 (LR>300000)	5 (LR>10000000)	3	8	SI	NO
HERMANDAD	1	2	3 (LR>300000)	4 (LR>300000)	5 (LR>1000000)	10	SI	NO
MEDIO-HERMANOS	1	2	3	4	5	10	NO	NO
PRIMOS	1	2	3	4	5	10	NO	NO
MISMO INDIVIDUO	1	5	1	2	1	1	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	5	2	2	SI	NO
MISMO INDIVIDUO	1	5	3	4	2	1	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	5	1	5	0	NO	SI
HERMANDAD	1	1	1	5	5	3	SI	NO
MISMO INDIVIDUO	1	1	5	1	5	0	NO	SI
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	1	5 (LR>1000)	1	¿?	NO
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	1	5(LR<100000)	1	¿?	NO
HERMANDAD	1	1	1	1	5(LR>20000)	1	¿?	NO
MEDIO-HERMANOS	1	1	1	1	5	1	¿?	NO
MISMO INDIVIDUO	1	1	1	1	5	2	¿?	NO
MISMO INDIVIDUO	1	1	5	1	5	0	¿?	NO
MISMO INDIVIDUO	1	1	5 (LR>100000)	1	5 (LR>4000)	1	¿?	NO
HERMANDAD	1	1	5 (LR>20000)	1	3	1	¿?	NO
MEDIO-HERMANOS	1	1	5	1	3	1	¿?	NO
PROMEDIOS	1,1627907	1,953488372	2,372093023	3,023255814	4,11627907			
RELACIONES FALSAS (CON LR > 10000)	0	2	0	1	2			

Tabla 79. Evaluación de los criterios para la selección de un perfil de STRs.

Periodo	Yacimiento	Nº Individuos (de partida)	Nº y porcentaje relativo de relaciones de parentescoHalladas	Nº linajes de ADN mitocondrial determinados	Nº de individuos con mismo ADN mitocondrial
Precamaniforme	Los Areneros	9	0 (0%)	7	2
	Los Cercados	4 (3)*	2 (mismo individuo y hermandad*) (50%)	2	2 o 4(2 y 2)
Bronce Antiguo	Cueva de la Revilla	8	1 (medio hermanos o primos) (12,5%)	8	0
Protoogotas I	Los Tolmos	4	1(maternidad) (25%)	3	2
	Los Rompizales	5	0 (0%)	5	0
	Tordillos	12	1 (hermandad) (8,3%)	6	4 (2 y 2)

Tabla 80. Relación del número de relaciones de parentesco establecidas así como los linajes de ADN mitocondrial observados en cada yacimiento.

5.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SEXO

5.4.1 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SEXO MOLECULAR: ANÁLISIS DE STRS Y PCR A TIEMPO REAL

En la *Tabla 81* se resumen los resultados totales relativos a la determinación del sexo. Tal como podemos observar, el análisis del gen de la amelogenina para la determinación del sexo se ha llevado a cabo en un total de 70 individuos. Para ello se ha analizado un fragmento del gen de la amelogenina mediante tres métodos diferentes; los dos primeros han consistido en la utilización de kits comerciales de amplificación de STRs autosómicos, concretamente han sido los mismos empleados durante el análisis de relaciones familiares (MiniFiler ® y NGM ® de la casa Applied Biosystems); en tercer lugar se ha realizado la amplificación del gen de la amelogenina mediante Real Time PCR utilizando primers específicos (*Alonso et al., 2003; Alonso et al., 2004*).

Tal como es posible observar en la *Tabla 81*, la eficiencia en la recuperación de información genética relativa al sexo ha sido más eficiente mediante el empleo de los kits comerciales para la amplificación de STRs, concretamente es notoriamente más efectiva la amplificación del gen de la amelogenina con el kit NGM ®. La amplificación a tiempo real (Real Time PCR) ha sido la que ha proporcionado resultados más incompletos.

Para establecer un sexo consensuado (columna 7 de la *tabla 81*) se ha tomado como válido aquel sexo que sea mayoritario entre las tres pruebas realizadas.

Además, se ha observado que del total de resultados consensuados 15 de ellos coinciden con el sexo

determinado mediante protocolos antropológicos de observación de las características óseas, frente a 7 que parecen no confirmar el diagnóstico antropológico. Los 17 restantes no pueden confirmarse, ya que o bien no se obtuvo un consenso genético, o bien las técnicas antropológicas fueron insuficientes para establecer un diagnóstico fiable.

En el gráfico de la siguiente *Figura 85,* se representa la proporción de mujeres y hombres observada en cada uno de los distintos periodos en los que se han obtenido resultados válidos de la determinación de sexo. En cualquier caso, debemos tener en cuenta que los resultados se basan únicamente en una pequeña parte de la población existente durante aquel periodo y que además se han obtenido resultados válidos solo sobre un pequeño conjunto dentro de esa pequeña parte.

YACIMIENTO	INDIVIDUO	SEXO ANTROPOLÓGICO	MINIFILER	NGM	RT PCR	CONSENSO MOLEC.	COINCIDE CON SEXO ANTROPOLÓGICO
Los Tolmos	LTB1	Mujer	XX	XX	-	XX	SI
Los Tolmos	LTB2	Indet	XX	XX	-	XX	-
Los Tolmos	LTB3	Indet	XX	XX	XX	XX	-
Los Tolmos	LTA4	Varón	XY	XY	XY	XY	SI
La Requejada	LR1	Mujer	-	-	-	-	-
La Requejada	LR2	Varón	-	-	-	-	-
La Requejada	LR3	Indet	-	-	-	-	-
El Cerro	1ELC	Indet	-	-	-	-	-
El Cerro	2ELC	Mujer	-	-	-	-	-
El Cerro	3ELC	Varón	XY	-	-	XY	SI
Los Areneros	1ARE	Indet	XY	XY	-	XY	-
Los Areneros	2ARE	Indet	XX	XX	-	XX	-
Los Areneros	5ARE	Indet	XX / XY	XY	-	XY	-
Los Areneros	6ARE	Indet	XY	XY	XX	XY	-
Los Areneros	7ARE	Indet	-	XY	-	XY	-
Los Areneros	8ARE	Indet	-	XY	-	XY	-
Los Areneros	9ARE	Indet	-	XY	-	XY	-
Los Areneros	20ARE	Indet	-	XY	XX	-	-
Los Areneros	24ARE	Indet	-	-	-	-	-
La Revilla	1REV	Mujer	-	XY	-	XY	NO
La Revilla	2REV	Varón	XX	XY	-	-	-
La Revilla	3REV	Mujer	XX	-	-	XX	SI
La Revilla	4REV	Varón	-	XY	-	XY	SI
La Revilla	5REV	Indet	-	-	XY	XY	-
La Revillavilla	6REV	Varón	-	XY	-	XY	SI
La Revillavilla	7REV	Indet	-	-	XX	XX	-
La Revillavilla	8REV	Indet	-	-	-	-	-
Los Cercados	1CER	Mujer	XX / XY	XX	Sin resultado	XX	SI
Los Cercados	2CER	Mujer	XX	XX	XX	XX	SI
Los Cercados	3CER	Mujer	XX	-	-	XX	SI
Los Cercados	4CER	Mujer	XX	XY*	XY*	XY*	NO* (posible contaminación)

Los Rompizales	1RPZ	Varón	XY	XY	XY	XY	SI		
Los Rompizales	2RPZ	Varón	XX	XX	-	XX	NO		
Los Rompizales	3RPZ	Mujer	-	XY	-	XY	NO		
Los Rompizales	4RPZ	Varón	XY	XY	-	XY	SI		
Los Rompizales	5RPZ	Indet	XX	XY	-	-	-		
Tordillos	1TOR	Indet	-	XY	-	XY	-		
Tordillos	2TOR	Indet	-	XY	-	XY	-		
Tordillos	3TOR	Varón	-	XY	-	XY	SI		
Tordillos	4TOR	Varón	-	XY	-	XY	SI		
Tordillos	5TOR	Varón	-	XY	-	XY	SI		
Tordillos	6TOR	Indet	-	XY	-	XY	-		
Tordillos	7TOR	Varón	-	XY	-	XY	SI		
Tordillos	8TOR	Mujer	-	-	-	-	-		
Tordillos	9TOR	Mujer	-	XY	XY	XY	NO		
Tordillos	10TOR	Mujer	-	-	-	-	-		
Tordillos	11TOR	Indet	-	XY	-	XY	-		
Tordillos	12TOR	Indet	-	XY	-	XY	-		
El Juncal	1JUN	Varón	No analizado	No analizado	-	-	-		
El Mirador	1MIR	Mujer	XX	Sin resultado	-	-	-		
Pajares Adaja	1PAD	Varón	No analizado	No analizado	-	-	-		
El Tomillar	4BTOM	Varón	-	Sin resultado	-	-	-		
El Tomillar	5BTOM	Varón	-	XX	-	XX	NO		
El Tomillar	6BTOM	Varón	-	-	-	-	-		
El Tomillar	7BTOM	Indet	-	XX	-	XX	-		
Canto Blanco	1CB	Varón	No analizado	No analizado	-	-	-		
Santa Cruz	1CAB	Varón	No analizado	No analizado	-	-	-		
Rivas	1RV	Varón	No analizado	No analizado	-	-	-		
Tablada	1TR	Varón	XY	-	XX	-	-		
Tablada	2TR	Mujer	-	-	-	-	-		
Tablada	3TR	Indet.	-	-	-	-	-		
TabladaRudrón	4TR	Indet	-	-	-	-	-		
Perro Alto	1PA	Varón	No analizado	No analizado	-	-	-		
La Huelga	1HU	Mujer	No analizado	No analizado	-	-	-		
Santioste	1ST	Mujer	No analizado	No analizado	-	-	-		
El Cementerio	1QUO	Indet	No analizado	No analizado	-	-	-		
Trascabañas	1TC	Mujer	No analizado	No analizado	XY	XY	NO		
Fuente Mora	1FM	Varón	-	-	-	-	-		
Fuente Mora	2FM	Indet	-	-	-	-	-		
Fuente Mora	3FM	Mujer	-	-	-	-	-		
	TOTAL		21	36	12	39	15 SI (38,46%)	7 NO (17,95%)	17 – (43,6%)

Tabla 81. Resultados obtenidos tras el análisis del sexo molecular mediante tres técnicas diferentes: análisis de STRs con dos kits comerciales y mediante Real Time PCR. En la segunda columna se muestra el sexo determinado antropológicamente, la sexta columna muestra un consenso molecular, indicando en la séptima si el resultado molecular es coincidente o no con el antropológico.. Cuando no hubo resultado se indica con un guión.

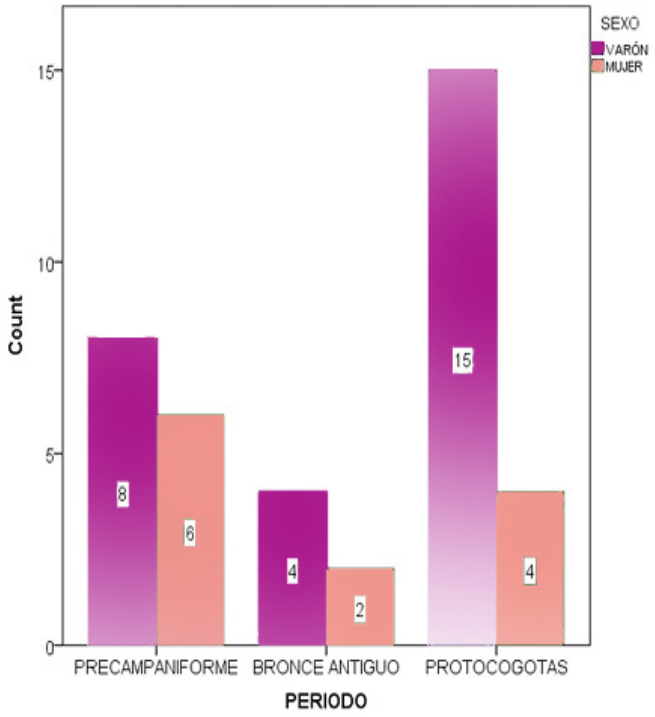
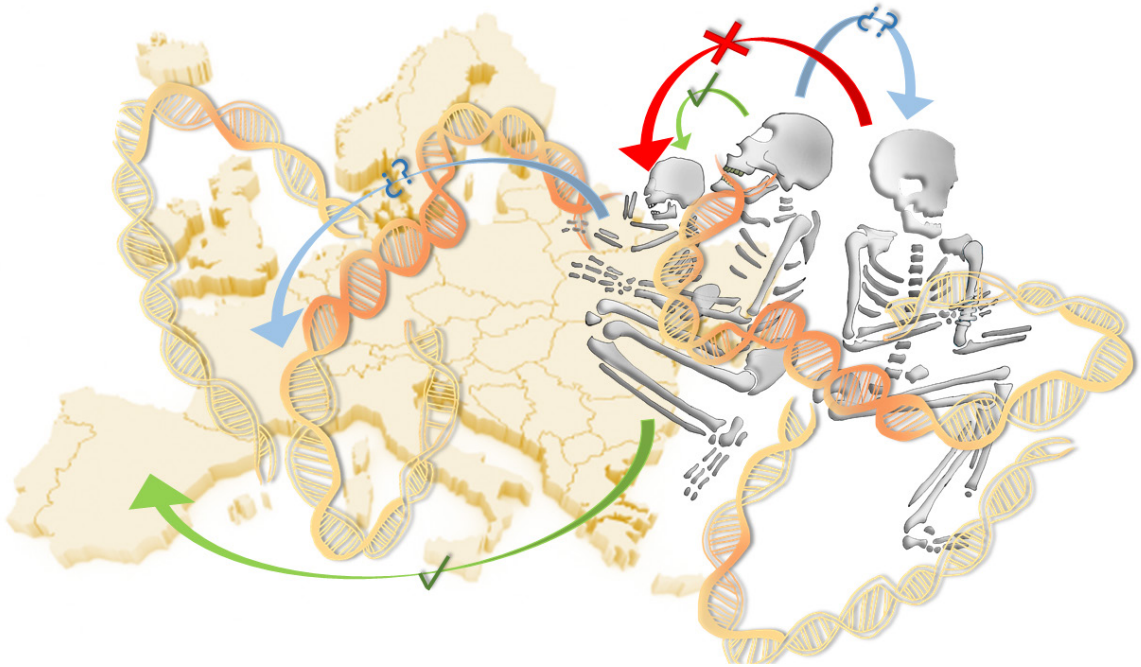


Figura 85. Proporción de varones y mujeres en cada periodo analizado.

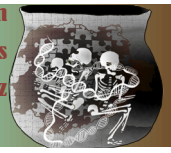
DISCUSIÓN



La verdad es que el camino largo es el más fácil.
Pero es más largo... Mucho más largo.

(Big Fish)

Tim Burton



6 DISCUSIÓN

6.1 CONSIDERACIONES GENERALES

El objetivo principal de esta tesis consiste en caracterizar genéticamente las poblaciones de estudio, desde finales del Calcolítico hasta finales de la cultura Cogotas I, pudiendo aportar información relevante sobre los periodos analizados que no sería posible obtener por otro medio que no sea el análisis genético.

Por ello, tanto los objetivos como los resultados y del mismo modo a partir de ahora la discusión de este trabajo, se subdividen en cuatro ejes fundamentales. El primero de ellos trata de evaluar la eficiencia de los procedimientos experimentales desarrollados respecto de la obtención de resultados sólidos, centrándonos de forma más concreta en las características macroscópicas de las muestras seleccionadas, y valorando su influencia en los resultados así como en la aparición de ciertos fenómenos tales como la contaminación, el daño molecular y la fragmentación de las cadenas de ADN. Además, dentro de esta evaluación procedimental también se pretende contrastar las tres metodologías empleadas para la extracción de ADN, así como la elaboración de criterios claros para el establecimiento de perfiles de STRs autosómicos a partir de perfiles parciales. El segundo eje, quizá el más extenso, consiste en caracterizar genéticamente las poblaciones estudiadas mediante el análisis del ADN mitocondrial. El tercer eje trata sobre el estudio de posibles relaciones familiares en aquellos yacimientos que presentan un interés especial en este sentido, principalmente a partir de inhumados en enterramientos múltiples o colectivos. Finalmente, el cuarto punto versa sobre la determinación del sexo de los individuos, la valoración de las metodologías para su determinación, así como el establecimiento de patrones demográficos y de comportamiento social respecto del sexo.

En este capítulo se discuten y analizan punto por punto los objetivos planteados en la presente tesis doctoral (ver capítulo 3, Objetivos).

6.2 DISCUSIÓN SOBRE LOS OBJETIVOS METODOLÓGICOS

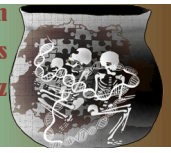
6.2.1 Evaluación De La Selección Muestral Y De Los Principales Problemas En La Obtención De Resultados

En la *figura 48* podemos observar que se han obtenido resultados sólidos a partir de 114 muestras, de las 172 totales (66,27 % de éxito). En esa misma figura se pueden visualizar las diferentes causas de fracaso en el 33,72 % de los casos restantes. Para valorar los resultados y poder avanzar en el conocimiento del estudio del ADN antiguo, es fundamental conocer las causas del fracaso, las razones por las que se obtuvieron resultados negativos en 58 muestras procedentes de 33 individuos.

Para ello, desde el comienzo del desarrollo de esta tesis, se han evaluado distintas características que podrían influir en el éxito o fracaso en la recuperación de ADN endógeno a partir de las muestras de origen arqueológico. Así, se han tomado en consideración la antigüedad de la muestra, la edad y el sexo del individuo, y las características macroscópicas de las muestras, así como la naturaleza del tejido analizado. A continuación se procederá a evaluar cada una de estas características evaluando la eficiencia en la obtención de resultados en función de cada una de ellas. De este modo podremos valorar cuál es la causa principal del fracaso y si es prevenible o mejorable ese resultado.

Se ha demostrado, como era de esperar dado el mayor contenido celular de ADN mitocondrial, que los resultados fueron más efectivos en el análisis de ADN mitocondrial que en el de STRs de marcadores autosómicos. De modo que la proporción de casos en los que no ha sido posible la amplificación de ADN nuclear (36.36%) es mucho mayor que el porcentaje de muestras en las que no fue posible amplificar ADN mitocondrial (el 1,429%) (*Figura 49*). Del mismo modo, el máximo tamaño amplificable de ADN mitocondrial (255 pares de bases) pudo llegar a amplificarse en el 50% de las muestras analizadas, frente al máximo tamaño de ADN nuclear (de 300 pares de bases) que pudo amplificarse en el 27.27% de las muestras analizadas. No obstante, debe tenerse en cuenta que el análisis de ADN nuclear no se llevó a cabo en todas las muestras, sino únicamente en las correspondientes a individuos exhumados de enterramientos colectivos o múltiples.

A continuación se valoran diferentes variables o características de las muestras en función de su vinculación con la obtención o no de resultados válidos, para poder valorar cuales han sido las principales causas de fracaso.



6.2.1.1 La Antigüedad De La Muestra

Teniendo en cuenta que esta tesis se realiza sobre un conjunto de muestras procedentes de una región geográfica bien definida y limitada, como es la Submeseta Norte de la Península Ibérica; que se caracteriza por una climatología mediterránea con ciertos rasgos continentales. Este clima presenta temperaturas no excesivamente frías ni excesivamente cálidas, pero sí con grandes variaciones térmicas a lo largo del año, que pueden ser desfavorables a la preservación de las cadenas de ADN. Las precipitaciones no son excesivas y se concentran en ciertos meses, por lo que probablemente la humedad en este caso no sea un problema en la preservación molecular, como ocurre en otros ambientes como los más tropicales. En general, las características ambientales de la región no parecen desfavorables para la preservación del ADN, aunque tampoco sean tan buenas como las que se observan en las regiones más nórdicas, climas en los que se ha demostrado una mejor preservación del ADN. Sin embargo, es posible que las variaciones térmicas entre invierno y verano sí que puedan constituir un problema en la conservación, y si esas variaciones son más prolongadas en el tiempo en teoría el problema sería mayor. Por esta razón se ha llevado a cabo una evaluación de cómo varía el estado de preservación del ADN a lo largo del tiempo.

Para conocer si existe un efecto claro de la antigüedad de la muestra analizada sobre los resultados obtenidos se han llevado a cabo dos tipos diferentes de análisis (que pueden consultarse en el apartado 5.1.1.1). En un primer lugar se ha valorado la edad absoluta de las muestras en función de su datación radiocarbónica, y en segundo lugar se ha considerado su antigüedad relativa, según la pertenencia de la muestra a un determinado periodo crono-cultural.

En el primer caso, se observa una mejor conservación del ADN en las muestras con edades radiocarbónicas ligeramente inferiores (la media de edad de las muestras que aportan resultados válidos es de 3518 BP, frente a los resultados no válidos que tienen una antigüedad media de 3661 BP), siendo estos resultados estadísticamente significativos (sig: 0.018) (Ver *Tabla 30*). Esto vendría a decirnos que el tiempo transcurrido desde la muerte y deposición de los individuos es un factor decisivo para la obtención de resultados sólidos. Esta observación aunque parezca contraria, es compatible con los resultados de otros autores, que afirman que las condiciones a las que está sometida la muestra después de su deposición influyen considerablemente sobre la preservación del material genético y en mayor medida que el tiempo transcurrido desde su deposición (*Lorenz y Wackernagel, 1987; Romanowski et al, 1991; Alvarez et al., 1998; Burger et al., 1999; de Torres et al., 2002; Gamba, 2011*); ya que al aumentar el tiempo transcurrido, también se incrementa el tiempo de exposición a esas condiciones ambientales.

Por otro lado, si realizamos el análisis de la eficiencia de los resultados en función de la antigüedad relativa, organizando las muestras según su pertenencia a los sucesivos periodos crono-culturales (PreCampaniforme, Campaniforme, Bronce Antiguo, Protoogotas I, Cogotas I y Soto Formativo) en lugar de hacerlo según su datación radiocarbónica, observamos que de nuevo se aprecian diferencias significativas en la preservación del ADN (*tabla 31*). De modo que, tal como se observa en la *tabla 31* presentan mayor

dificultad en la obtención de resultados válidos los conjuntos más antiguos, reduciéndose el porcentaje de fracaso en culturas posteriores en el tiempo, con la excepción del grupo de la Cultura Cogotas I, que rompe esta tendencia probablemente a causa del reducido tamaño muestral de este conjunto. En general se observa que la eficiencia de los resultados se reduce a medida que aumenta el tiempo transcurrido.

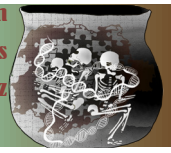
En definitiva, según los resultados obtenidos por una u otra vía, deducimos que la antigüedad de la muestra influye de manera significativa en la preservación del ADN, sin embargo no podemos descartar que la mala conservación molecular en ciertos casos no pueda deberse también a otras circunstancias peculiares de los diversos enterramientos en los que habrían intervenido factores de los que no se tiene registro, por ejemplo: mayor o menor afectación de las fosas por la humedad, ácidos húmicos, la naturaleza (arcillosa, calcárea, arenosa, etc.) del lugar exacto donde se excavó el hoyo, u otros factores no controlados.

6.2.1.2 La Edad Y El Sexo De Los Individuos

La estructura ósea y dental del ser humano presenta variaciones a lo largo de la vida, remodelándose con la edad y con los diferentes eventos que sufre el organismo. Reflejo de ello es que tal como se ha observado, la edad del individuo analizado sí influye significativamente sobre la obtención de resultados válidos, aportando resultados significativamente peores los individuos más jóvenes, concretamente los perinatales (recién nacidos o fetos a término) y el conjunto de los individuos infantiles (Ver *Tabla 32*).

Debemos considerar dos cuestiones básicas. La primera de ellas es que en el caso de los perinatales no se ha analizado ninguna pieza dental, debido a su no conservación; en el caso de los individuos infantiles las piezas dentales consisten fundamentalmente en gérmenes dentales o bien en piezas que no han finalizado el crecimiento de sus raíces. Por esta razón en la totalidad de los individuos perinatales, y en una gran parte de los individuos infantiles, hubo que optar por la selección de muestras de origen óseo en lugar de dientes. Tal como se apuntará más adelante, las piezas óseas proporcionan resultados significativamente peores que las dentales, por lo que la imposibilidad de seleccionar otro tipo de muestra es un punto clave para que, de entrada, los resultados a partir de restos infantiles y de recién nacidos o fetos a término sean peores.

La segunda cuestión a tener en cuenta es que en estos grupos de edad (perinatales e individuos infantiles) concurren piezas dentales incompletas (qué aún no han completado la formación de sus raíces) y también huesos en crecimiento. Los huesos que se encuentran en crecimiento presentan una porosidad en sus extremos epifisarios (por donde se elongan) superior a la porosidad observable en los adultos sanos (Ver como ejemplo las muestras 4ATOM1, 5ATOM1, 6ATOM1 y 8ATOM1; en la *Figura 3* del apartado Material y Métodos). Este hecho puede favorecer que este tipo de huesos en crecimiento sea más susceptible de ser contaminado por ADN exógeno o favorezca la infiltración de sustancias inhibidoras de la PCR. De hecho se han observado niveles de contaminación significativamente superiores en los individuos infantiles (el 7,4% presentan contaminación) y sobre todo en los perinatales (el 28,6% presentan contaminación)



(*Tabla 35*). En los conjuntos de juveniles y ancianos no se ha detectado contaminación alguna, y en los conjuntos de adultos y adultos jóvenes no supera el 4% de las muestras analizadas (*Tabla 35*). Así pues, es claramente observable esta relación entre la susceptibilidad a ser contaminado por ADN exógeno y la edad del individuo, que con toda seguridad está relacionado con la selección de piezas óseas en crecimiento con altos niveles de porosidad.

También se observa cierto grado de daño molecular entre los individuos perinatales (en el 50% de los casos concretamente); sin embargo las diferencias entre grupos de edad en este caso no son estadísticamente significativas (Ver *Tabla 39*), por lo que podemos decir que la edad, especialmente cuando se trata de individuos de muy corta edad, es una variable más ligada a la contaminación que al daño molecular.

En lo relativo al sexo, no se han observado diferencias significativas entre la calidad de los resultados obtenidos a partir de hombre y mujeres, por lo que podemos decir que las muestras óseas o dentales masculinas y femeninas de adultos proporcionan las mismas garantías de éxito.

6.2.1.3 Tipo De Tejido Analizado Y Tipo De Muestra

En cuanto al tipo de tejido empleado, el tejido dental aporta resultados significativamente mejores que el óseo. Esto mismo se refleja en las piezas analizadas, donde las piezas que aportan los peores resultados son las diáfisis de hueso largo u otro tipo de hueso (81% de fracaso), siendo ligeramente mejor la obtención de resultados a partir de calota craneal (50% de fracaso) (Ver *Tabla 33*). Pero en cualquier caso los resultados son mucho más satisfactorios a partir de piezas dentales (todas con porcentajes de fracaso inferiores al 33%).

Se ha observado una clara relación entre el empleo de piezas óseas y la obtención de resultados contaminados. De hecho, no se ha observado ningún caso de contaminación entre las piezas dentales, sean del tipo que sean (Ver *Tabla 36*), siendo todos los casos de contaminación, obtenidos a partir de tejido óseo y en mayor medida a partir de diáfisis de hueso largo u otro hueso (19% de las muestras de este tipo presentaban contaminación) que de calota craneal (13%) (Ver *Tabla 36*). Es probable que ese mayor nivel de contaminación se deba a que el hueso tiene una estructura más porosa que el diente, y a que éste último en condiciones normales presenta una estructura compacta formada por el esmalte que genera en la pulpa un compartimento estanco donde la infiltración de sustancias contaminantes es mucho más complicada.

Se debe apuntar, que en todos los casos la única contaminación controlable es aquella que se ha producido por parte del personal que ha manipulado las muestras tras su exhumación, no es posible sin embargo considerar posibles contaminaciones provocadas con anterioridad.

Además se debe tener en cuenta que prácticamente cualquier hueso empleado para un estudio de estas

características presenta un tamaño grande, excepto si empleamos piezas óseas como como carpos o tarsos. Ese tamaño implica tener que fragmentar el hueso y por lo tanto una mayor manipulación por parte del investigador y la utilización de herramientas de corte; implicando mayor riesgo de contaminación.

Del mismo modo, también se observan niveles de daño molecular significativamente superiores en las muestras óseas que en las dentales (Ver *Tabla 40*), siendo en este caso mayor la presencia de daño en las muestras de calota craneal (33,3% de fracaso) que en huesos largos (18.18%) (Ver *Tabla 40*).

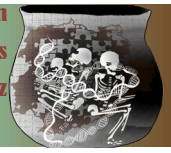
Se debe señalar que una elevada proporción de los huesos largos seleccionados proceden de individuos perinatales, y quizá esa sea la causa principal de que sufran contaminación de manera más notable que el resto de piezas, y no se perciba tanto el daño molecular, dada su ya mencionada mayor porosidad.

En cuanto a la fragmentación del ADN, a pesar de que se observan tamaños moleculares amplificados superiores en dientes (232 pares de bases en ADN mitocondrial y 180 pares de bases en ADN nuclear) que en huesos (218 pares de bases en ADN mitocondrial, y 86 pares de bases en ADN nuclear), las diferencias no son estadísticamente significativas, con lo cual parece que la fragmentación de las cadenas de ADN no depende directamente del tipo de tejido en el caso del ADN mitocondrial, aunque sí se aprecia una diferencia más notable en el nuclear (Ver *Tabla 43*).

En resumen se puede afirmar que el tejido óseo proporciona resultados significativamente peores que el tejido dental, siendo este fracaso ligado principalmente a una mayor susceptibilidad a ser contaminado y en menor medida a la fragmentación de las cadenas de ADN y daño molecular. No se debe olvidar que esta mayor susceptibilidad de contaminación probablemente venga dada porque la mayoría de piezas óseas analizadas son huesos en crecimiento (con medio-elevado grado de porosidad) pertenecientes a individuos infantiles o perinatales.

6.2.1.4 Características Macroscópicas De Las Muestras

Otra de las variables consideradas para la evaluación de las posibles causas de fracaso en la obtención de resultados, ha sido el empleo de muestras fragmentadas o con presencia de grietas. Debemos señalar que siempre que fue posible se seleccionaron piezas completas y sin fisuras (117 muestras), no pudiendo cumplir estos requisitos en un total de 46 muestras. Contando con este apunte, se ha observado que la utilización de piezas fragmentadas o con grietas influye significativamente de manera negativa en la obtención de resultados fiables (Ver *Tabla 33*). Sin embargo, no se ha podido determinar que la presencia de grietas en las muestras esté vinculada directamente de forma significativa con mayores niveles de contaminación, ni tampoco a mayores niveles de daño molecular o fragmentación de las cadenas de ADN (Ver *Tablas 37, 40 y 44). Por otr*o lado, la utilización de muestras fragmentadas, si que se ve directamente relacionada con niveles significativamente mayores de fragmentación en las cadenas de ADN *(Tabla 42).*



En cuanto a la utilización de muestras que han sido tratadas con consolidantes o pegamentos parecen no mostrar resultados significativamente peores que las que no presentan tratamientos de este tipo (Ver *Tabla 33*). Se observa cierta relación entre el uso de muestras con consolidantes y la fragmentación del ADN mitocondrial (Sig. 0,015 < 0,05) (*Tabla 45*), pero la diferencia entre los máximos tamaños medios amplificados resulta ser 20 pares de bases superior cuando la muestra presenta consolidantes que cuando está limpia. Posiblemente este resultado se vea condicionado por el reducido tamaño muestral, ya que en el caso del ADN nuclear los datos son opuestos (los máximos tamaños medios amplificables en ausencia de consolidante son 30 pares de bases mayores que en presencia de consolidante), aunque en este caso no son estadísticamente significativos (sig = 0,469).

En contraposición a lo observado con los consolidantes, se observa una relación clara entre el fracaso en la obtención de resultados y la presencia de tintas, es decir, las muestras que presentaban rótulos con bolígrafos permanentes han mostrado resultados significativamente peores que las que no los presentaban (93.33% de fracaso) (*Tablas 33).* Siendo de hecho este porcentaje de fracaso el más elevado.

En relación a lo anterior, hay que señalar que únicamente 15 muestras del total presentaban rótulos, de las cuales 14 proporcionaron resultados inválidos (93,3% de fracaso, ver *Tabla 33*). Además, la mayoría de las muestras sigladas, presentaban el rótulo con tinta indeleble cubierto por una fina capa de barniz, que suele emplearse para preservar la inscripción. No obstante, hasta aquí se desconoce si el compuesto químico que puede estar afectando a la conservación del ADN en estos casos es la tinta o el barniz. Cuando nos centramos en la causa concreta del fracaso, observamos que las muestras con rótulos no presentan mayores niveles de fragmentación de las cadenas de ADN en lo relativo al ADN mitocondrial pero si afecta de forma significativa sobre la fragmentación de STRs autosómicos (*Tabla 46*). Además, las muestras sigladas con rotuladores indelebles también presentan tanto mayores niveles de daño molecular como de contaminación que resultan estadísticamente significativos (*Tablas 37 y 40*). El primer fenómeno, el daño molecular, puede ser causado por la acción química de alguno de los compuestos de la tinta o el barniz. Sin embargo, en el caso de la mayor presencia de ADN contaminante no podemos afirmar una causa directa; sino que probablemente esa contaminación sea derivada del bajo contenido de ADN endógeno y su mala calidad, que hacen a la muestra más susceptible de ser contaminada por ADN exógeno. En cualquier caso únicamente se observa contaminación en 4 de cada 15 muestras rotuladas (el 26,6%) (*Tabla 37*); el problema del daño molecular resulta mucho más grave, afectando al 62,5% de las muestras rotuladas (*Tabla 40*). Tal como se ha mencionado, no se observa una relación directa entre la presencia de tintas y la fragmentación del ADN mitocondrial; sin embargo hay que decir que no ha sido posible la amplificación de ADN nuclear a partir de ninguna de las muestras sigladas (*Tabla 46*).

La composición química de la mayoría de rotuladores permanentes incluye compuestos tóxicos como el xileno y el tolueno, y los esmaltes presentan entre sus componentes: nitrocelulosa, formaldehido y tolueno; junto con otros en función del fabricante, entre los que figuran algunos ácidos como el trimetílico o el cítrico. En otros estudios se ha demostrado que el tratamiento con ácido acético (que en ocasiones se utiliza para limpiar depósitos calcáreos en las muestras óseas o dentales) puede causar ausencia de

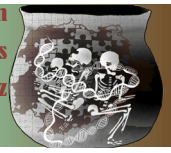
resultados en el análisis genético (*Estebaranz et al, 2008*), quizá en este caso nos encontremos ante una situación similar. En cuanto a los compuestos como el xileno o el tolueno, que aparecen tanto en tintas permanentes como en barnices y son tóxicos, se sabe que pueden alterar la estructura del ADN, generando translocaciones y crosslinks moleculares (puentes) (*Yan Sha, et al., 2014*). Este dato se ha comprobado en vivo (*Yan Sha, et al., 2014)*, pero es posible que al aplicar dichos productos directamente sobre la superficie de las muestras, que de por sí ya tienen características críticas para la conservación del ADN, esto afecte incrementando sustancialmente el daño molecular e impidiendo en muchos casos la amplificación de ADN.

Otra variable tomada en cuenta fue la coloración de las muestras estudiadas, considerando tres tipos básicos de coloración: Color claro, color anaranjado y color marrón. Siempre se trató de seleccionar muestras claras con el color lo más natural posible (entendiendo por natural que debe ser lo más similar posible al color del vivo), ya que al igual que la integridad de la muestra, la coloración también suele relacionarse con el estado de degradación de la misma y con la presencia de moléculas inhibidoras (*Kolman y Tuross, 2000*). No obstante en este caso, no se han hallado indicios de que la coloración influya de manera significativa en los resultados de manera negativa. Sin embargo, se debe anotar que el número de muestras con coloración apropiada (color claro) fue de 93, frente a tan solo 5 muestras anaranjadas y 18 con color marrón, por lo que es posible que este resultado pudiera deberse al desequilibrado reparto de los conjuntos (Ver *Tablas 33, 37, 40 y 50*).

Tal como se ha venido viendo, la mayor parte de las muestras empleadas fueron piezas dentales, por ello resulta interesante conocer algunos parámetros específicos de este tipo de muestras para poder valorar qué características proporcionan resultados más óptimos. No se observaron resultados significativamente peores asociados a la presencia de caries, sin embargo tan solo 3 muestras dentales presentaban esta característica, por lo que no podemos considerar este dato , ya que sería necesario disponer de un mayor número de muestras con caries para poder establecer resultados sólidos. En cuanto al desgaste dental como la presencia de orificios en el ápice de la raíz, que fueron características presentes en tamaños muestrales superiores a la caries (23 piezas con degaste y 26 con orificios), tampoco mostraron resultados significativamente peores a los obtenidos a partir de piezas dentales sin estas características (*Tabla 34; Tabla 41; Tabla 47; Tabla 48; Tabla 49*). Por lo tanto, no se ha podido demostrar que el desgaste dental y la presencia de orificios en el ápice de la raíz sean indicios de fracaso en el análisis de ADN antiguo.

6.2.1.5 Visión Global De La Eficiencia

En resumen, podemos decir que el porcentaje de éxito (66,27%) es elevado para tratarse de restos arqueológicos antiguos. En cualquier caso las principales causas de fracaso están ligadas al daño molecular (en 28 muestras), seguido de la ausencia de ADN (en 22 muestras) y por último, en muy baja medida (8 muestras), de la presencia de contaminación (*Figura 48*).



Finalmente, afirmamos que las muestras que han conllevado mayores problemas han sido las piezas óseas, especialmente cuando estas eran de individuos infantiles o perinatales, y estaban en crecimiento, siendo más susceptibles de sufrir daño molecular así como de ser contaminadas por ADN exógeno. Llama la atención que por lo general las características de presencia de caries, desgaste dental, coloración de la muestra y presencia de grietas o fracturas no parecen ser especialmente problemáticas en cuanto a la generación de daño molecular o infiltración de ADN contaminante, aunque las muestras fragmentadas si que muestran niveles de fragmentación del ADN significativamente superiores. Finalmente, un dato llamativo ha sido percibir el hecho de que las tintas que componen los rotuladores indelebles o los barnices empleados para proteger las inscripciones, parecen influir de manera muy negativa en los resultados obtenidos, estando íntimamente relacionadas con la obtención de resultados en los que se aprecia fragmentación y daño molecular (probablemente generado por compuestos como el tolueno o el xileno, que forman parte de manera común de este tipo de tintas, así como de los esmaltes empleados), y como consecuencia de ello hacen que las muestras con estas características también sean más susceptibles a la contaminación.

6.2.2 Evaluación De Los Métodos De Extracción

A lo largo del desarrollo de esta tesis, se han experimentado tres métodos de extracción de ADN diferentes. Se denomina método 1 al desarrollado en el laboratorio 1, basado fundamentalmente en el protocolo de Rohland y Hofreiter (*Rohland and Hofreiter, 2007; Rohland and Hofreiter, 2010*). El segundo método, método 2, fue desarrollado en el laboratorio 2, utilizando un kit comercial para la purificación de ADN de la casa *Qiagen*®. Finalmente el método 3, se ha basado en la aplicación del método 1 con ciertas modificaciones propuestas, utilizando muestras completas en lugar de polvo de hueso o diente, para poder valorar la opción de extraer ADN sin destruir la muestra, cuestión que sería de gran interés para preservar la información no genética y poder estudiar características morfológicas de la muestra tras el análisis de ADN. Entre las modificaciones en el método 3, es importante la prolongación del tiempo durante el que la muestra es sometida a la solución de lisis (ya que al no encontrarse pulverizada el acceso de la solución de lisis a su interior se verá más limitado), propuesto por otros autores (*Molhandesan et al., 2012; Hofreiter, 2012*).

El método 1 fue empleado sobre la totalidad de los individuos, el método 2 se aplicó sobre muestras de 31 individuos (de todos ellos una de las muestras fue procesada mediante el método 1 y la segunda muestra mediante el método 2). En cuanto a la prueba no destructiva (método 3), se desarrolló en 5 individuos de los cuales se disponía de 3 muestras de cada uno.

En la *tabla 51* podemos observar los resultados de la cuantificación a partir de los extractos de ADN obtenidos mediante los protocolos de extracción 1 y 2, aplicados en los dos laboratorios; y podemos apreciar que las cantidades de ADN total extraído a partir del protocolo del laboratorio 1 han sido

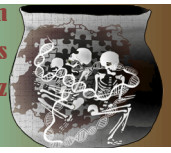
superiores a las del laboratorio 2 en el 63,3% de los casos, siendo superior en el laboratorio 2 en el 21.05%. Esto apunta hacia una clara ventaja en la utilización del método 1 frente al 2.

Debido a que en la actualidad no existe un protocolo común y estandarizado entre los distintos laboratorios de ADN antiguo, ya en trabajos anteriores se ha evaluado la eficacia del método 1 en la extracción de ADN crítico (*Gamba, 2011*). Es probable que la ventaja de esta metodología venga dada entre otras cosas por el empleo de Tiocianato de Guanidina (GuSCN). En este protocolo el Tiocianato de guanidina puede ser sustituido por NaCl, sin embargo este es menos eficiente en la eliminación de inhibidores. Los propios autores (*Rohland y Hofreiter, 2007b*) reconocen en su artículo que el GuSCN es más eficiente en la eliminación de moléculas inhibidoras de la PCR y su empleo está recomendado en aquellas muestras que se sospeche puedan presentar un gran contenido de inhibidores.

Por otro lado, el método 2 se basa en el empleo de una columna con membrana de sílica a través de la cual se hace pasar todo el volumen de la solución de lisis de manera reiterada, en un elevado número de pasos. Este proceso puede generar la saturación de la columna, impidiendo que la membrana absorba correctamente el ADN en su matriz de sílica y de este modo es posible que el método pierda eficiencia.

Otra posible razón del éxito diferencial podría haberse debido a la diferente metodología para la trituración de las muestras en uno y otro laboratorio, pero sin embargo, en el laboratorio 2 la mitad de las muestras fueron trituradas mediante el mismo protocolo del laboratorio 1 (mediante el molino refrigerado con nitrógeno líquido) y la otra mitad mediante taladro, siendo los resultados similares; lo cual apunta a que el problema de la diferencia de éxito se encuentra en el método de éxtracción propiamente dicho, no observándose diferencias a causa del diferente método de trituración de la muestra.

En cuanto a la extracción no destructiva, metodología 3, la eficiencia de los resultados está bastante repartida siendo aproximadamente igual la probabilidad de obtención de resultados válidos mediante el protocolo 3 (no destructivo) que empleando el 1 o el 2 (*Tabla 52*). El principal problema que observamos respecto de esta metodología es el aspecto macroscópico de las muestras tras su procesamiento (*Figura 50*). Es cierto que la muestra no se destruye por completo siendo reducida a polvo, como sucede en el caso de las metodologías 1 y 2, pero también es cierto que el aspecto macroscópico de la muestra no es el mismo antes y después de ser procesada (*Figura 50*). De hecho las piezas óseas muestran una coloración más clara (blanquecina), se observa reducción del grosor inicial del tejido óseo y además un incremento de la porosidad. En el caso de las piezas dentales se observan fenómenos parecidos, reduciéndose el volumen de la pieza, e incluso adquiriendo cierta apariencia translúcida en la raíz (*figura 50*). Por todo ello, es necesario decir que la apariencia física macroscópica de las muestras no es exactamente la misma que presentaban antes de someterlas al tratamiento de extracción. Este dato debería ser valorado por los arqueólogos, antropólogos y personal de museo, para establecer si el cambio es mínimo o por el contrario no compensa la conservación de la muestra con estas nuevas condiciones. Se debe considerar hasta qué punto el investigador necesita que la muestra conserve su apariencia inicial al cien por cien, o si es suficiente una conservación de este tipo. Otro factor importante a valorar, aunque no se ha comprobado empíricamente, es la posibilidad de que también se haya sufrido una alteración química en la composición



interna de las muestras, lo que podría inhabilitarlas para llevar a cabo otro tipo de análisis a partir de las mismas.

En cualquier caso, según los resultados obtenidos es difícil decidir con claridad si el protocolo no destructivo es tan eficiente como los demás, aunque en principio los resultados apuntan a que si podría serlo. Sin embargo, sería necesario valorar otros factores como la contaminación y el daño molecular a través de la calidad de los electroferogramas. No obstante, sería muy recomendable probar la eficiencia de este método con un número más elevado de muestras; para comprobar que efectivamente el resultado no se ve perjudicado.

6.2.3 Evaluación De Los Criterios Para El Establecimiento De Perfiles Consenso Sólidos De STRs Autosómicos A Partir De Perfiles Parciales

Para el establecimiento de perfiles de STRs a partir de perfiles parciales, en primer lugar hay que destacar que se han seguido siempre unas normas básicas. La primera de ellas, al igual que se realiza con el estudio de ADN mitocondrial, ha sido realizar como mínimo 2 amplificaciones por cada muestra analizada (es decir, 4 amplificaciones por individuo). A partir de esos 4 perfiles de ADN se ha trabajado aplicando cada uno de los 5 criterios descritos en el apartado material y métodos (4.2.3.3.3). De este modo se han obtenido 5 posibles perfiles consenso. En este apartado se trata de evaluar, en función de los resultados obtenidos, cuál de los 5 criterios es el más apropiado.

Como premisa inicial diremos que el mejor criterio es aquél que más información aporte, sin generar errores. Con esta primera norma como eje, comienzo la discusión de las principales observaciones realizadas.

Si observamos la *tabla 78* de los resultados, percibiremos que el número de marcadores considerados para el perfil consenso se incrementa a medida que elegimos un criterio más permisivo. Siendo el criterio menos permisivo, o más restrictivo, el criterio 1 y el más permisivo el 5, en orden creciente. De modo que la media de marcadores considerados en el criterio 1 es de 3’4, de 4’2 en el caso del criterio 2, la media es de 5’3 para el criterio 3, de 6’24 para el criterio 4 y la media más elevada, de 6’9 marcadores, es para el criterio 5 (*Tabla 78*). Por lo general, si observamos las tablas de resultados (*Tablas 65, 68, 70, 72, 74, y 76)* podemos observar que no se perciben discrepancias importantes entre unos criterios y otros. Es decir, no suelen aparecer alelos diferentes (o contradictorios) para un mismo marcador en función del criterio elegido, sino que lo único que se observa es un incremento en el número de marcadores validados a medida que el criterio es menos restrictivo.

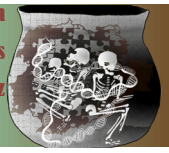
Si observamos las consecuencias directas de la selección de cada uno de los 5 criterios sobre el establecimiento de diferentes relaciones de parentesco, en lugar de enfocar la atención exclusivamente

sobre los perfiles de los individuos, podemos realizar otra serie de consideraciones. Para ello se han evaluado los resultados generales en las 43 posibles relaciones de parentesco, que se han establecido en términos de probabilidad mediante el software *familias*, y mostraron valores de LR superiores a 100 en algún caso. Los resultados correspondientes a este análisis se resumen en la *Tabla 79* de los resultados.

En primer lugar podemos observar que el LR o la probabilidad de la gran mayoría de relaciones de parentesco establecidas se incrementa a medida que el criterio es menos restrictivo (observando valores de LR inferiores hacia el criterio 1 y superiores hacia el criterio 5) (ver *Tabla 79* de los resultados). Sin embargo se han observado algunas excepciones a esta afirmación, por ejemplo en algunos casos el LR se incrementa desde el criterio 1 hacia el criterio 3 y después se reduce en el 4 para volver a incrementarse con el criterio 5; la causa de este efecto seguramente se deba a que existen pocos picos que hayan superado la altura de 150 rfus y como consecuencia el criterio 4 se asemeja al 2 y el criterio 5 se asemeja al 3; observamos esta situación en 6 de las 43 relaciones de parentesco consideradas (*Tabla 79*).

El criterio 1 es demasiado restrictivo y en numerosas ocasiones no deja ver relaciones que con criterios más permisivos aparecen. Esta misma situación, aunque en menor medida, es la que se observa en las relaciones establecidas mediante perfiles definidos según el criterio 2. Por el contrario, el criterio 3 parece dar más margen a la observación de relaciones de parentesco que quedan enmascaradas cuando empleamos los criterios 1 y 2, pero sin embargo no por ello se originan falsos positivos como ocurre en ocasiones al emplear los perfiles establecidos con los criterios 4 y 5 (Para observar los “falsos positivos”, se puede consultar la última fila de la *Tabla 79*).

Se ha observado que los criterios 4 y 5 en varias ocasiones provocan falsos positivos debido a su baja restricción. Sin embargo en otras ocasiones dejan a la luz relaciones de parentesco que con muy alta probabilidad quedarían ocultas con el resto de los criterios. Un claro ejemplo de esto último se observa en el caso de la maternidad establecida entre los individuos LTB1 y LTB3 (*Tabla 66*), en este caso los LRs obtenidos a través de los criterios 1, 2 y 3 son poco significativos, sin embargo el planteamiento cambia cuando empleamos los criterios 4 y especialmente 5 (LR = 14284,71; 99,99% de probabilidad) (*Tabla 66*); a ello hay que sumarle que en este caso los dos individuos comparten alelos en 10 marcadores (*Tabla 66)* y además comparten el haplotipo de ADN mitocondrial (*Tabla 53*), lo cual hace más sólida la hipótesis de maternidad. Sin embargo en otras ocasiones es peligroso considerar exclusivamente los criterios 4 y 5 sin mantener una visión más general, claro ejemplo de ello observamos en las hipótesis de relación de hermandad entre los individuos 8ARE y 20ARE (*Tabla 69*) y en la hipótesis de que los individuos 1ARE y 2ARE sean el mismo (*Tabla 69*). En ambos casos, las hipótesis analizadas (hermandad y mismo individuo) no son posibles por no compartir el mismo haplotipo de ADN mitocondrial (*Tabla 53*), además en el primer caso (hermandad) los dos individuos comparten alelos en tan solo 2 marcadores y en el segundo comparten alelos en 3 marcadores (tercera columna de la *Tabla 69*). Es cierto que podría darse un caso de hermandad en el que el número de marcadores en el que se comparten alelos fuera únicamente 2, pero no sería compatible con presentar haplotipos de ADN mitocondrial diferentes (a menos que se tratara de medio-hermanos por parte de padre).



La reflexión que se debe realizar sobre todo lo anterior es que siempre es fundamental tener en cuenta el número de marcadores que han sido considerados para establecer la relación de parentesco, así como la concordancia de los resultados con otros marcadores (ADN mitocondrial, cromosoma X y cromosoma Y) que deban ser compatibles con la hipótesis. Datos que por ello se han considerado en las tres últimas columnas de la *Tabla 79*, enprimer lugar el número de alelos considerados para establecer la relación, en segundo lugar si comparten o no el mismo haplotipo mitocondrial y finalmente, la última columna nos muestra si la relación es incompatible por alguna de las dos razones, número de alelos empleado o perfil de ADN mitocondrial.

Como conclusión final podemos sostener que el criterio 3 es bastante óptimo, por ser suficientemente bueno, no generar falsos positivos hasta dónde hemos observado y ser menos restrictivo que los criterios 1 y 2. Los criterios 4 y 5 pueden emplearse, pero maximizando las precauciones. Es decir, deberían compararse con lo obtenido según el criterio 3, y del mismo modo tener muy presente el número de marcadores empleados en el establecimiento de la relación de parentesco, así como considerar que los resultados sean coherentes con otros marcadores (no STRs) amplificados, como por ejemplo el ADN mitocondrial cuando proceda.

6.3 DISCUSIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES ASOCIADAS AL ADN MITOCONDRIAL

6.3.1 Discusión Sobre El Análisis Específico De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis

A lo largo de este punto se discuten los resultados obtenidos en el apartado 5.2.1 de esta tesis. A través de ellos podemos valorar las características genéticas ligadas al ADN mitocondrial relativas a las poblaciones analizadas de manera íntegra en esta tesis, pertenecientes a los periodos crono-culturales: PreCampaniforme, Campaniforme, Bronce Antiguo, Protoogotas I, Cogotas I y Soto Formativo, sin tener en cuenta su vinculación con otras poblaciones anteriores o posteriores en el tiempo.

6.3.1.1 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas FSTs Según Un Criterio Cronológico

Para llevar a cabo los análisis oportunos, los periodos correspondientes se han agrupado tal como se índica en el apartado 4.2.3.3.2.1 de material y métodos. En un primer lugar se ha analizado la Amova atendiendo a dicha agrupación, cuyos resultados pueden observarse en la *tabla 54* de resultados. Posteriormente, también se estudió la varianza molecular entre grupos organizados de manera geográfica en lugar de cronológica, y si comparamos las varianzas moleculares según criterios temporales y geográficos,

cabe destacar que la varianza entre grupos formados por conjuntos crono-culturales es notablemente inferior que entre grupos organizados mediante criterios geográficos (1,74>6,11) (Ver *Tabla 54* y *Tabla 56*). Esto podría indicarnos que existe una mayor variabilidad entre las distintas poblaciones que cohabitaron la Submeseta norte en sus distintas regiones geográficas en periodos concretos, que entre las que se sucedieron a lo largo del tiempo, considerando como regiones geográficas.

En la *tabla 55* es posible observar las diferencias entre grupso cronológicos de forma más exacta y concreta, pudiéndo observar que las mayores varianzas moleculares tienen lugar entre los individuos de Cogotas I y sus antecesores Protocogoras I y del Bronce Antiguo; así como entre éstos últimos (Bronce Antiguo) y los Campaniformes. Por otro lado las mayores similitudes (menor varianza molecular) se dan entre Cogotas I y los individuos pertenecientes a la cultura Campaniforme (0,77). Todo ello parece apuntar a que la Cultura Cogotas I presenta características genéticas, en cierto grado, diferenciadas de sus antecesores inmediatos de la Edad del Bronce, pero se asemeja a los grupos poblacionales de la cultura Campaniforme. La diferenciación entre Cogotas I y Bronce Antiguo es mayor que entre Cogotas I y Protocogotas I, probablemente debido a que el cambio comenzara ya con los primeros (Protocogotas I), pero de forma menos marcada, y gradualmente fuera acentuándose; de modo que al comparar a las poblaciones de Cogotas I con las anteriores a sus predecesores Protocogotas I, se aprecia el cambio de manera más notable. Este dato podría estar relacionado con la llegada progresiva de población foránea a lo largo del desarrollo de la Edad del Bronce, que probablemente esté vinculada a dicha cultura, con sus implicaciones en los cambios culturales y materiales (cerámicas, etcétera). De hecho ya entre el Bronce Antiguo y el Campaniforme se aprecia cierto incremento de la varianza genética (16,06), así como entre Protocogotas I y Bronce Antiguo (9,39), aunque no tan marcado como posteriormente con la cultura Cogotas I.

A los datos aportados por el análisis de la varianza molecular entre grupos, debemos añadir los obtenidos tras el análisis de las distancias FSTs entre los grupos crono-culturales establecidos. En este caso, en general, las mayores distancias genéticas significativas se observan entre el grupo crono-cultural PreCampaniforme y el resto de grupos, concretamente entre PreCampaniformes y Bronce Antiguo (con una distancia FST de Slatkin de 0,08941; p=0,045) y entre PreCampaniforme y Protocogotas I (con una distancia FST de Slatkin de 0,11589; p=0,000001) (ver representación MDS de la *Figura 51* de los resultados y la matriz de distancias de la hoja FST1 del archivo S.1 disponible en el material suplementario). Esto estaría marcando de nuevo una diferenciación clara entre las poblaciones anteriores a la Edad del Bronce y las posteriores.

Con los resultados obtenidos, en primer lugar centraremos la atención sobre la relación entre el grupo PreCampaniforme y el grupo Protocogotas I, La distancia genética entre estos dos grupos (0,12) es significativa (*Figuras 51* y *52*), lo cual marcaríauna diferenciación genética clara entre estos dos periodos. Son dos periodos separados cronológicamente a su vez por el periodo Campaniforme y el Bronce antiguo, el primero de los cuales no parecen mostrar distancias FST significativas respecto del PreCampaniforme ni de los Protocogotas I, pero el segundo (Bronce Antiguo) ya muestra cierto distanciamiento en su composición genética respecto de las poblaciones PreCampaniformes. Esto podría ser explicado mediante

dos hipótesis que se indican a continuación.

La primera hipótesis posible es que hubiera tenido lugar una afluencia progresiva de nuevas poblaciones genéticamente distintas (en lo que al ADN mitocondrial se refiere, es decir, al menos en cuanto a la población femenina se refiere) desde el periodo Campaniforme en adelante. En un principio esas poblaciones, con características genéticas del ADN mitocondrial diferentes (llegadas durante el Campaniforme y el Bronce antiguo) llegarían en pequeños contingentes, y por ello el conjunto de la población global no sería significativamente diferente del periodo anterior, PreCampaniforme. Las poblaciones inmigrantes se mezclarían gradualmente con la población autóctona; por lo que entre periodos inmediatamente consecutivos, como entre PreCampaniforme y Campaniforme o entre Campaniforme y Bronce Antiguo, no se aprecian diferencias significativas; pero al llegar al periodo Protocogotas I, si lo comparamos respecto del periodo anterior a la aparición de esta nueva afluencia genética (PreCampaniforme) la población ya ha cambiado sustancialmente, y por ello se aprecia esta distancia genética significativa (*Tabla 55*, *Figura 51* y hoja FST1 del arvhivo S.1 del material suplementario).

La segunda hipótesis posible es que la primera llegada de población exógena se hubiera producido directamente durante el PreCampaniforme, y no posteriormente. Es posible que el cambio en la composición genética de la población se produjera justo durante el periodo PreCampaniforme o incluso con anterioridad, y no a partir del Campaniforme tal como se plantea en la primera hipótesis. Y posteriormente ese efecto de la llegada de nueva población podría haberse disuelto, generando esas mayores distancias genéticas entre PreCampaniforme y periodos posteriores (*Figura 51*). Para conocer este dato sería necesario comparar las poblaciones analizadas en esta tesis con poblaciones que ocuparon la región anteriormente (durante el Calcolítico y el Neolítico), lo cual se discutirá en el apartado 6.3.2.

En cualquier caso, desconocemos el momento exacto en el cual se inició la llegada de población genéticamente diferente, pero se observa claramente que tiene lugar una modificación gradual y progresiva de la composición genética de la población, que parece culminar y acentuarse con la cultura Cogotas I (la cual por ello muestra mayores varianzas moleculares respecto de poblaciones anteriores, *tabla 55*).

El conjunto Cogotas I también muestra cierto distanciamiento genético respecto de los PreCampaniformes (*Figura 51*) (distancia FST de 0,09) sin embargo este dato no es significativo, probablemente debido al reducido tamaño muestral del conjunto Cogotas I. El resto de grupos se mantienen más o menos próximos entre sí, en cuanto a lo que las distancias genéticas FSTs se refiere, manteniéndose ligeramente más próximos entre sí Cogotas I y Protocogotas I por un lado, así como los individuos del Bronce Antiguo y los de la cultura Campaniforme. Pero también se aprecia cierta proximidad entre Protocogotas I y Campaniformes. Se sigue apreciando una mayor diferencia entre Bronce Antiguo y los grupos Cogotas I y Protocogotas I, pero no tan intensa como la distancia al conjunto PreCampaniforme, que es el más alejado del resto con diferencia (*Figura 51*).

Sin embargo, tal como se dejaba ver en la segunda hipótesis planteada anteriormente, con estos datos

no es posible apreciar si ese distanciamiento del grupo PreCampaniforme viene dado por una ruptura genética a partir del periodo Campaniforme en adelante, o si el cambio es puntual durante el periodo PreCampaniforme. Para poder conocer esto más de cerca es necesario analizar periodos temporales anteriores al PreCampaniforme, y por ello se discutirá posteriormente (punto 6.3.2). Este es el único modo por el cual podremos conocer si las poblaciones del PreCampaniforme son genéticamente distintas a las anteriores y a las posteriores, siendo una población claramente diferente que aparece en la región y desaparece más tarde del mismo modo sin dejar rastro, o si por el contrario son similares a las anteriores (Calcolíticas y Neolíticas) y el cambio poblacional surge a partir del Campaniforme.

A esta altura de la discusión, conviene realizar una puntualización: todos los datos analizados aquí son relativos al estudio del ADN mitocondrial, por lo que describen cambios en los linajes matrilineales, por ser las mujeres las portadoras del ADN mitocondrial. No obstante este tipo de ADN está presente en todos los individuos, hombres y mujeres, pero los cambios en la composición dependen de movimientos poblacionales de mujeres por ser ellas quienes lo transmiten. De modo que es un marcador muy apropiado para conocer movimientos femeninos, y en este caso es especialmente interesante para poder conocer si existe cierta vinculación entre el movimiento de un componente femenino de la población que vaya acompañado de novedades en la cultura material, como las que caracterizan a la población Campaniforme o a la cultura Cogotas I. Esto es importante, ya que los datos arqueológicos sugieren que la realización de las cerámicas de estas culturas era obra de las mujeres de las comunidades estudiadas, por lo que el estudio del ADN mitocondrial permitirá verificar o desmentir esta hipótesis.

Si analizamos las distancias genéticas concretas entre grupos dos a dos, tal como figuran en las representaciones MDS de la *figura 52* podemos observar que sólamente se observa una distancia genética significativa entre los yacimientos de Los Areneros y El Tomillar (Distancia FST de Slatkin 0,4448, p=0,045), (*Figura 52* y hoja MFST3 del archivo S.1 del material suplementario), ambos pertenecientes al mismo periodo crono-cultural, el PreCampaniforme, esto podría ser un índicio de la presencia de grupos genéticamente diferentes durante ese mismo periodo, cuestión que se discutirá posteriormente junto con los datos geográficos.

Entre los yacimientos Campaniformes y del Bronce Antiguo no se han observado distancias genéticas significativas (por lo que no aparecen representados en la *figura 52*). Pero, si se han observado entre estos últimos y los yacimientos Protocogotas I; especialmente entre el yacimiento de Los Tolmos (Protocogotas I) y la Cueva de la Revilla (Bronce Antiguo – Protocogotas I) (distancia FST de 0,24353, p=0,009) (*Figura 52* y hoja MFST4 del archivo S.1 del material suplementario); siendo más próximo el yacimiento de la Cueva de la Revilla a otros yacimientos Protocogotas I que el de Los Tolmos e incluso que al de El Cerro. Del mismo modo, también se observa que existen mayores distancias entre los propios yacimientos Protocogotas I que entre los yacimientos Protocogotas I y Cogotas I (*Figura 52*), especialmente entre Los Tolmos y Tordillos o los Rompizales, y entre Los Rompizales y El Cerro; tal como ya se apreciaba en el contraste anterior. (*Figura 52*).

Para cerrar este apartado, se puede decir que en general se observa mayor diversidad genética entre los

distintos yacimientos de un mismo periodo que entre periodos consecutivos en el tiempo.

6.3.1.2 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas FSTs Según Criterios Geográficos

Además del análisis a través del tiempo, se ha querido analizar la posible existencia de diferencias genéticas entre los grupos humanos de diferentes áreas geográficas de la Submeseta norte, agrupando los conjuntos poblacionales según el criterio establecido en el apartado 4.2.3.2.3.2 de material y métodos y en la *Figura 37*. Utilizando esta organización en grupos formados por áreas o regiones geográficas, se ha realizado un nuevo análisis de la varianza molecular (Amova), visible en la *Tabla 56*; en este caso llama la atención que la varianza genética entre poblaciones (5,19) es inferior a la varianza entre los grupos formados por las distintas regiones geográficas (6,11). Es poco frecuente que la variabilidad entre grupos sea mayor que entre poblaciones dentro de un mismo grupo, esto indica una posible diferenciación entre grupos que viven en diferentes regiones geográficas. Sin embargo, para poder afinar en el análisis hay que tener en cuenta si estas diferencias se deben a una cuestión geográfica o temporal, por lo que es necesario también en este caso analizar las varianzas entre grupos concretos dos a dos (*Tabla 57*), valorando en cada caso si la varianza molecular se debe a cuestiones geográficas o cronológicas.

En la *tabla 57* observamos que las varianzas moleculares más importantes observadas entre grupos localizados en diferentes regiones geográficas se han dado entre la región 5 (localizada al sur del Duero y el este del Eresma) y el resto de regiones, a excepción de la región 2 (al norte del Duero y entre los ríos Esla y Pisuerga) (*Tabla 57*). Llama la atención que las mayores diferencias con la región 5 las muestran las regiones 1, 3 y 4. En el caso de las diferencias entre la región 1 y la 5 pueden explicarse por la distancia geográfica que separa estas dos regiones; sin embargo las distancias genéticas observadas entre la región 5 y las regiones 3 y 4 resultan mucho más llamativas ya que se trata de regiones limítrofes, por lo que estaríamos hablando de la coexistencia de grupos poblacionales genéticamente diferentes en regiones geográficas relativamente cercanas durante ciertos periodos de tiempo. Para discutir este resultado es necesario tener en cuenta además de las características geográficas de forma exclusiva, también los datos cronológicos. La región 5 contiene poblaciones PreCampaniformes, Campaniformes y Protocogotas I, de igual modo que la región 4, con la que comparte la mayor varianza molecular, lo cual indica que podría haber existido diferenciación geográfica en la distribución genética de las poblaciones dentro de cada uno de esos periodos, al menos entre estas dos regiones; al igual que entre la región 5 y la 1 durante el desarrollo de la cultura Protocogotas I, o entre la región 5 y la 3 durante los periodos Protocogotas I y Campaniforme. Sin embargo, para poder valorar estas cuestiones de forma más concreta y controlando tanto el eje espacial como el temporal, se ha llevado a cabo un análisis de distancias genéticas que se comentará a continuación.

En general, no se aprecian barreras geográficas marcadas para la libre circulación de las poblaciones, con la excepción observada en el caso de la región 5 respecto del resto de regiones, salvo la región 2 (*Tabla 57*). Este mayor aislamiento de la región 5 también se refleja en la representación MDS de las distancias FSTs

en función de los criterios geográficos establecidos de *Figura 53* y en los datos de la matriz de distancias de la hoja MFST2 del archivo S.1 del material suplementario, dónde se corrobora la información aportada por el análisis de la varianza molecular, ya que en este caso también se observa que la población más alejada del resto es la correspondiente a la región 5.

Según lo observado hasta el momento, no parece que los ríos de la Submeseta norte ejerzan como barreras importantes impidiendo la mezcla de diferentes núcleos poblacionales, salvo por la excepción de la región 5. Se debe señalar que ya varios autores han propuesto la existencia de rutas de comunicación y transporte en la región oeste de la submeseta norte(*Abarquero-Moras, 2005; Sánchez-Polo, 2011*), y este hecho quizá quede avalado además por estos datos genéticos, que demuestran una mayor interacción genética entre las poblaciones situadas al norte y al sur de la zona oeste que entre las zonas norte y sur de la mitad este, que se mantienen más aisladas (región 5). Para conocer más de cerca las causas de esa diferenciación y si se debe a factores realmente geográficos o existe alguna razón crono-cultural más clara, hay que analizar los gráficos MDS que representan las distancias genéticas entre grupos dos a dos, en la *figura 54*.

En las gráficas MDS de la *Figura 54*, podemos observar las distancias genéticas entre los yacimientos ubicados en cada una de las diferentes regiones. Concretamente, si centramos nuestro interés en las gráficas relativas a la región 5, es decir en las gráficas i y j de la *Figura 54*, podemos analizar las distancias genéticas entre las regiones 3 y 5, y 4 y 5 respectivamente. La primera de ellas no muestra interacciones cercanas entre ninguno de los yacimientos de las dos regiones (3 y 5), de hecho existen distancias genéticas significativamente elevadas entre el yacimiento PreCampaniforme de Los Areneros, y los yacimientos Protocogotas I de Rompizales, El Cerro y la Cueva de la Revilla (ver matriz de distancias de la hoja MFST14 del archivo S.1 del material suplementario). Aquí se observa claramente que esa diferenciación entre la región 3 y la región 5, viene marcada por cuestiones cronológicas y no geográficas; ya que los yacimientos que presentan distancias genéticas significativamente altas son yacimientos a su vez pertenecientes a periodos cronológicos separados en el tiempo, por lo que lo que aquí se observa no es una barrera geográfica que impida la mezcla poblacional, sino un claro reflejo de una distancia temporal. Sin embargo, en el gráfico j de la *Figura 54*, observamos una enorme proximidad entre los yacimientos Campaniformes de El Mirador (n=1), Perro Alto (n=1) y Pajares de Adaja (n=1), estando situado el primero en la región 5 y los otros dos en la región 4, lo cual evidencia que poblaciones del mismo periodo temporal se asemejan a pesar del distanciamiento geográfico, al menos durante el periodo Campaniforme. Sin embargo durante el PreCampaniforme sí que se observa un distanciamiento genético significativo, que se aprecia de forma clara entre la población de Los Areneros (n=8) y El tomillar (n=5) (distancia genética de 0,44483; p = 0,009) (ver matriz de distancias genéticas de la hoja MFST15 del archivo S.1 del material suplementario). Del mismo modo, también se aprecia una distancia significativa entre los yacimientos Protocogotas I de las regiones 4 y 5, concretamente entre Tordillos (n=2) y Los Tolmos (n=4) (con una distancia genética de 0,4875; p=0,009) (ver matriz de distancias genéticas de la hoja MFST15 del archivo S.1 del material suplementario). Esto nos está indicando que durante el periodo PreCampaniforme, así como durante el periodo Protocogotas I si se apreció cierta diferenciación genética entre las poblaciones al norte y al sur

del Duero en la mitad este de la Submeseta norte. Estos dos periodos (preCampaniforme y Protocogotas I) tal como se ha venido viendo en el estudio cronológico (ver punto 5.2.1.2), corresponden a etapas de cambio cultural que parecen ir acompañados de cambios en la composición poblacional, demostrados en forma de cambios en la composición genética de las poblaciones. Es posible que durante esos dos periodos no se produjera mezcla poblacional entre el norte y el sur de la mitad este de la Submeseta Norte, manteniéndose aisladas genéticamente unas poblaciones y otras. Este fenómeno sin embargo no se ha observado durante el Campaniforme ni tampoco durante el desarrollo pleno de la cultura Cogotas I. Es posible que esto se deba a que durante el preCampaniforme pudo realizarse una llegada brusca de una población exógena que en un principio no se mezclaría con la población endógena ya existente, y que posteriormente de manera gradual esas diferencias se irían disolviendo, bien debido a una mezcla poblacional gradual o bien debido a la re-emigración de nuevo de esos pobladores. En todo caso lo destacado es que durante el Campaniforme ya no se aprecia diferenciación en las composiciones genéticas de las distintas áreas geográficas, que sí se observaba (especialmente entre las regiones 4 y 5) durante el PreCampaniforme. Algo similar pudo tener lugar más tarde en los periodos Protocogotas I – Cogotas I; ya que el efecto observado es muy parecido con la reserva de que el tamaño muestral del grupo Cogotas I del que disponemos es muy reducido. Este efecto es claramente observable en la gráfica j de la *Figura 54*, y su correspondiente matriz de distancias genéticas (matriz de la hoja MFST15 dle archivo S.1 del material suplementario) en la cual se observa una gran proximidad genética entre las poblaciones Campaniformes, y un notable distanciamiento entre poblaciones preCampaniformes y Protocogotas I de las respectivas regiones geográficas.

Durante los periodos Campaniforme y Cogotas I, se ha considerado la posibilidad de que las redes hidrográficas no actúen tanto como barreras entre las poblaciones, sino más bien como medios de comunicación. También esto podría haber sucedido en otros periodos, respecto a otros yacimientos en los que no se ha observado distanciamiento genético por cuestiones geográficas. Para evaluar esa posibilidad, se han tenido en cuenta aquellos yacimientos localizados en la cuenca de los principales ríos empleados para dividir la región de estudio (Ver *Figura 38*). De este modo se ha diferenciado entre 4 conjuntos diferentes: el primer conjunto lo integran los yacimientos ubicados en la cuenca del rio Duero, concretamente 3 yacimientos y 7 individuos pertenecientes a los periodos crono-culturales Protocogotas I y Cogotas I. El segundo conjunto está formado por 2 individuos de 2 yacimientos Campaniformes ubicados en la cuenca del río Adaja. El tercero viene constituido por los yacimientos ubicados en la cuenca del Arlanzón, que concretamente son 3 yacimientos y 15 individuos de los periodos Protocogotas I y Campaniforme. Finalmente el cuarto conjunto está formado por el único yacimiento de la cuenca del río Tormes, Tordillos, del que disponemos de perfiles genéticos de 8 individuos. Todas las comparaciones que podremos llevar a cabo estarán basadas fundamentalmente entre los grupos crono-culturales disponibles.

La Amova entre los distintos grupos es inferior a la observada para los grupos de regiones geográficas o de periodos crono-culturales, en este caso de 2,41 (ver *Tabla 58* de los resultados), siendo considerablemente inferior que la varianza entre poblaciones y entre individuos. Cuando analizamos 2 a 2 la varianza molecular de los distintos grupos, hallamos las siguientes semejanzas y diferencias:

Las mayores diferencias, varianzas moleculares más elevadas, se encuentran entre las poblaciones de la cuenca del Tormes y del Duero, así como entre las de la cuenca del Tormes y del río Adaja. En cuanto a las mayores semejanzas, varianzas moleculares más bajas, se encuentran entre las poblaciones ubicadas en la cuenca del Tormes y las de la cuenca del Arlanzón.

La varianza molecular entre las poblaciones que forman parte de la cuenca del río Tormes y las de la cuenca del Duero es de 26'85 (*Tabla 59*), ambos con población Protocogotas I. No parece que el río haya facilitado la mezcla poblacional entre los grupos localizados en las cuencas de estos dos ríos. El Duero presenta varianzas moleculares más bajas respecto del río Arlanzón, pero en el resto de casos no parece que este río haya sido empleado como medio de comunicación entre poblaciones que se ubican en las cuencas fluviales, manteniendo por lo general varianzas elevadas. Pero sin duda, es la población humana del río Tormes (yacimiento de Tordillos) durante el periodo crono-cultural Protocogotas I, la más diferente a las halladas durante ese mismo periodo en la cuenca del Duero (*Tabla 59*).

También la población de Tordillos (cuenca del rio Tormes) presenta una varianza molecular relativamente elevada respecto del conjunto de poblaciones ubicadas en la cuenca del rio Adaja (Amova igual a 20) (*Tabla 59*). En este caso hay que decir que ambas cuencas no comparten poblaciones que coexistan en los mismos periodos temporales, ya que la población del Tormes es Protocogotas I y las del Adaja son Campaniformes. Por lo que esta diferenciación puede venir dada en mayor grado por una causa temporal que espacial, por lo que no debe tomarse en cuenta.

La varianza molecular más baja (y por lo tanto posible mayor relación) la hallamos entre las poblaciones ubicadas en la cuenca del rio Tormes y las del río Arlanzón (Amova igual a 0,82) (*Tabla 59*). Se trata de una varianza relativamente más pequeña que el resto de las observadas que son superiores a 3 en todos los casos. En este caso se observan similitudes genéticas entre las poblaciones localizadas en la cuenca del Arlanzón y en la cuenca del Tormes. Opuesto a este dato teníamos el dato que indicaba que las regiones 3 y 4, establecidas en la *Figura 37*, eran genéticamente diferentes. Quizá eso sucediera en mayor medida respecto de las poblaciones no ubicadas de forma próxima a la cuenca de los ríos (Arlanzón y Tormes), sino más hacia el interior de las regiones 3 y 4 (El Cerro y Tablada de Rudrón en la región 3, y El Tomillar y el Cerro de San Pelayo en la región 4). Lo cual en este caso sí que podría implicar cierto grado de comunicación vía fluvial entre las poblaciones próximas a las cuencas hidrográficas de estos dos ríos (Arlanzón y Tormes) (Ver *Tabla 59*).

En cuanto al análisis de distancias genéticas FSTs, no se han observado distancias FSTs significativas entre ninguno de los conjuntos organizados según las cuencas hidrográficas. Sin embargo se observa que la mayor distancia FST de Slatkin observada se da entre la cuenca del Duero y la Cuenca del Tormes (0,11) (ver matrices de distancias FSTs de las hojas MFST54, MFST55, MFST56,, MFST57 y MFST58 del archivo S.1 del material suplementario), siendo las demás inferiores. Este dato es coincidente con el obtenido en el análisis de la Amova, según el cual la varianza mayor también se observaba entre el Tormes y el Duero, cuyas poblaciones parecen no haber intercambiado información genética durante el periodo Protocogotas I (*Tabla 59*).

En general, se puede decir que no se observan grandes diferencias genéticas entre las poblaciones que ocupan las distintas cuencas hidrográficas, siendo especialmente similares las de la cuenca del Tormes y del Arlanzón, a pesar de la distancia existente entre ellas, lo que podría indicar la existencia de comunicación por vía fluvial, o, más prudentemente, de contactos a bastante distancia. Por el contrario son bastante diferentes las poblaciones de las cuencas del Duero y del Tormes, aunque la distancia genética observada entre ellas no es significativa.

6.3.1.3 Discusión Sobre El Análisis De Datos Cronológicos Y Geográficos Combinados

El gráfico MDS de la *Figura 55* se ha construido a partir de las distancias genéticas de Slatkin entre los yacimientos estudiados, sin atender a ninguna agrupación temporal ni espacial. En él se han identificado con distintos colores y formas los yacimientos pertenecientes a cada grupo crono-cultural y región geográfica. Si analizamos directamente las distancias genéticas (ver matriz de distancias genéticas de la hoja MFST16 del archivo S.1 del material suplementario) se observa que la mayor parte de las distancias FSTs significativas tienen lugar entre conjuntos Protocogotas I y preCampaniformes. Hay que destacar que estos dos grupos son a su vez los más numerosos, por lo que es posible que si en alguno de los otros conjuntos hubiéramos podido obtener un tamaño muestral mayor se podrían haber observado más diferencias. Ajustándonos a los datos observados, se puede afirmar que existen diferencias significativas claras entre la composición genética de las poblaciones Protocogotas I (en estos incluimos a la Cueva de la Revilla por tratarse de un enterramiento que se extiende desde el Bronce Antiguo hasta el periodo Protocogotas I) y las poblaciones preCampaniformes.

Se han observado distancias genéticas significativas entre distintos yacimientos Protocogotas I, concretamente entre Tordillos (n = 8), ubicado en la región 4 y los Tolmos (n = 4), ubicado en la región 5, así como entre Los Tolmos (n = 4) y Los Rompizales (n = 5), ubicado en la región 3, y entre Los Rompizales (n = 5) y El Cerro (n = 3) (situado también en esa misma región 3, pero muy en el límite fronterizo con la región 5). Esto vendría a demostrar que durante el periodo Protocogotas I las poblaciones procedentes de diferentes regiones geográficas se mezclaron en menor medida que durante otros periodos. Esto podría ser a causa de esa llegada de nueva población genéticamente diferente que parece ocurrir a lo largo del periodo Protocogotas I, y es posible que en un comienzo no se mezclara con la población preexistente, lo que produciría estas diferenciaciones geográficas; ya que según hemos venido viendo no parece que existan barreras geográficas importantes que impidan la mezcla poblacional. Este hecho también se aprecia durante el periodo preCampaniforme y se manifiesta en las distancias genéticas observadas en el último análisis (*Figura 55* y distancias genéticas de la matriz MFST16 del archivo S.1 del material suplementario) entre yacimientos como Los Areneros y El Tomillar.

De nuevo, en el grafico MDS (*Figura 55 y matriz de distancias genéticas de la hoja MFST16 del archivo S.1*

del material suplementario) también se aprecia que no hay interacción entre los yacimientos localizados en la región 5 respecto de los yacimientos localizados en el resto de regiones, presentando además distancias genéticas amplias entre los propios yacimientos de la misma región 5. El resto de regiones de nuevo se muestran más vinculadas en cierto grado entre sí que la 5 (coloreada en rosa).

En resumen, con los resultados analizados hasta el momento, podemos afirmar que se aprecian diferencias claras en la composición genética entre las poblaciones PreCampaniformes y las posteriores poblaciones Protocogotas I. No se observa un cambio significativo entre preCampaniforme y Campaniforme, pero no puede obviarse la necesidad de aumentar el tamaño muestral de ese grupo crono-cultural, del mismo modo que ocurriría en el caso del conjunto de la cultura Cogotas I y el Soto Formativo. Además se ha observado que tanto durante los periodos preCampaniforme como Protocogotas I, se aprecia cierto distanciamiento genético entre las poblaciones de los sectores norte y sur de las regiones orientales de la Submeseta; no teniendo lugar esta diferenciación en el resto de regiones. Esto último podría estar apuntando a una posible llegada de población foránea a la región 5 (sureste) durante el periodo Protocogotas I, que en un principio no se mezclaría con la población endémica, y algún tiempo más tarde comenzará a difuminarse ese efecto bien por la mezcla entre las dos poblaciones (endémica y foránea), bien por una retirada de parte o la totalidad de la población inmigrante o bien por una mezcla de las dos situaciones anteriores. Este mismo proceso podría estar ocurriendo durante el preCampaniforme, sin embargo en ese caso con los datos analizados en esta tesis, no es posible saber si la población preCampaniforme analizada es una población que también llega desde otras regiones y cambia el mosaico existente de forma previa, o si es la misma población con las mismas características genéticas que ya estaba en el territorio durante el Neolítico Final.

Para analizar los cambios en la composición genética de las poblaciones a lo largo del tiempo y el espacio, se han planteado dos posibles enfoques que se explican en el apartado de resultados (apartado 5.2.1.4).

El primer enfoque considera que pueden surgir cambios en la composición genética de las poblaciones de manera puntual y/o brusca, debido a fenómenos espontáneos. En consecuencia, para analizar cambios de este tipo hemos buscado diferencias o similitudes entre conjuntos de individuos que son inmediatamente consecutivos en el tiempo (por ejemplo entre individuos del periodo Protocogotas I y Cogotas I).

Según los mapas de representación de distancias genéticas FSTs de Slatkin establecidos según este primer enfoque planteado (*Figura 56*), señalamos en primer lugar que no se aprecian diferencias en la composición genética de las poblaciones del Campaniforme respecto de sus antecesores preCampaniformes. Sin embargo si avanzamos en el tiempo, durante el Bronce antiguo ya se aprecia cierto incremento en las distancias genéticas respecto del Campaniforme especialmente en la región oeste de la Submeseta norte (siendo el centro de esta diferencia en el yacimiento de Santioste) reduciéndose considerablemente las distancias genéticas hacia el Este (yacimiento de la Cueva de la Revilla); no obstante se debe tener en cuenta que el yacimiento de Santioste está constituido por un único individuo, por lo que este primer cambio en la composición genética de la población del Bronce Antiguo respecto de sus antecesores Campaniformes no es significativa. Ya en el transcurso de la Edad del Bronce a la cultura Protocogotas

I se aprecia un incremento mucho más notable de las distancias genéticas FSTs especialmente hacia la región sureste (coincidiendo con la región 5 de la *figura 56*), y especialmente en los yacimientos de Los Tolmos, El Cerro y El Cementerio, reduciéndose progresivamente hacia el oeste y el norte. Aquí se aprecia de nuevo la diferente composición espacial durante el periodo Protocogotas I, probablemente provocado por esta nueva llegada de poblaciones exógenas, que llegarían desde el sureste y en un principio se encontrarían más aisladas de las poblaciones ya asentadas en la región, sin mezclarse. Finalmente durante el periodo Cogotas I respecto del Protocogotas I dejan de observarse estas diferencias, reduciéndose considerablemente las distancias genéticas, lo que implicaría que la cultura Cogotas I continuaría con una composición genética similar a la de sus antecesores Protocogotas I. (*Figura 56*).

Por otro lado, el segundo enfoque que se ha planteado como alternativa, propondría una situación en la que los cambios que hayan podido tener lugar en la composición genética de las poblaciones estudiadas, pueden no ocurrir de manera puntual o brusca, sino de manera gradual. En tal caso podrían no observarse diferencias significativas entre dos grupos poblacionales de periodos crono-culturales inmediatamente sucesivos, pero si transcurre más tiempo, y comparamos el primero con el último se podría advertir un cambio notorio entre las poblaciones. En este el cambio ha sido gradual y por ello no se ha percibido analizando poblaciones inmediatamente consecutivas en el tiempo. En definitiva, este enfoque busca diferencias acumuladas, no cambios repentinos, y nos permite observar cambios progresivos en el tiempo. En las gráficas de la *Figura 57* de resultados observamos que no hay distancias significativas hasta el Bronce Antiguo, cuando se comienza a ver cierto grado de diferenciación respecto de las poblaciones anteriores hacia la región noreste (yacimiento de la Cueva de la Revilla (n=8)), a diferencia de lo que ocurría si comparábamos la Edad del Bronce Antiguo con sus inmediatos predecesores del Campaniforme, entre los cuales no se observaba una distancia genética significativa entre los pobladores de la Cueva de la Revilla y los Campaniformes (en la *Figura 56*); por lo que esta diferenciación tiene lugar al incluir en el análisis las poblaciones preCampaniformes, es decir, es un cambio claramente acumulativo, como el planteado según el enfoque 2. Posteriormente esta diferenciación se extiende hacia la zona centro y sureste durante el periodo Protocogotas I ocupando toda la franja este y reduciéndose las distancias genéticas respecto de poblaciones anteriores progresivamente hacia el noroeste. Durante la Cultura Cogotas I no se aprecian distancias genéticas significativas respecto de las culturas anteriores, probablemente durante este periodo las poblaciones llegadas durante Bronce Antiguo y Protocogotas I se han mezclado con la población autóctona difuminando el efecto y haciendo que las distancias genéticas se reduzcan en este último tramo. Si solo se dispusiera de la información aportada por este segundo enfoque podríamos plantear la posibilidad de que las poblaciones inmigrantes llegadas a lo largo del Bronce Antiguo y el periodo Protocogotas I se hubieran retirado y de ahí que durante la fase de auge de la cultura Cogotas I ya no hubiera diferencias significativas respecto de las poblaciones anteriores. Sin embargo esto no es admisible, ya ha de tenerse en cuenta también el primer enfoque que indicaba que las distancias genéticas entre Protocogotas I y Cogotas I tampoco son significativas (*Figura 56*), como debería suceder si existiera una retirada de las poblaciones llegadas durante el periodo Protocogotas I. La combinación de enfoques apunta hacia una disolución del efecto de llegada de la nueva población, que seguramente se mezclaría con la población endógena homogenizándose a las poblaciones anteriores al periodo Progocogotas I.

Como conclusión final de este apartado, puede afirmarse que existió un flujo genético diferente llegado desde el este de la Submeseta norte a finales del Bronce Antiguo y con mucha más intensidad durante el periodo Protocogotas I. Este flujo se va extendiendo progresivamente desde la región sureste de la Submeseta norte hacia el resto, y su efecto se diluye posteriormente hacia el periodo Cogotas I, probablemente porque la población inmigrante se irá mezclando progresivamente con la población endógena. Convendrá manejar este dato en la discusión arqueológica acerca de la formación de toda la cultura de Cogotas I, que parece haber tenido un foco importante en la zona soriana (coincidente con la región 5) (*Fernández Posse, 1982: 479480; Jimeno, 1988: 116; Rodríguez Marcos, 2012*), región dónde los datos genéticos obtenidos sugieren un posible origen o lugar de entrada de dicha cultura hacia la Submeseta Norte.

6.3.1.4 Discusión Sobre El Estudio De Los Haplogrupos. Característicos De Cada Periodo Analizado

Para conocer a que haplogrupos mitocondriales están ligados estos cambios podemos observar los mapas que representan las frecuencias de cada uno de los haplogrupos predominantes a lo largo de los distintos periodos crono-culturales (*Figuras 58, 59, 60, 61, 62 y 63*).

Los datos son escasos para poder establecer orígenes filogenéticos fiables de cada haplogrupo, sin embargo con los resultados obtenidos es posible obtener cierta orientación sobre los mismos. Uno de los resultados más reseñables es una fuerte vinculación del haplogrupo K con el periodo PreCampaniforme, siendo la frecuencia de dicho haplogrupo muy elevada durante el PreCampaniforme y reduciéndose progresivamente en los periodos posteriores (*Figura 58*), lo cual índica que el componente del haplogrupo K muy probablemente esté ligado a la ya observada diferenciación genética de la pobalción PreCampaniforme respecto de periodos posteriores. Otro dato importante que puede observarse, en este caso en la Figura 62, es la repentina aparición del haplogrupo U durante el Bronce Antiguo y la intensificación de la frecuencia de este haplogrupo durante el periodo Protocogotas I; este segundo dato hace pensar que probablemente este haplogrupo U esté relacionado con el marcado cambio en la composición genética registrado a lo largo de estos dos periodos crono-culturales; siendo con seguridad un haplogrupo característico, quizá junto con el HV0 , de las poblaciones que llegan a la Submeseta en ese momento (Bronce Antiguo - Protocogotas I) (Ver *Figura 62*).

En el análisis de correspondencias (*Figura 64*) se corrobora la información señalada anteriormente. De modo que de nuevo observamos una clara asociación entre el preCampaniforme y el haplogrupo K, que sería muy representativo de este periodo. Del mismo modo el haplogrupo H está muy vinculado al Campaniforme, durante el cual ya observamos que alcanzaba sus máximas frecuencias (*Figura 59*). Y el haplogrupo HV0 se asocia íntimamente con el conjunto Protocogotas durante el cual también alcanzaba su máxima (*Figura 60*). También se observa una vinculación cercana del haplogrupo U con los periodos Bronce Antiguo y Protocogotas I, tal como ya se percibía ya en la *Figura 62*. Todo ello confirma lo planteado

en el párrafo anterior; una clara asociación del periodo PreCampaniforme con el haplogrupo K y una asociación más o menos clara del Bronce Antiguo y la cultura Protocogotas I con los haplogrupos U y HV0; pudiendo ser estos los haplogrupos implicados en los cambios genéticos sucedidos en estos periodos crono-culturales.

En la *figura 65* del apartado 5.2.1.2 pueden observarse los resultados obtenidos tras el análisis de correspondencias de los principales haplotipos respecto de los periodos crono-culturales establecidos. De nuevo en este análisis se corrobora la asociación entre el haplogrupo K y el periodo PreCampaniforme, así como la asociación de haplotipos propios de los haplogrupos U y HV0 con el periodo Protocogotas I y del Bronce Antiguo también con haplotipos propios del haplogrupo U (y en menor medida del I y el H). De modo que en este apartado también se confirman las asociaciones observadas entre periodos y haplogrupos que ya aparecían con el análisis de correspondencias de haplogrupos, así como en los mapas de distribución de frecuencias de haplogrupos (*Figuras 59, 60, 61, 62 y 63*).

En el network del haplogrupo H representado en la *Figura 66* no se observa una evolución clara de dicho haplogrupo a través de los diferentes periodos crono-culturales estudiados, de hecho la raíz aparece en un individuo de la Cueva de la Revilla (Bronce Antiguo – Protocogotas I) y posteriormente se observan conjuntos PreCampaniformes (coloreados en verde) con mayor número de mutaciones. Esto podría apuntar a que el haplogrupo H ya estaba presente con anterioridad en la Península, y ello hace que haya gran heterogeneidad entre los haplotipos que le componen, no habiendo una clara linealidad temporal entre ellos, lo que significa que tendrían múltiples orígenes diferentes. Es decir, los conjuntos poblacionales del haplogrupo H de la Edad del Bronce, no parecen proceder del mismo linaje de las poblaciones que presentaban este mismo haplogrupo durante el Calcolítico, sino que parecen tener orígenes diferentes, al menos en lo relativo a los individuos analizados en esta tesis.

En cuanto al haplogrupo HV0, en la *Figura 67* con los datos obtenidos en esta tesis, se sitúa el origen de este haplogrupo en conjuntos Protocogotas I y del Soto Formativo, a pesar de su distanciamiento temporal. Esto podría deberse a que ese individuo del Soto Formativo sea un reducto procdente del periodo Protocogotas I, pero al tratarse de un único individuo no puede realizarse ninguna discusión poblacional sobre este periodo. A partir de ese origen principalemnte Protocogotas I, aparecen en ramas derivadas (con acumulación de mayor número de mutaciones) otros conjuntos también Protocogotas o cronológicamente posteriores, como los de El Cerro (Protocogotas I), o La Requejada (Cogotas I); pero también surgen ramas de grupos anteriores en el tiempo, como por ejemplo El Mirador (Segovia), del periodo Campaniforme o la Cueva de la Revilla (que va desde el Bronce Antiguo hasta el periodo Protocogotas I). En este caso al igual que ocurría con el haplogrupo H, tampoco se observa un origen común de los haplotipos pertenecientes al haplogrupo HV0 de periodos posteriores, de modo que los grupos del haplogrupo HV0 de poblaciones Protocogotas I y del Soto Formativo no parecen derivar de las que ya existían durante el Campaniforme, si no que parecen proceder de un origen diferente, o bien podrían haber tenido lugar a partir de los mismos haplotipos que se hayan desarrollado perdiendo mutaciones en lugar de acumulándolas.

En el network del haplogrupo K (*Figura 68*) por primera vez observamos una linealidad cronológica: En efecto, se aprecia que los haplotipos del haplogrupo K del periodo Protocogotas I (concretamente los del yacimiento de Los Tolmos, representados en violeta), sí parecen derivarse de haplotipos que ya se observaban durante el preCampaniforme (concretamente de los yacimientos de los Cercados y Los Areneros, representados en verde). Del mismo modo también se observa que el individuo del yacimiento de Santa Cruz de Cabezón, deriva de un haplotipo ya presente en el preCampaniforme (2CER), como sucede con el del individuo 5REV de la Cueva de la Revilla (Bronce Antiguo-Protocogotas I, en rosa). En este caso, en la evolución de los haplotipos del haplogrupo K, si se observa cierta continuidad filogenética, que no era observable en los haplogrupos H y HV0, seguramente debido a que esos otros haplogrupos presentaban mucha más heterogeneidad, frente a este que probablemente fuera menos frecuente en periodos anteriores a la cultura PreCampaniforme. Este sería un dato a favor de que muchos de los haplotipos característicos del haplogrupo K llegaran durante el PreCampaniforme y se desarrollaran dando origen a los Ks de periodosposteriores en el tiempo, teniendo todos ellos un origen común. Pero esa cuestión se analizará con posterioridad a través de las comparaciones con otras poblaciones cronológicamente anteriores.

Finalmente, en el caso los haplotipos pertenecientes al haplogrupo U del periodo Protocogotas I (en violeta) (*Figura 69*), si parecen presentar un origen en el Bronce Antiguo, concretamente en el yacimiento de la Revilla (rosa). Sin embargo observamos un individuo preCampaniforme (Camino de Trascabañas, en verde) que parecería derivarse de un conjunto cronológicamente posterior, lo cual indicaría que debió de haber más de un origen en el desarrollo del haplogrupo U de la Submeseta Norte; al igual que ocurría con los haplogrupos H y HV0.

6.3.2 Discusión Sobre El Análisis De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis En Su Contexto Temporal Respecto A Poblaciones Anteriores Y Posteriores De La Península Ibérica

Hasta el momento conocemos las características, cambios y similitudes entre las poblaciones que habitaron la Submeseta norte de la Península Ibérica entre el preCampaniforme y la cultura Cogotas I. Sin embargo, los resultados arrojan algunas dudas cuando desconocemos la composición de las poblaciones anteriores y posteriores a dichos periodos. Un claro ejemplo, sobre todo se plantea, en el caso del preiodo preCampaniforme, que percibimos hasta ahora como un periodo temporal durante el cual las poblaciones presentan composiciones genéticas notablemente diferentes a las que vendrán posteriormente, por ejemplo la de Protocogotas I. Sin embargo desconocemos si esas poblaciones preCampaniformes son continuadoras de las que ya existían durante el Neolítico y el Megalitismo, o si por el contrario esa composición genética de la población viene dada por un cambio puntual surgido en ese concreto momento de la prehistoria.

Para intentar contribuir a la respuesta a esta pregunta se ha llevado a cabo una segunda parte del análisis de resultados poblacionales asociados al análisis del ADN mitocondrial.

Así, para conocer los cambios que pudieron acontecer entre las poblaciones estudiadas en la presente tesis con respecto a las poblaciones anteriores y posteriores, y de este modo poder explicar la continuidad o discontinuidad genética de conjunto, se ha construido una base de datos tal como se indica en el apartado 4.2.3.2.4.1 de material y métodos. Sobre ese conjunto de datos añadidos a los obtenidos en esta tesis se desarrollan los dos siguientes puntos de la discusión (6.3.2.1 y 6.3.2.2).

6.3.2.1 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas Fsts Según Un Criterio Cronológico

Del mismo modo que se procedió anteriormente, para la realización del análisis diacrónico se han creado un conjunto de grupos formados por distintas poblaciones a partir de los cuales se ha efectuado el análisis de la varianza molecular (Amova) y el estudio de distancias genéticas FSTs. La agrupación de los diferentes conjuntos utilizada para este análisis se describe en el punto 4.2.3.2.4.2.

El resultado de la Amova (*Tabla 61*) muestra valores bajos de variabilidad molecular entre los grupos establecidos, en la misma línea que venía ocurriendo en las poblaciones específicamente analizadas en esta tesis, pero como vimos anteriormente ahora arrojan una varianza ligeramente superior (1,97 > 1,74). En cualquier caso, para poder conocer en detalle las diferencias y / o semejanzas entre grupos, se ha analizado la varianza molecular entre grupos dos a dos (*Tabla 62*).

Ahora sí podemos responder la pregunta planteada en el apartado 6.3.1.1.1 sobre si las poblaciones del PreCampaniforme son únicamente diferentes de sus predecesores (Campaniformes y de la Edad de Bronce) siendo similares a poblaciones anteriores en el tiempo o si por el contrario también se diferencian de las poblaciones anteriores del Neolítico y el Megalitismo, lo cual es un dato clave para conocer si de manera previa a la llegada de la cultura Campaniforme (durante el Precampaniforme) tuvo lugar la llegada de contingentes humanos que portarían esa cultura, o si por el contrario fue desarrollada por las mismas personas que ya habitaban la Península durante periodos crono-culturales anteriores. En la *Tabla 62* se percibe que el preCampaniforme presenta varianzas moleculares elevadas respecto de sus antecesores del Neolítico (Amova de 11,36), Paleolítico y Mesolítico (Amova de 11,28), lo que vendría a defender la segunda hipótesis planteada en el apartado 6.3.1.1.1 de la discusión. Los Campaniformes presentan elevada varianza molecular respecto del Bronce Antiguo (Amova de 15,50), pero con el resto de grupos su varianza molecular es media o baja, y especialmente baja respecto del grupo Cogotas I. Del mismo modo los Cogotas I presentan una varianza molecular elevada respecto de los componentes del Bronce Antiguo (19,44), lo que marca una diferenciación entre estas dos poblaciones (Bronce Antiguo y Cogotas I) y de una forma más leve entre Cogotas I y sus antecesores Protocogotas I (amova 11,80). Los grupos poblacionales actuales, del siglo XXI, parecen molecularmente similares a todos los conjuntos .

Esta última información es poco resolutiva, pero en resumen se podrían intuir tres posibles cambios en la composición genética a lo largo del tiempo, el primero consistiría en una diferenciación genética entre los PreCampaniformes y sus antecesores del Neolítico y el Paleolítico; el segundo cambio tendría lugar durante el Bronce Antiguo respecto del Campaniforme; y finalmente entre Cogotas I y las poblaciones del Bronce Antiguo y Protocogotas I.

No obstante, para completar esta discusión es necesario analizar las distancias genéticas FSTs obtenidas entre los distintos grupos. El gráfico MDS de la *figura 70* muestra al conjunto preCampaniforme notablemente alejado del resto de poblaciones, tanto anteriores como posteriores en el tiempo, y si observamos la matriz de distancias de la hoja MFST59 del archivo S.1 podemos comprobar que concretamente, el grupo preCampaniforme presenta distancias genéticas FST significativas respecto de sus inmediatos antecesores del Neolítico final como respecto de la posterior cultura Protocogotas I. Estos datos apoyarían lo que ya se señaló en el punto 6.3.1.1, donde se observaba un cambio importante en la composición genética de las poblaciones de Protocogotas I respecto del preCampaniforme, pero además aquí puede añadirse que estas poblaciones preCampaniformes además no parecen continuar con las características genéticas de sus inmediatos antecedentes Neolíticos, sino que los datos apuntarían más bien a un cambio importante en la población, que hace que las distancias genéticas entre Neolítico y preCampaniforme sean significativamente altas.

Otra distancia genética significativa que se puede observar es la establecida entre el conjunto Protocogotas I y el Neolítico Final, que es especialmente baja a pesar de la separación temporal que hay entre ambos periodos, con un valor de la distancia genética FST de Slatkin de 0,05050 (p = 0,000001). Este dato, del escaso distanciamiento genéttico entre Protocogotas I y Neolítico Final, parece apuntar hacia cierta similitud genética entre estas dos poblaciones tan alejadas en el tiempo, lo cual es llamativo y se comentará más adelante.

Del mismo modo que ocurría en nuestro análisis de distancias genéticas de los individuos analizados específicamente en esta tesis (apartado 6.3.1.1), en este apartado también es posible observar cierta distancia del grupo preCampaniforme respecto de los demás. De igual modo, este último dato no es tan claro en el análisis de la varianza molecular ya que este grupo presenta varianzas medias respecto de otros conjuntos, no apreciándose la diferenciación que ahora sí aparece mediante el análisis de distancias genéticas. De hecho, en la representación MDS (*Figura 70*) se aprecia que el grupos cronológicamente más cercanos al preCampaniforme, como el Neolítico, el Paleolítico o el Mesolítico, se sitúan más distantes genéticamente de éste (Precampanidorme) que de otros periodos más alejados cronológicamente, tales como los Protocogotas I (bastante próximo en la gráfica MDS al Paleolítico-Mesolítico) o Cogotas I (más próximo al Neolítico Final). Estos datos podrían apoyan la hipótesis de que tuvo lugar un cambio en la composición genética de las poblaciones durante el preCampaniforme, probablemente por la llegada de una población foránea, que posteriormente se iría mezclando progresivamente con la población autóctona, y de este modo se iría difuminando el efecto de esa llegada inicial, suavizándose las distancias genéticas que posteriormente se asimilaran de nuevo a las iniciales (Ver *Figura 70*).

En las representaciones MDS de la *figura 71* podemos analizar en qué momento concreto tienen lugar los cambios importantes en la composición genética de la población, cuándo surge un incremento en la distancia genética de cada conjunto crono-cultural respecto del grupo inmediatamente anterior en el tiempo, detectando dónde se encuentra la diferenciación.

El primer conjunto arriba a la izquierda (gráfica a de la *Figura 71*) muestra las distancias genéticas entre las poblaciones Paleolíticas-Mesolíticas y las del Neolítico Final, con cierto distanciamiento entre las poblaciones de uno y otro conjuntos, con excepción de los individuos paleolíticos de Erraya, que se asemejan bastante a los Neolíticos de la Cueva de Marizulo; sin embargo ninguna de las distancias representadas es significativa.

En el segundo gráfico (gráfica b de la *Figura 71*), arriba a la derecha, se representan las distancias genéticas del grupo preCampaniforme respecto de sus inmediatos antecesores del Neolítico Final. En este caso no parecen solaparse en ningún punto las áreas definidas por cada grupo, lo que indicaría una diferenciación genética clara, de hecho en este caso observamos distancias genéticas significativas (matriz de distancias genéticas MFST18 del archivo S.1. del material suplementario). Concretamente se dan distancias genéticas significativas entre nuestros yacimientos preCampaniformes y los referentes del Neolítico, así: Los yacimientos de Areneros y Cascajos (con una distancia genética de 0’19905, p = 0’018); y también entre Areneros y Fuentehoz (con una distancia genética FST de Slatkin superior a la anterior, de 0’3699; p = 0’036); además el yacimiento preCampaniforme de Los Cercados también muestra distancias genéticas significativas respecto de tres yacimientos del Neolítico Final: Cascajos (0’42230, p = 0’036), Fuentehoz (0’81373, p = 0’,000001) y Paternanbidea (0,39976, p = 0,09091). Con estos mismos yacimientos Neolíticos también presenta distancias genéticas importante y significativas el conjunto de El Tomillar (0’39093, p = 0’000001; 0’43623, p= 0’000001; 0’43232, p= 0’000001; respectivamente). En definitiva, se observa que existen diferencias marcadas entre las poblaciones del Neolítico Final y las poblaciones Calcolíticas del preCampaniforme (la información relativa a las distancias genéticas está disponible en la matriz de distancias MFST18 del archivo S.1. del material suplementario). Siendo una diferenciación amplia, que no se reduce a un único yacimiento PreCampaniforme, sino que parece ser una tendencia amplia.

La gráfica c , de la *figura 71*, representa las distancias genéticas entre preCampaniformes y Campaniformes, también en este caso parece que ambos grupos no se solapan, y se localizan aislados unos de otros, pero si analizamos más de cerca las distancias genéticas (Matriz MFST19 del archivo S.1. del material suplementario), observamos que no son significativas en ningún caso; esto en parte podría deberse a que el conjunto Campaniforme es reducido, pero si nos ceñimos a lo observado no podemos decir que existan diferencias significativas entre las poblaciones PreCampaniformes y las Campaniformes.

En la representación de poblaciones del Bronce Antiguo frente a Protocogotas I (gráfica d de la *Figura 71*) se observa que las poblaciones del Bronce Antiguo se solapan completamente con las Protocogotas I, lo cual indica una gran proximidad genética. Sólo se observa una distancia genética significativa entre el yacimiento del Bronce Antiguo – Protocogotas I de la Cueva de la Revilla y el yacimiento Protocogotas I de

Los Tolmos (con una distancia genética FST de Slatkin de 0,24353; p = 0,036) (Matriz MFST20 del archivo S.1. del material suplementario). Pero como el yacimiento de Los Tolmos también muestra distancias genéticas significativas respecto de otros yacimientos de su mismo periodo crono-cultural; es muy probable que esta diferencia no sea explicada en términos cronológicos. Por lo tanto, en general se puede afirmar que las poblaciones del Bronce Antiguo son muy similares a las Protocogotas I, no observándose distancias genéticas significativas entre ellas, lo cual se manifiesta en la gráfica d de la *figura 71*, en la que las áreas de los dos periodos se superponen perfectamente.

Finalmente en el análisis de yacimientos Protocogotas I frente a Cogotas I (gráfica e de la *figura 71*), también parece que ambas poblaciones son bastante similares, ya que no se observan distancias genéticas significativas entre yacimientos de uno y el otro periodos. Sin embargo de nuevo llama la atención el hecho de que el yacimiento de Los Tolmos se encuentra significativamente alejado de otros yacimientos del mismo periodo Protocogotas I (ver la matriz MFST21 del archivo S.1 del material suplementario). Pero entre Cogotas I y Protocogotas I no existen diferencias apreciables.

Como resumen de esta primera parte del análisis cronológico podemos destacar que se confirma de nuevo una diferenciación clara entre las poblaciones preCampaniformes y Protocogotas I. Además en este caso también podemos confirmar que las poblaciones PreCampaniformes son también distintas a las que habitaban la Península Ibérica durante el Neolítico final, por lo que muy probablemente durante el periodo PreCampaniforme tuvo lugar la llegada de población inmigrante procedente de otras regiones que posteriormente se iría asimilando y mezclando con la población endógena. Un fenómeno similar tendría lugar de nuevo durante el periodo Protocogotas I, aunque hemos percibido cierto grado de similitud en la composición genética de las poblaciones Protocogotas I y las del Neolítico final, que comparten una varianza molecular muy baja (AMOVA de 0,15), lo cual podría indicar un incremento de la población residual del Neolítico Final durante el periodo Protocogotas I, o su llegada desde otras regiones. A continuación esta información se completará de manera más amplia con los datos geográficos, siendo revisado de nuevo de manera conjunta en el punto 6.3.2.3 de la discusión.

6.3.2.2 Análisis De La Varianza Molecular Y De Las Distancias Genéticas FSTs Según Criterios Geográficos

Del mismo modo que ya se planteó en la primera parte del análisis de resultados del ADN mitocondrial, aquí también se ha realizado un análisis sincrónico-espacial de los resultados. Las divisiones geográficas establecidas son las representadas en la *Figura 41* y se pueden consultar las agrupaciones establecidas en el punto 4.2.3.2.4.3 de material y métodos.

En este caso el análisis de la varianza molecular, Amova, muestra una varianza de 6’02 entre los distintos grupos geográficos establecidos, que sigue muy en la línea de la tendencia observada en el análisis de las muestras de esta tesis de manera exclusiva, siendo superior a la varianza entre grupos cronológicos (Ver *Tabla 63*). Como se hizo anteriormente, también se ha analizado la varianza molecular entre grupos

dos a dos; y en este caso se perciben varianzas moleculares en general algo superiores a las observadas en análisis anteriores (por encima de 10), siendo las más elevadas las que tienen lugar entre la región 6, frente a la región 1 (Amova de 29,08), frente al conjunto de la región 5 (Amova de 19,45) y de la región 2 (18,72). También se observa varianza elevada entre la región 7 y la 4 (19,97). Por el contrario las menores varianzas moleculares se establecen entre la región 2 y la 3 (Amova de 0,59), entre la región 4 y 5 (Amova 0,13), y finalmente entre las regiones 3 y 7 (Amova de 0,85) (*Tabla 64*). En un principio podríamos hablar de mayores diferencias entre las regiones levantinas y el interior si centramos la atención en la región 6, pero cuando observamos la región 7 (también de la costa levantina), a pesar de que muestra divergencia respecto de la áreas 4, 1 y 2, parece presentar grandes similitudes con el área o región 3; lo que iría contra la hipótesis de que exista una diferenciación clara entre las poblaciones de la costa y del interior. Sin embargo, con estos datos no resulta sencillo establecer un patrón de diferenciación genética según criterios geográficos, por lo que vamos a analizar los resultados del análisis de las distancias genéticas FSTs, para poder discernir posteriormente una visión más amplia.

En la *figura 72* podemos observar la representación MDS de las distancias genéticas FSTs establecidas entre los conjuntos constituidos por las siete diferentes regiones geográficas. Aquí también se aprecia un cierto distanciamiento genético de la región 6 respecto del resto (excepto la región 7), teniéndo lugar la mayor distancia genética observada entre las regiones 2 y 6 (0,2458, p = 0,009). En el polo opuesto tendríamos la distancia entre las regiones 2 y 3, que es significativamente corta (0,035, p = 0,000001). Entre la región 4 y 7 también se observa una distancia significativa (0,22; p = 0,018) (consultar los datos de la matriz de distancias genéticas MFST60 del archivo S.1. del material suplementario, y la *figura 72*). De nuevo estos datos apoyarían cierta diferenciación entre algunas regiones levantinas (mayoritariamente de la región 6) respecto de las poblaciones del interior, sin embargo para comprobar si se trata o no de un factor geográfico o tiene que ver en mayor medida con cuestiones cronológicas, es necesario profundizar en el análisis y comprobar con que yacimientos concretos y entre qué periodos está teniendo lugar esa diferenciación

Para valorar más detalladamente las distancias genéticas entre los yacimientos de cada una de las regiones, se han realizado análisis dos a dos, que pueden consultarse en los gráficos MDS de la *Figura 73*, ya que de este modo no diferenciamos si el distanciamiento genético se debe a cuestiones puramente geográficas o más bien a una causa cronológica.

En la gráfica a de la *Figura 73*, podemos observar que el área constituida por la región 1 se encuentra completamente contenida dentro del área que representa la región 2, presentando distancias muy cortas entre los yacimientos de Cantoblanco (n=1)(cultura Cogotas I, región 1) y La Pasiega (n=1) (Paleolítico, región 2), así como entre los yacimientos re la región 1 Santioste (n=1) (Bronce Antiguo) y Cañamonas (n=1) (Protocogotas I) respecto de los yacimientos de la Erraya (n= 1) y La Chorra (n=1) (ambos Paleolíticos) de la región 2. En ninguno de estos casos la distancia fue significativa (seguramente dados los pequeños tamaños muestrales de cada yacimiento), aunque se aprecia gran proximidad entre ellos. Sin embargo dentro de la misma región 2, existen conjuntos muy diferenciados, con distancias genéticas FSTs significativamente

grandes entre ellos, en especial se da entre El Cerro (n=3) (Protocogotas I) y los yacimientos Neolíticos de Cascajos (n=27) (0'4812; p = 0'000001), Fuentehoz (n=6) (1; p = 0'000001), y Paternanbidea (n=8) (0'7401; p= 0'009) (*Figura 73* y matriz de distancias genéticas MFST23 del archivo S.1. de material suplementario). En conclusión podemos decir que no se aprecian diferencias signficativas entre la región 1 y la región 2, existiendo más diferenciación genética dentro de la misma región a través de periodos temporales distintos que entre las dos regiones; pero muy probablemente esto sea consecuencia del sesgo producido por los pequeños tamaños muestrales de muchos de los yacimientos.

En la gráfica b de la *figura 73*, podemos observar de nuevo el área correspondiente al a región 1 contenida dentro del área correspondiente a la región 3, presentando distancias genéticas cortas entre sí el yacimiento Cogotense de Cantoblanco (n=1) (de la región 1) y el de San Pelayo (n=1) (Soto Formativo de la región 3). Sin embargo el bajo tamaño muestral de estos yacimientos impide que esta cercanía sea significativa. Las únicas distancias genéticas significativas se observan de nuevo entre yacimientos de la misma región (en este caso de la región 3), concretamente entre el yacimiento Protocogotas I de Tordillos (n=8) y los yacimientos PreCampaniformes de Cercados (n=3) (0'57; p = 0'05) y El Tomillar (n=5) (0'33; p = 0'000001), pero esa diferenciación genética seguramente viene dada por cuestiones cronológicas más que geográficas (matriz de distancias genéticas MFST24 del archivo S.1. del material suplementario).

Las distancias genéticas observables en el gráfico c de la *figura 73*, correspondiente a la región 1 y la región 4, muestran gran proximidad entre algunos yacimientos de dichas regiones, concretamente entre el yacimiento Cogotas I de Cantoblanco (n=1)(región 1) respecto de Rivas Vaciamadrid (n=1) (Campaniforme de la región 4); y entre Santioste (n=1) (Bronce Antiguo de la región1) respecto de Pajares de Adaja (n=1) (Campaniforme de la región 4); dados los pequeños tamaños muestrales de todos estos casos, las distancias calculadas no resultan significativas (matriz de distancias genéticas MFST25 del archivo S.1 del material suplementario). Pero en general, parece no existir diferenciación genética clara entre los individuos de la región 1 y los de la región 4.

Entre la región 1 y la región 7 (gráfico d de la *Figura 73*) se observa gran distanciamiento genético, no solamente entre los yacimientos de cada región sino además entre los de cada una de las regiones; ciertamente los datos no son concluyentes por el reducido tamaño muestral de cada conjunto, pero da la impresión de que en este caso sí podrían estar manteniéndose aisladas las dos regiones (1 y 7), que por otro lado son las más distanciadas geográficamente.

En la gráfica e de la *Figura 73*, observamos las distancias genéticas entre los yacimientos que componen la región 2 y la región 3. A primera vista parece observarse un enorme solapamiento entre las áreas de las dos regiones, lo que nos indica una gran proximidad genética entre los individuos que habitan una y otra región. Sin embargo si se observan distancias genéticas significativas entre algunos yacimientos, concretamente entre los yacimientos neolíticos de Los Cascajos (n=26), Fuentehoz (n=6) y Paternanbidea (n=9) respecto de los yacimientos preCampaniformes de Los Cercados (n=3) (0'422; p = 0'036 respecto de yacimiento de Cascajos; 0'595; p = 0'000001, respecto del yacimiento de Fuentehoz) y El Tomillar (n=5) (0'390; p = 0'000001 respecto de Cascajos; y 0'3620; p = 0'000001, respecto de Fuentehoz; y 0'4323; p =

0’000001, respecto de Paternanbidea) (matriz de distancias genéticas MFST23 del archivo S.1. de material suplementario), aunque en estos casos concretos probablemente la causa del distanciamiento genético sea más debida a un cambio crono-cultural que a un alejamiento geográfico. Por lo tanto, debemos decir que no existe una diferenciación genética entre las regiones 2 y 3 por criterios puramente geográficos, encontrándose íntimamente relacionadas.

En la comparación entre Región 2 y Región 4 (observable en gráfico f de la *figura 73*), observamos distancias genéticas significativas entre los yacimientos preCampaniforme de Areneros (n=9) y Protocogotas I de Los Tolmos (n=4) respecto de los yacimientos Neolíticos de Fuentehoz (n=6), Cascajos (n=26) y Paternanbidea (n=9); sin embargo, al igual que ocurría antes, muy probablemente ahora también se deba al distanciamiento cronológico más que geográfico. Además se observan distancias genéticas significativas también entre yacimientos Protocogotas I que se sitúan en diferentes regiones geográficas, este es el caso que tiene lugar entre el yacimiento de Los Tolmos (n=4) y el yacimiento de El Cerro (n=5) (entre los que hay una distancia genética FST de Slatkin de 1; p = 0,027) y entre Los Tolmos (n=4) y los yacimientos de Los Rompizales (n=5) y Carrelasvegas (n=1) (0,39499 ; p = 0,018). Esto indicaría una cierta diferenciación genética entre las dos áreas geográficas durante el periodo Protocogotas I, fundamentalmente dada por el componente del yacimiento de Los Tolmos en la región 4, que difiere sustancialmente de los yacimientos Protocogotas I de la Región 2 (matriz de distancias genéticas MFST28 del archivo S.1. de material suplementario). Este dato es acorde con lo observado en el punto 6.3.1.2, lo cual apunta a una diferenciación genética clara entre las poblaciones del norte y el sur en la región este de la Submeseta Norte de la Península Ibérica durante el periodo Protocogotas I, muy asociado principalmente al yacimiento de Los Tolmos; esto podría estar índicando la llegada de una nueva población genéticamente diferente a la prexistente que en un principio se mantendría aislada de las poblaciones de regiones contiguas.

En la gráfica g de la *figura 73*, observamos que no se aprecian distancias genéticas importantes entre los yacimientos ubicados en la región 2 y los ubicados en la región 5, estando el área que representa esta última completamente integrada dentro del área de la región 2.

Pasando a la comparación entre los yacimientos de las regiones 2 y 6, (gráfica h de la *Figura 73* y en la matriz de distancias MFST30 del archivo S.1. del material suplementario), observamos que existen distancias genéticas significativas entre el yacimiento Neolítico de San Pau (n=3) (Región 6) y los yacimientos Neolíticos de la región 2 (Cascajos, con una distancia genética FST de Slatkin de 0’2919, p = 0’009 ; Fuentehoz, con una distancia de 0’3947, p =0’018 ; y Paternanbidea, 0’2426, p = 0’000001). Esto muestra que durante el Neolítico las poblaciones analizadas de la región norte (región 2) y las de Levante (región 6) ya eran sustancialmente diferentes entre sí, lo cual apoyaría a las teorías que proponen ocupaciones en la región levantina por parte de poblaciones diferentes llegadas por vía maritima.

También entre las regiones 2 y 7, se observan distancias genéticas significativas entre el yacimiento del Neolítico Antiguo de Cansadurní (n=7), situado en la zona levantina, respecto de los yacimientos Neolíticos del Norte, concretamente en este caso Cascajos (0,259; p =0,000001) y Paternanbidea (0,238; p =0,018) (Gráfica i de la *Figura 73* y matriz MFST31 del archivo S.1. del material suplementario).

Entre los yacimientos de las regiones 3 y 4 de la Submeseta norte también se aprecia cierta diferenciación clara en la representación gráfica j de la *figura 73*. Es verdad que los yacimientos campaniformes del Mirador (n=1)(en la región 3) y Pajares de Adaja (n=1) (en la región 4) son muy próximos genéticamente, por lo que durante este periodo no parece apreciarse una diferenciación entre las dos regiones. En cambio, sí se aprecia durante otros periodos, por ejemplo durante el PreCampaniforme, existe una distancia genética considerable y significativa entre el yacimiento de Los Areneros (n=9) en la región 4 y el yacimiento de El Tomillar (n=5), en la región 3 (0,2838; p = 0,036) (ver gráfica j de la *Figura 73* y matriz de distancias genéticas MFST32 del archivo S.1. del material suplementario), esto sería un posible indicio de la llegada de contingentes humanos exógenos durante el PreCampaniforme, que en un principio no se mezclarían con la población endógena, de ahí la diferenciación genética entre grupos coexistentes en el mismo periodo. Una situación similar se observa de nuevo durante el periodo Protocogotas I, con una distancia genética significativa entre el yacimiento de Los Tolmos (n=5) y el de Tordillos (n=8) (0,4875; p = 0,018). Por lo que se aprecia, durante los dos periodos de cambio ya detectados, como son el preCampaniforme y el periodo Protocogotas I, una diferenciación genética entre los yacimientos que se sitúan en la región 3 y los situados en la región 4 de la Submeseta Norte.

Entre los yacimientos de la región 3 y la región 5 no se aprecian distancias genéticas significativas. Los de la región 3 y la 6, parecen mantenerse aislados en la gráfica l de la *figura 73*, pero las distancias genéticas entre ellos tampoco son significativas (matrices de distancias genéticas MFST33 y MFST34 del archivo S.1 del material suplementario). Probablemente en ambos casos debido a los pequeños tamaños muestrales de los yacimientos de las regiones 5 (n=4) y 6 (n=4). Entre las regiones 3 y 7 (gráfica m de la *Figura 73*) parece observarse la misma tendencia, sin embargo en este caso se registran distancias genéticas significativas entre el yacimiento de Cansadurní (Neolítico antiguo) respecto de los yacimientos PreCampaniformes de Los Cercados y El Tomillar (ambos PreCampaniformes); probablemente también más en relación con una cuestión temporal que geográfica (matriz de distancias genéticas MFST35 del archivo S.1 del material suplementario). Entre las regiones 4 y 5 (gráfica n de la *Figura 73*) tampoco se aprecian diferencias genéticas significativas, ni entre la 4 y la 6 (gráfica ñ de la *Figura 73*). Y entre las regiones 4 y 7 solamente se aprecia una distancia genética significativa entre el yacimiento neolítico de Can Sadurní (n=7) y el PreCampaniforme de Los Areneros (n=8) (0,284; p = 0,018) (matrices de distancias genéticas MFST36, MFST37 y MFST38 del archivo S.1 del material suplementario).

En general podemos concluir que tan sólo se han apreciado diferencias importantes entre yacimientos localizados en distintas regiones durante el periodo preCampaniforme y el Protocogotas I, pero no durante el resto de periodos crono-culturales estudiados. Aunque quede fuera de nuestros periodos de interés (los analizados de manera específica en esta tesis), se debe mencionar que también durante el Neolítico entre los yacimientos localizados al norte y en el Levante se aprecia cierta diferenciación genética significativa.

A razón de, por un lado haber subdividido los yacimientos Calcolíticos de la Submeseta norte en preCampaniformes y Campaniformes, en lugar de considerarlos Calcolíticos de forma global; y por otro lado haberse reducido considerablemente la n de los conjuntos levantinos por separarlos en diferentes

subregiones, no ha sido posible establecer si existe cierta diferencia o no en las composiciones genéticas de las poblaciones Calcolíticas del interior y las del Levante Español. Por esta razón, es interesante analizar la representación MDS de la *figura 74*, en la que se analizan las distancias genéticas existentes entre los yacimientos Calcolíticos (en general) de la Submeseta Norte y los localizados en las regiones costeras del Levante (para conocer la agrupación exacta de los conjuntos empleados en el análisis con el software Arlequin se puede consultar la segunda parte del punto 4.2.3.2.4.3 de material y métodos). En la *Figura 74* podemos observar que existe gran proximidad genética entre el único individuo levantino de la Cova de Malpaso y los yacimientos del interior de Santa Cruz de Cabezón (también con un único individuo) y Tablada de Rudrón (con 2 individuos); así como entre el individuo de Assud de Villareal y el individuo de El Mirador, que también comparten distancias genéticas cortas. Por otro lado, el yacimiento de San Segond de la Costa (n=2) parece ser el más alejado genéticamente de los yacimientos del interior peninsular. En cualquier caso, hay que subrayar que no se ha encontrado ninguna distancia genética significativa entre los yacimientos interiores y los de la región Levantina (ver matriz de distancias MFST41 del archivo S.1 del material suplementario). Tal vez si se aumentara el tamaño muestral esto podría verse modificado, pero con los datos disponibles hasta el momento no se puede decir que exista diferencia genética entre las poblaciones Calcolíticas del interior Peninsular y las de la región costera Mediterránea; aunque se aprecien ciertas similitudes genéticas entre individuos concretos del interior respecto de otros de costa, con los datos disponibles tampoco se puede saber si se trata de una tendencia extendida a toda la población.

6.3.2.3 Discusión Sobre El Análisis Combinado De Datos Cronológicos Y Geográficos

Se han calculado distancias genéticas FSTs entre todos los yacimientos como conjunto indiferenciado, sin atender a ninguna compartimentación crono-cultural o geográfica, y se han representado las distancias de Slatkin en un gráfico MDS (*Figura 75*) marcando con distintos colores las regiones geográficas a la que pertenece cada uno y con diversas figuras geométricas su periodo crono-cultural. La matriz de distancias genéticas correspondiente a este análisis está disponible en el material suplementario, matriz de la hoja MFST16 del archivo S.1 del material suplementario.

En cuanto a las regiones, la 1 y la 2 parecen estar muy integradas, presentando distancias genéticas cortas entre muchos de sus yacimientos. Por otro lado la región 3 muestra cierta cercanía con la 2 en algunos de sus yacimientos pero no con el resto de regiones. También la región 4 se encuentra más o menos cercana a las regiones 5, 6 y 7 en algunos yacimientos (que por otro lado también son más cercanas geográficamente), pero de nuevo se observa que está aislada respecto de las otras áreas del interior, tal como ya se percibía en el análisis específico de esta tesis en el que se observaba cierto aislamiento de las poblaciones de la región soriana, que se correspondería aproximadamente con esta región 4, aunque de un modo más extenso. En cuanto a los periodos crono-culturales, los yacimientos neolíticos (representados en forma de rombos) se mantienen bastante aislados del resto, estando en la parte superior izquierda del

gráfico los neolíticos de las regiones interiores y del norte y ligeramente por debajo de estos los neolíticos de la región levantina (en azul). Los yacimientos PreCampaniformes (en forma de pentágonos) se sitúan también en la periferia, pero a su vez, muy distantes unos respecto de otros, a excepción de Areneros que está relativamente más cerca de algunos de los Neolíticos de las regiones 5, 6 y 7 (Can Sadurní y Sant Pau concretamente). En cualquier caso, la visualización de las diferencias geográficas y cronológicas es más sencilla en el desglose anterior de las *figuras 71* y *73*.

Tal como se ha venido viendo, parece que durante el periodo preCampaniforme tuvo lugar la llegada de un flujo genético nuevo, quizá no de forma homogénea a todas las regiones ni a todos los yacimientos, y tal vez este hecho es el que hace que los grupos preCampaniformes se dispongan de forma tan dispersa en la *figura 75*, segregados en dos conjuntos básicos, uno formado por los yacimientos de Cercados y Areneros y el otro por El Tomillar y Trascabañas, unos podrían proceder de ese nuevo flujo genético y otros quizás ser endógenos o procedentes de otro flujo genético diferente. Para poder evaluar estas observaciones, es útil analizar los mapas en los que se han representado las distancias genéticas de cada periodo respecto del inmediatamente anterior (*Figura 76*), así como de cada grupo respecto del conjunto de todos los anteriores (*Figura 77*), para poder valorar dónde y en qué momento tienen lugar cambios en la composición genética de las poblaciones.

Procediendo como ya se hizo en el apartado anterior (6.3.1) se han realizado dos análisis diferentes, uno orientado hacia observar cambios puntuales entre periodos cronológicos consecutivos y el otro para analizar cambios acumulados en el tiempo o más bien graduales.

En el primer conjunto de mapas (análisis de periodos inmediatamente consecutivos, *Figura 76*), se observa un primer cambio en la composición genética de las poblaciones de manera puntual entre el Paleolítico y Neolítico final, en la región noreste, aunque dicho cambio no es muy intenso, ya que la mayor distancia FST observada no es muy elevada (0,18) (gráfica a de la *Figura 76 y m*atriz de distancias genéticas MFST42 del archivo S.1 del material suplementario). Este cambio parece continuar e intensificarse bastante durante el PreCampaniforme, que muestra cierta diferenciación respecto del Neolítico final (gráfica b de la *Figura 76*). Durante este periodo se observan distancias genéticas significativas entre todos los yacimientos PreCampaniformes, a excepción de Trascabañas, respecto de los yacimientos Neolíticos, siendo la distancia genética máxima de 0,5532 (p=0,009) (ver matriz de distancias MFST43 del archivo S.1 del material suplementario), concretamente en el yacimiento de los Cercados respecto de los yacimientos Neolíticos. Entre el periodo Campaniforme y el PreCampaniforme no se observa ninguna variación importante, al igual que ocurría en la primera parte del análisis (apartado 6.3.1) no parecen existir diferencias sustanciales entre los pobladores de la Submeseta norte entre el Campaniforme y el PreCampaniforme. Siguiendo en la misma línea, durante el Bronce Antiguo tampoco se observan distancias genéticas importantes respecto de sus inmediatos antecesores del Campaniforme, manteniéndose una composición genética de la población muy similar, aunque con una ligera diferenciación hacia el oeste (con distancias genéticas máximas de 0,09, no significativas). El siguiente cambio sustancial se observa en el paso entre Bronce Antiguo y Protocogotas I, con éstos últimos si se aprecian distancias FSTs de Slatkin significativas respecto

de sus inmediatos predecesores del Bronce Antiguo, siendo las mayores diferencias genéticas de hasta 0,29 (p = 0,009) en el yacimiento de Los Tolmos, respecto de sus antecesores del Bronce Antiguo (matriz de distancias genéticas MFST46 del archivo S.1 del material suplementario). Durante el siguiente periodo, cultura Cogotas I, no se aprecian diferencias respecto de los Protocogotas I. Con lo cual, en resumen podemos decir que los principales cambios en la composición genética de la Península a través de los periodos temporales estudiados, tienen lugar durante el periodo preCampaniforme, y mucho más tarde durante el periodo Protocogotas I.

En el conjunto de mapas de representación de cambios graduales acumulados en el tiempo podemos ver las distancias genéticas de cada uno de los periodos respecto de todos los periodos anteriores juntos (*Figura 77)*. En este análisis se corroboran exactamente los mismos cambios que veíamos en el análisis de cambios puntuales; con una única variación muy tenue que se da en el transcurso hacia el Bronce Antiguo (mapa d de la *Figura 77*), encontrando distancias genéticas inferiores si comparamos el Bronce Antiguo respecto de todos los periodos anteriores (con distancia genética máxima de 0,002), que si lo hacemos respecto de sus inmediatos predecesores Campaniformes (con distancia genética máxima de 0,09); esto quizá apunte a un cambio puntual (ya que la distancia es mayor respecto de sus inmediatos antecesores que respecto de la totalidad de poblaciones anteriores), pero muy leve, quizá por el pequeño tamaño muestral del Bronce Antiguo en comparación con otros grupos.

La aplicación combinada de los dos enfoques, nos permite decir que se aprecian dos cambios importantes en la composición genética de las regiones estudiadas a lo largo de los periodos analizados.

El primer cambio sustancial se da desde en el PreCampaniforme, cuando probablemente tendría lugar la llegada de una población exógena procedente de otra región (en lo que se refiere al componente femenino de la población, ya que el análisis se basa en el estudio del ADN mitocondrial) y posteriormente durante el Campaniforme el contingente exógeno se iría mezclando con la población autóctona, de modo que se disolverían esas diferencias genéticas, ya que en el Campaniforme no se aprecian distancias genéticas significativas respecto del PreCampaniforme, ni tampoco respecto del conjunto de todas las poblaciones anteriores. .

En segundo lugar, con la cultura Protocogotas I se aprecia un nuevo cambio importante en la composición genética de las poblaciones. De nuevo la modificación pudo deberse también a la llegada de nueva población foránea, que se asentaría mayoritariamente en la región sureste de la Submeseta Norte. Pero en este caso, podría tratarse también de la retirada o difuminación en cierto grado de la población que había llegado durante el preCampaniforme-Campaniforme, dando como resultado la afloración de conjuntos poblacionales con características genéticas propias de las poblaciones anteriores, ya que la población Protocogotas I se asemeja genéticamente a las poblaciones Neolíticas.

Para poder valorar a qué se deben estos cambios, y a qué haplotipos y haplogrupos están asociados, se ha hecho un estudio de la variación de las frecuencias de los haplogrupos a lo largo de los distintos periodos

temporales (*Figura 78*). Además, se ha llevado a cabo un análisis de correspondencias, para conocer la asociación de distintos grupos crono-culturales a los diferentes haplogrupos y para valorar además la proximidad y/o distanciamiento entre los diferentes conjuntos crono-culturales (*Figura 79*); todo ello es discutido en el siguiente punto, 6.3.2.4.

Las matrices de distancias genéticas correspondientes al análisis de cambios graduales acumulados en el tiempo están disponibles en las hojas MFST48, MFST49, MFST50, MFST51, MFST52 y MFST53, del archivo S.1 del material suplementario.

6.3.2.4 Discusión Sobre El Estudio De Los Haplogrupos Característicos De Cada Periodo Analizado

Para conocer más de cerca la composición de haplogrupos de cada periodo estudiado y en consecuencia valorar las semejanzas y diferencias en este sentido entre periodos y asociar determinados haplogrupos a cada uno de los periodos, se van a consultar los resultados obtenidos a partir del análisis de correspondencias y el gráfico de la evolución de los haplogrupos de las *Figuras 78 y 79*.

En ambos gráficos (*Figuras 78 y 79*) se puede observar que los haplogrupos H y U alcanzan su frecuencia máxima durante el Neolítico Final, para después caer en picado durante el PreCampaniforme; volviendo a aflorar de nuevo de forma patente durante el desarrollo de la cultura Protocogotas I. Este hecho sería un dato a favor de que el cambio en la composición genética de las poblaciones Protocogotas I venga dado por una retirada del componente poblacional llegado en el preCampaniforme, que hiciera aflorar de nuevo componentes genéticos ya existentes durante periodos anteriores, como los haplogrupos H y U del Neolítico. Además, también durante el desarrollo de la cultura Protocogotas I se incrementa notablemente la frecuencia de aparición del haplogrupo HV0, que es claramente característico de esta época (*Figura 78*). En cuanto al periodo preCampaniforme, observamos en el análisis de correspondencias (*figura 79*) que está muy asociado al haplogrupo K, información afianzada a demás por el *gráfico 77*, en el que se observa también la máxima frecuencia de este haplogrupo K durante el periodo PreCampaniforme. Este resultado se había advertido ya durante el primer análisis (discutido en el apartado 6.3.1); por lo que es muy probable que este haplogrupo esté asociado a la llegada de población exógena durante este periodo crono-cultural. Tras el periodo preCampaniforme, el haplogrupo K se reduce de nuevo, probablemente debido bien a la mezcla entre las poblaciones inmigrantes y las endógenas, o bien a una cierta retirada del contingente inmigrante que portó ese haplogrupo.

Si la citada retracción del haplogrupo K se debiese a ese último factor, la retirada tendría efecto máximo durante el periodo Protocogotas I, en el que se aprecia un cambio importante en la composición genética de las poblaciones, que están asociadas a haplogrupos propios del Neolítico, como el H y el U. Pero además durante este periodo Protocogotas I también tendría lugar una nueva llegada de población diferente que portaría el haplogrupo HV0, apenas presente con anterioridad.

6.3.2.5 Discusión Sobre El Análisis Comparativo De Las Poblaciones Estudiadas En La Presente Tesis Respecto De Otras Poblaciones Contemporáneas De La Submeseta Norte Y Europa

En Agosto de 2014 han sido publicadas las primeras secuencias Calcolíticas de la Submeseta Norte, correspondientes a la población del yacimiento de la Cueva del Mirador, en Atapuerca (Burgos) (*Gómez-Sánchez et al., 2014*), situada en la misma localidad burgalesa que la Cueva de la Revilla, de la que se han estudiado en este trabajo un conjunto de 8 individuos. Por ello, se ha considerado interesante comparar las poblaciones analizadas en esta tesis con la población de esa Cueva del Mirador, para conocer sus similitudes o diferencias. Además, en ese mismo trabajo (*Gómez-Sánchez et al., 2014*), también se realizaban una serie de comparaciones con poblaciones europeas de distintos periodos que iban desde el Neolítico hasta la Edad del Bronce.

Como hasta el momento hemos podido concluir que a lo largo de los periodos estudiados tienen lugar dos grandes cambios en la composición genética de la población, el primero de ellos durante el preCampaniforme y el segundo durante el desarrollo de la cultura Protocogotas I, pero desconocemos la procedencia real de las poblaciones que generaron ese cambio, se ha considerado interesante llevar a cabo un análisis comparativo de la composición genética de algunas de las poblaciones europeas analizadas por *Gómez-Sánchez et al. (2014*) y las estudiadas en esta tesis. De ese modo podremos aproximarnos a un posible origen estas poblaciones de la Submeseta Norte. Para ello se ha realizado un análisis de componentes principales, que puede observarse en la *figura 84* de los resultados.

En dicho análisis de correspondencias se observa que los yacimientos preCampaniformes de Los Areneros (ARE) y Los Cercados (CER), se sitúan muy próximos a yacimientos de la Cultura Epi-Cardial española (CAR) y a poblaciones propias de la cultura Schöningen (SCG) de Alemania. Por otro lado, El Tomillar es próximo a la composición genética de las poblaciones del Neolítico Portugués (NPO) y a la Cultura Campaniforme alemana (BBK).

En lo relativo a la Cueva del Mirador, no se aproxima a la composición genética de ninguno de los yacimientos Calcolíticos analizados en esta tesis, tan solo de forma poco intensa se asemeje algo más al yacimiento de Santa Cruz de Cabezón.

Todo lo observado parece apuntar que el origen del preCampaniforme se sitúe a medio camino entre poblaciones propias de la Península Ibérica y poblaciones procedentes del centro y norte de Europa, fundamentalmente de Alemania.

En cuanto a los grupos Protocogotas I, no se observa ninguna asociación estrecha, pero están próximos a grupos de la Edad del Bronce Alemanes (BAK) y Siberianos (BAS), aunque no de forma muy íntima.

6.4 DISCUSIÓN SOBRE EL ANÁLISIS DE RELACIONES FAMILIARES EN ENTERRAMIENTOS COLECTIVOS Y/O MÚLTIPLES

6.4.1 Consideraciones Generales

En el conjunto de todos los individuos estudiados en esta tesis, existen algunas agrupaciones que constituyen enterramientos múltiples o colectivos. Con la finalidad de estudiar posibles relaciones de parentesco entre los individuos que fueron hallados en un mismo enterramiento, se ha realizado un análisis de marcadores autosómicos, de herencia mixta. El éxito en la obtención de resultados ha sido menor que en el análisis de ADN mitocondrial, tal como cabía esperar debido a la menor proporción de ADN nuclear en la célula en comparación con el ADN mitocondrial. Pero, en cualquier caso ha sido posible obtener perfiles de STRs autosómicos en individuos procedentes de 6 de los 12 enterramientos colectivos y múltiples estudiados (*Figura 41*). A partir de estos perfiles de marcadores autosómicos, junto con los haplotipos de ADN mitocondrial, se ha tratado de analizar posibles relaciones familiares de mayor o menor proximidad entre los individuos exhumados de un mismo enterramiento, e incluso en algún caso enterramientos diferentes pero próximos entre sí, contexto en el que resultaba interesante un análisis de este tipo.

A lo largo de este apartado se va a exponer en primer lugar, de manera independiente, los resultados correspondientes a cada uno de los yacimientos de los que se ha podido obtener amplificación de ADN nuclear. En segundo lugar se tratará de aportar una visión global al conjunto de los resultados, pudiendo inferir conclusiones relativas a las costumbres funerarias a lo largo de los diversos periodos crono-culturales. Este último punto es muy interesante desde el punto de vista histórico, y la información obtenida deberá ser integrada por los especialistas en la Prehistoria para contribuir a la discusión acerca del cambio cultural, el origen de las diversas culturas arqueológicas, diferentes patrones funerarios, etc.

Para el establecimiento de relaciones de parentesco en términos de probabilidad en todos los casos se ha empleado la herramienta Blind Search del software Familias 3.0, y en ciertos casos también la herramienta de análisis de relaciones familiares clásica de dicho programa informático; tal y como se explica en el punto 4.2.3.3.4 de material y métodos.

6.4.2 Análisis De STRs Autosómicos En Los Tolmos (Caracena, Soria)

El yacimiento de Los Tolmos situado en la localidad de Caracena (Soria) forma parte de la cultura Protocogotas I (en torno al 3520 ± 35 años, datación radio-carbónica). En dicho yacimiento se hallaron dos enterramientos diferentes: en el primero de ellos (denominado LTA) se exhumaron los restos esqueléticos de lo que se identificó antropológicamente como un varón adulto. En el segundo enterramiento, al cual

se ha denominado LTB, se hallaron restos esqueléticos correspondientes a dos individuos adultos y un individuo perinatal (recién nacido o feto a término). Los dos adultos de LTB fueron identificados como una mujer joven (LTB1) y un individuo maduro a partir de cuyos restos no fue determinable el sexo con seguridad (LTB2). También a partir de los restos del individuo perinatal (LTB3) fue imposible establecer su sexo.

El hecho de haber hallado una tumba con dos adultos, probablemente uno masculino y el otro femenino, acompañados de un recién nacido o feto a término, podría apuntar a que se tratara de tres miembros de un mismo núcleo familiar. El individuo LTA4, de la otra tumba, podría estar vinculado a ellos de alguna forma debido a la proximidad de los enterramientos. Por ello, se ha llevado a cabo un análisis de STRs autosómicos con la intención de verificar si la tumba LTB se corresponde con un enterramiento familiar siendo sus tres miembros componentes de un núcleo familiar completo (padre, madre e hijo/a); y por otro lado conocer si el individuo LTA4 puede guardar alguna relación con el resto de individuos, de la que parece ser su misma comunidad.

Se han obtenido perfiles bastante completos a partir de los restos de los 4 individuos analizados. Los individuos LTB1 y LTA4, presentan los perfiles de STRs autosómicos más completos, siendo LTB2 el individuo con peor calidad en sus resultados (Ver *Tabla 65*).

Tras el estudio de relaciones de parentesco cercano, se han encontrado relaciones familiares estrechas únicamente entre 2 de los 4 individuos estudiados: LTB1 y LTB3. Las relaciones de parentesco consideradas han sido: hermandad, medio hermanos y maternidad (*Tabla 66*).

Para tener una visión más amplia de la situación, debemos considerar además otros datos, concretamente los datos obtenidos a partir del análisis de ADN mitocondrial. Por ello debemos tener en cuenta que el individuo LTB1 y LTB3 además de compartir un alto número de alelos en los mismos marcadores (entre 3 y 10, dependiendo del criterio seleccionado para el establecimiento de los perfiles consenso) (Ver *Tablas 65 y 66*), también comparten el mismo haplotipo de ADN mitocondrial (73G, 16224C, 16311C, 16362C) (ver *Tabla 53*).

De las tres relaciones consideradas, el LR más elevado se ha obtenido para la relación de hermandad entre LTB1 y LTB3 utilizando los perfiles establecidos según el criterio 3 (LR igual a 26472,7; 99,996% de probabilidad). Pero, hay que señalar que con los criterios 4 y 5, cuando se incrementan el número de marcadores empleados, la probabilidad de hermandad se reduce considerablemente de forma inversamente proporcional al número de marcadores empleados.

La segunda relación más probable que se observa es la de maternidad empleando los datos del criterio 5 para el establecimiento de los perfiles genéticos (LR igual a 14284,71; 99,99% de probabilidad). Hay que destacar que si se analiza la relación de maternidad empleando el criterio número 3, se observa un LR de 0, ya que según este criterio nos encontramos una incoherencia en el marcador D3S1358, que muy probablemente se deba a un fenómeno de *alelic drop-out*. En este caso, a diferencia de la hermandad,

cuando el criterio es menos restrictivo, mayor es la probabilidad de parentesco; lo cual da más fiabilidad a la relación, ya que al incrementar el número de marcadores considerados la probabilidad de maternidad también aumenta de forma directamente proporcional. Además, debemos considerar otras características, tales como la diferencia de edad entre los individuos (recordar que LTB1 es una mujer adulta-joven y LTB3 un recién nacido o feto a término) y sobre todo se debe considerar la disposición de los cuerpos en la tumba, en la que el individuo LTB3 parece orientarse de manera invertida (cabeza del individuo LTB3 hacia la región de las extremidades inferiores del individuo LTB1) situado en la región pélvica de LTB1: todo parece apuntar hacia un caso en el que se ha llevado a cabo el enterramiento de una mujer embarazada.

Por todo lo anterior, aunque se deben considerar ambas posibilidades, que por otro lado son perfectamente compatibles con el hecho de que ambos individuos compartan el mismo haplotipo de ADN mitocondrial, lo cierto es que añadiendo los datos arqueológicos y antropológicos a los datos genéticos parecen orientarse más hacia una relación madre-hija.

En este caso, es importante destacar que ha sido posible la determinación del sexo de la totalidad de los individuos, incluido el individuo perinatal. La determinación del sexo de LTB3 no habría sido posible mediante ningún otro método antropológico debido a la corta edad del individuo, que aún no ha desarrollado características sexuales propias en el esqueleto. Por otro lado el individuo LTB2, considerado antropológicamente como el posible "padre" del núcleo familiar, en realidad es un individuo femenino, que además no parece compartir ningún tipo de parentesco directo con LTB1 ni con LTB3. Por su parte, el individuo de la tumba LTA (LTA4), ha sido confirmado como varón, y tampoco parece presentar ningún parentesco cercano con ninguno de los individuos de la tumba LTB.

Debemos considerar que el sistema "*Blind search*" calcula probabilidades para relaciones de: paternidad, hermandad, medios hermanos, primos y primos segundos; pero no establece otros tipos de relaciones que podrían haberse dado entre los individuos aquí estudiados. Por esta razón podríamos considerar la posibilidad de que el hecho de que LTB2 comparta tumba con LTB1 y LTB3, se pueda deber a que LTB2 estuviera emparentada genéticamente con LTB3 a través de su línea paterna (siendo una tía paterna o la abuela paterna). Excluido el parentesco a través de la línea materna, ya que para ello deberían compartir el mismo haplotipo de ADN mitocondrial, pero no es así (LTB3 presenta el haplotipo 73G, 16224C, 16311C, 16362C y LTB2 es 16224C, 16311C, y no se han obtenido datos para HVII). Para conocer esas posibles relaciones del tipo tia-sobrina o abuela-nieta por vía paterna, se puede emplear el cromosoma X (Ver *Tabla 67*). En efecto, se ha llevado a cabo el análisis del cromosoma X, pero los resultados han sido muy pobres, habiéndose observado únicamente un marcador amplificado simultáneamente en los dos individuos (LTB2 y LTB3) que comparte el mismo alelo, por lo que no se puede descartar una relación tia-sobrina o abuela-nieta vía paterna, sin que los datos sean suficientes como para afirmarla.

Como conclusiones finales al establecimiento de relaciones familiares en el yacimiento de Los Tolmos, podemos decir que el enterramiento LTB no está constituido por un núcleo familiar completo, ya que se trata de tres mujeres, dos adultas y una perinatal; siendo posible que se tratara de dos mujeres adultas,

una de ellas embarazada (LTB1). Todo apunta hacia la existencia de una relación familiar muy estrecha entre LTB1 y LTB3, que podría tratarse de una relación de hermandad o una relación de maternidad, pero los datos genéticos junto con los antropológicos y arqueológicos parecen apuntar más a que se trate de una relación madre-hija, no habiéndose producido todavía el alumbramiento.

Por otro lado, el individuo LTB2 también es una mujer aparentemente no vinculada a LTB1 y LTB3 a través de la línea germinal femenina, ya que sus haplotipos mitocondriales difieren en una mutación; aunque, podría considerarse alguna posibilidad de que se tratara de una mutación puntual y sí estuvieran emparentadas a través de la línea familiar femenina. Tampoco parece presentar ningún tipo de parentesco perceptible mediante el análisis de marcadores autosómicos, como se ha dicho. Podría estar vinculada a LTB3 a través por vía paterna, pero no disponemos de datos suficientes como para confirmar esta afirmación.

En cuanto al individuo LTA4, de la otra tumba (Los Tolmos A) no parece que exista ningún parentesco cercano al resto de individuos, ni mediante marcadores autosómicos ni tampoco a través de la línea germinal femenina, ya que no comparten los mismos haplotipos de ADN mitocondrial.

A toda esta discusión se debe añadir, que tanto para el análisis de relaciones familiares en este caso, como para el resto de casos en esta tesis, se han tomado como referencia frecuencias alélicas de la población española actual, que muy probablemente no sean las mismas que existían durante el periodo temporal en el que vivieron estas poblaciones. Por ello, aunque en pocas ocasiones, en algunas apreciaremos la aparición de alelos que no están presentes en la población española actual.

6.4.3 Análisis De STRs Autosómicos En Los Areneros (La Lastrilla, Segovia)

El yacimiento de los Areneros de las Zumaqueras (La Lastrilla, Segovia) es un yacimiento preCampaniforme que se sitúa al aire libre. Su origen data de la Edad de Cobre y perdura hasta bien entrada la Edad del Bronce. Dentro de este yacimiento se han seleccionado muestras correspondientes a nueve individuos inhumados en un mismo hoyo colectivo, calcolítico.

Mediante el análisis de STRs autosómicos, se pretende conocer si los nueve individuos exhumados del mismo hoyo pertenecen a una misma familia o existen lazos familiares estrechos entre algunos de ellos. De este modo podremos saber si en este caso la inhumación de individuos juntos en una misma tumba está ligada a lazos familiares, o por el contrario se llevaban a cabo enterramientos colectivos de diferentes individuos de la comunidad, aunque no estuvieran emparentados entre sí. La importancia del linaje amplio o del parentesco cercano deberá ser estudiada conjuntamente con la información arqueológica.

En este caso concreto, la calidad de los resultados ha variado mucho en función de cada individuo. Algunos

de los individuos que han mostrado perfiles de STRs más completos son el individuo 1ARE y el individuo 6ARE, en éste último fue posible obtener, según el quinto criterio, perfiles de hasta 17 marcadores. En cambio, otros individuos como el 9ARE (un único marcador amplificable empleando los criterios 4 y 5) o el 24ARE, han proporcionado resultados muy pobres o incluso nulos en el caso de 24ARE (*Tabla 68*).

Los valores de LR y probabilidad más elevados se han obtenido utilizando el criterio 2 de selección para el establecimiento de perfiles de STRs autosómicos, para la relación entre 1ARE y 8ARE. Se han establecido dos posibles relaciones entre estos dos individuos, que son de hermandad (con un LR DE 20.547,2; y probabilidad de 99,99%) y con mayor probabilidad teórica de que se tratase del mismo individuo (con un LR de 107.682, y probabilidad de 99,999%) (Ver *Tabla 69*). Sin embargo, cuando se estudia la probabilidad de estas dos relaciones utilizando criterios más permisivos, como el 3, el 4 o el 5, los LRs para estas relaciones decrecen considerablemente. Es decir, cuanta más información tenemos menor es la probabilidad de parentesco entre 1ARE y 8ARE, lo cual hace que las hipótesis de parentesco establecidas sean poco sólidas. Por otro lado, debemos considerar que para que 1ARE y 8ARE sean hermanos o sean el mismo individuo, deben compartir también el mismo haplotipo de ADN mitocondrial, pero no cumplen este requisito (el haplotipo mitocondrial de 1ARE es: 73G, 263G, 16224C, 16311C; Y el de 8ARE es: 263G, 315.1C) (Ver *Tabla 53*). Además, es necesario tener en cuenta que los LRs dados para establecer esas dos relaciones han sido calculados a partir de únicamente 2 marcadores que comparten los mismos alelos entre los dos individuos, tanto para el caso de hermandad, como para el caso de que se trate de la misma persona. Por lo tanto, no es posible que 1ARE y 8ARE sean hermanos ni sean la misma persona; de hecho ni siquiera están emparentados a través de la línea materna. Por lo tanto no podemos establecer ningún tipo de relación entre estos individuos de manera fiable. Aquí se observa un claro ejemplo de falso positivo, en el caso de que se hubiera empleado el criterio 2 para el establecimiento del perfil genético, sin considerar otros factores (*Tabla 79*). Esto debería ser tenido muy en cuenta en aquellos estudios de ADN antiguo en los que se trata de establecer relaciones de parentesco cercano empleando de manera exclusiva el análisis de STRs autosómicos sin considerar otros marcadores y sin un criterio claro en el establecimiento del perfil consenso.

A todo lo anterior, se debe añadir que es fundamental partir de una apropiada selección muestral, tratando de seleccionar muestras bien individualizadas. En este caso concreto se seleccionaron piezas dentales pertenecientes a diferentes mandíbulas, de modo que aquí hallaríamos otra prueba contra la hipótesis de pertenencia a un mismo individuo establecida anteriormente; pero no siempre se cuenta con esa ventaja, por ello consideramos muy importante conocer la problemática de este tipo de análisis.

Volviendo a la relación de parentesco entre 1ARE y 8ARE, si podría tratarse de una relación de medios-hermanos, por parte de padre ya que no comparten el ADN mitocondrial. El LR máximo para este tipo de relación sería de 143,343 (probabilidad de 99,30%) utilizando el criterio 2. Sin embargo esta probabilidad se reduce si empleamos criterios menos restrictivos, lo que parece apuntar a que no se trata de una relación muy sólida. Además, en este caso la probabilidad de parentesco ha sido construida empleando únicamente dos marcadores que comparten alelos entre sí. Por ello debemos considerar que el establecimiento de

esta relación ha sido azaroso y probablemente no sea cierto.

En el resto de casos las relaciones de hermandad o de que se trate del mismo individuo deben descartarse, ya que ninguna de las parejas de individuos comparte el mismo perfil de ADN mitocondrial. Además todas las relaciones están establecidas utilizando números muy bajos de marcadores, por lo que no resulta fiable (Ver *Tabla 69*).

En definitiva, con los datos obtenidos no es posible asegurar ninguna relación de parentesco cercano entre los individuos enterrados de forma conjunta en este enterramiento. El ADN mitocondrial parece apuntar a que no existen relaciones a través de la línea materna entre ninguno, excepto 7ARE Y 24ARE, pero no se dispone de datos sobre STRs autosómicos para poder establecer ningún otro tipo de relación más cercana entre ellos, ya que a partir de 24ARE no ha sido posible la amplificación de ADN nuclear. En el resto de los casos no existe relación por vía materna, y los datos parecen apuntar a que tampoco existan relaciones de parentesco cercano, aunque los resultados son escasos para afirmarlo de forma rotunda.

Parece pues, que lo que hizo que estos individuos compartieran el lugar de enterramiento fue la pertenencia a una misma comunidad, y no los lazos familiares cercanos.

Por otro lado, ha sido posible la determinación del sexo molecular en 7 de los individuos, resultado 5 varones (1ARE, 5ARE, 6ARE, 7ARE y 20ARE) y 2 mujeres (2ARE y 8ARE) (*Tabla 80*).

6.4.4 Análisis De STRs Autosómicos En La Cueva De La Revilla (Atapuerca, Burgos)

La cueva de la Revilla se encuentra en la localidad burgalesa de Atapuerca, próxima a la vega del Rio Vena, en la terraza del Arlanzón. Lugar con disponibilidad hídrica y suelos fértiles, que ha hecho de ese lugar un emplazamiento recurrente para la ocupación humana durante la prehistoria. La característica principal de los restos humanos hallados es la desconexión anatómica, que se ha traducido en una clara dispersión de los huesos por toda la cueva. A grandes rasgos, hay que destacar que no se encuentra ningún individuo completo. El carácter alterado del osario, parece deberse a dos razones distintas, la primera a su carácter colectivo y diacrónico como lugar de enterramiento, ya que la cueva parece haber sido empleada como panteón largamente utilizado por uno o varios grupos que visitaron la cueva durante varias generaciones, pues las dataciones radiocarbónicas se escalonan desde el Bronce Antiguo al Protocogotas I. La segunda razón pudiera deberse a la simple deposición de los cadáveres sobre el suelo de la cueva, sin cubrir. Cabe señalar, que a pesar de la dispersión de los restos óseos, cada componente esquelético muestra un grado óptimo de preservación. El número mínimo de individuos estimado es de 21 individuos (al menos 4 de ellos sub-adultos), de los cuales se han estudiado 8 dentro de esta tesis.

Conociendo el contexto del enterramiento y sus características, el análisis de marcadores autosómicos en este conjunto funerario resulta interesante en dos sentidos fundamentales. En primer lugar, ya que

nos enfrentamos a un conjunto de restos esqueléticos desordenados y mezclados entre sí, el ADN puede aportar información relevante para la determinación del número mínimo de individuos, ya que podemos determinar si diferentes piezas esqueléticas pudieran pertenecer a un mismo individuo. Por otro lado podemos conocer las posibles relaciones de parentesco entre individuos enterrados en la cueva. Es cierto que muchos de ellos pertenecerán a momentos temporales alejados entre sí, pero es posible que otros pertenezcan al mismo periodo cronológico y estén emparentados entre sí de forma más o menos próxima. Así podremos saber si las comunidades que llevaron a cabo los enterramientos en esta cueva pertenecían a determinados grupos familiares, o si por el contrario no estaban emparentados entre sí, y simplemente enterraban de manera conjunta por igual a todos los miembros de la comunidad.

En general, los resultados obtenidos tras el análisis STRs autosómicos han sido pobres. Se han obtenido perfiles ligeramente más completos a partir de los individuos 1REV, 2REV, 4REV y 6REV. Siendo prácticamente nulos en el resto. Sin embargo la amplificación de resultados válidos de ADN mitocondrial fue posible en todos los individuos, aportando todos ellos perfiles de ADN mitocondrial diferentes entre sí (*Tabla 70*).

Se han establecido relaciones principalmente entre los individuos 1REV y 2REV, 1REV y 4REV y entre 4REV y 6REV. De entre estas relaciones, a excepción de la primera (1REV y 2REV), se establece que 1REV y 4REV, así como 4REV y 6REV, se trata del mismo individuo, dato que no resulta fiable por haberse calculado con tan solo 2 marcadores que presentan el mismo alelo, además de tratarse de individuos que no comparten los mismos perfiles de ADN mitocondrial, condición indispensable para que se cumpliera la hipótesis de tratarse de restos esqueléticos pertenecientes a la misma persona. Por lo tanto, las únicas relaciones de parentesco posibles entre los individuos analizados serían de medio-hermanos entre 1REV y 2REV, o bien de primos entre esos mismos individuos.

La relación de medios-hermanos entre 1REV y 2REV, viene dada con un LR de 425,216 empleando el criterio 5 (probabilidad de 99,77%). La probabilidad y el LR se reducen progresivamente a medida que el criterio para el establecimiento del perfil se hace más estricto (Ver *Tabla 71*). Según el quinto criterio los dos individuos comparten alelos en tres marcadores diferentes. No se trata de un LR muy elevado, ni tampoco de una coincidencia en un número alto de marcadores; pero dado que los perfiles son bastante incompletos, no podemos descartar la posibilidad de que se trate de medios hermanos por vía paterna (la vía materna queda descartada por no compartir el mismo haplotipo de ADN mitocondrial). Para hacer más sólido este resultado se llevó a cabo el análisis de STRs del cromosoma Y, sin embargo no se obtuvieron resultados sólidos para ninguno de los dos individuos, por lo que no se puede confirmar la relación de parentesco.

Con un LR ligeramente inferior al anterior, puede que la relación establecida entre 1REV y 2REV sea de primos en lugar de medio-hermanos (LR igual a 128,372 y probabilidad de 99,23%, empleando los perfiles aportados por el criterio 5). En cualquier caso la probabilidad de esta relación es inferior a la anterior.

En cualquiera de los dos casos anteriores se observa que a medida que el criterio empleado es menos restrictivo (con mayor número de marcadores empleados en el análisis) mayor es la probabilidad de

parentesco (por lo tanto mayor es el número de alelos comparten entre sí). Lo cual es un dato a favor de que estos dos individuos se encuentren emparentados en cierto grado entre sí, ya que al aumentar el número de STRs considerados, aumenta la probabilidad de parentesco.

Como conclusión final al análisis de relaciones familiares en la Cueva de la Revilla, no parece que los individuos enterrados en este yacimiento presenten relaciones de parentesco cercano entre si, ni tampoco pertenecen a un mismo linaje materno. Sin embargo es posible que exista cierto grado de parentesco, probablemente una relación de medio-hermanos o de primos, entre el individuo 1REV y el 2REV. En cualquier caso, los resultados obtenidos son pobres, y no son suficientes para confirmar esta relación ni tampoco para descartarla. Del mismo modo que para el resto de individuos. Lo único que podemos afirmar es su desvinculación a través de la línea materna, al mismo tiempo que se pueden descartar relaciones directas muy cercanas (de maternidad, paternidad o hermandad) entre los individuos 1REV, 2REV, 4REV y 6REV.

6.4.5 Análisis De STRs Autosómicos En Los Cercados (Mucientes, Valladolid)

Se trata de uno de los yacimientos preCampaniformes más conocidos de la Meseta. Dentro de este yacimiento vallisoletano se excavaron tres hoyos, pero nuestro estudio se centra tan solo en uno de ellos, que contenía restos humanos muy peculiares, correspondientes a un ritual complejo, con muchos elementos simbólicos, cerámicas y restos de animales. Entre ellos, se encontraron restos esqueléticos concretamente tres cráneos humanos (1CER, 2CER y 3CER) y un maxilar superior (4CER), desvinculado de los tres cráneos. Hay que destacar que la bibliografía hace escasas referencias al maxilar superior encontrado, dando mayor peso a los cráneos. El análisis antropológico no vio suficientemente clara la posibilidad de asignar el maxilar a ninguno de los tres cráneos, pero tampoco se pudo confirmar que se tratara de un cuarto individuo diferente a los otros tres. Los tres cráneos fueron determinados antropológicamente como femeninos y además mostraban determinados signos de violencia en forma de traumatismos, habiéndose interpretado en relación con una violencia intencionada de género (*García Barrios, 2007*).

Conociendo las características del hallazgo, los objetivos que nos planteamos y que pueden ser resueltos mediante el análisis de STRs pueden ser básicamente tres. El primer objetivo consiste en determinar el número exacto de individuos, comprobando si es posible asignar la mandíbula a alguno de los tres cráneos o si por el contrario pertenece a otro individuo diferente. El segundo objetivo irá encaminado a establecer o descartar relaciones de parentesco entre los individuos del hoyo. Por último es interesante comprobar si el sexo molecular es el mismo que el determinado por métodos antropológicos, ya que éste ha sido determinado exclusivamente mediante el análisis de características craneales, por no disponer de otros huesos tales como el coxal que pueden dar una aproximación más precisa a la determinación del sexo.

Se han obtenido resultados muy completos para el cráneo 2CER, y también bastante completos, aunque

no tanto, para el maxilar superior 4CER. Los resultados de 1CER y 3CER son menos completos. Pero en general los resultados son buenos y coherentes (*Tabla 72*).

En el individuo 2CER hemos encontrado un problema en el marcador D221045, en el cual se han determinado tres alelos. Normalmente esto podría venir dado por la presencia de un perfil de ADN contaminante, sin embargo si fuera así lo habitual sería encontrar este fenómeno también en otros marcadores, y no únicamente en uno; por lo que probablemente se deba a un artefacto, debido a un fenómeno de alelic *drop-in* o a la presencia de un *Stutter* elevado. Por ello a la hora de establecer las relaciones de parentesco, se han tomado en cuenta los picos que presentaban mayor altura en los electroferogramas, es decir, en este caso los alelos 16 y 18 (*Tabla 72*). Este mismo problema se observa en el marcador D7S820 del individuo 3CER. Por otro lado, se han contrastado todos los perfiles con los del personal que entró en contacto con las muestras, y ninguno de ellos era coincidente, por lo que es muy probable que se trate de un artefacto. En el caso de 3CER este fenómeno se da únicamente con los criterios más permisivos, el criterio 4 y el criterio 5; ante esta situación, debemos plantearnos que quizá estos dos criterios no sean siempre recomendables y deban valorarse en conjunto con los otros, tal como se comentaba en el apartado 6.2.3 de esta tesis, ya que al dar cómo válidos todos los picos que superen una altura de 150 rfus a pesar de que no repliquen, es posible que estemos dando cómo válidos algunos alelos que en realidad son artefactos y no picos reales. Por ello es importante considerar ese problema a la hora de interpretar los resultados. Otro dato a favor de descartar la posibilidad de contaminación es que en el análisis de ADN mitocondrial no se han percibido tampoco perfiles contaminantes.

Se establecen relaciones entre 1CER y 3CER, así como entre 2CER Y 4CER.

En el primer caso, entre 1CER y 3CER, no podemos validar el parentesco a través de la línea materna, ya que los datos obtenidos a partir de los restos del individuo 3CER no son sólidos y no se ha podido definir un haplotipo de ADN mitocondrial válido y fiable. Sin embargo, la posibilidad de que se trate del mismo individuo, queda descartada por tratarse de dos cráneos diferenciados. Las posibles relaciones que se establecen entre estos dos individuos son de hermandad o de medio hermanos. Según todos los criterios establecidos siempre la probabilidad y el LR de hermandad es ligeramente superior al de medio-hermanas. El LR máximo en los dos casos se alcanza cuando se emplea el criterio 5, siendo un LR de 283,008 (99,65% de probabilidad) para la relación de hermandad, y un LR de 141,186 (99,30% de probabilidad) para la relación de medio-hermanos. Tanto en un caso como en el otro, se observa que a medida que el criterio se hace menos restrictivo la probabilidad de parentesco se incrementa, lo cual aporta más fiabilidad al resultado. No se trata de resultados válidos desde un punto de vista legal, pero considerando la limitación de la muestra y de los resultados obtenidos, no podemos descartar que exista una relación de hermandad entre los individuos 1CER y 3CER. Además, no parece que el maxilar 4CER pertenezca a ninguno de los cráneos correspondientes a 1CER y 3CER (*Tabla 73*).

En lo relativo a las relaciones establecidas entre 2CER y 4CER, en este caso encontramos los mayores valores de LR y probabilidad encontrados en todo el conjunto de análisis de esta tesis. De hecho el mayor LR alcanzado establece que 2CER y 4CER son el mismo individuo con un valor de 5.91065e+010 (lo que

corresponde a un 99,99999999% de probabilidad de que la hipótesis sea cierta). Dicho valor se alcanza empleando el criterio 4, con el criterio 5 desciende muy levemente, pero en cualquier caso con el criterio 3 e incluso con el 2 se alcanzan valores muy elevados que hacen solida la afirmación de que 2CER y 4CER sean restos esqueléticos pertenecientes a la misma persona. La segunda relación más probable sería la de hermandad, pero presenta valores de LR y probabilidad inferiores a la probabilidad de que se trate de un mismo individuo (*Tabla 73*). En cuanto al ADN mitocondrial, ambos individuos comparten el mismo perfil de ADN mitocondrial en lo relativo a la fracción HV1, sin embargo HV2 no fue amplificable de manera adecuada para 4CER, por lo que no es posible comparar ese fragmento (*Tabla 53*).

Como conclusiones finales al análisis de STRs autosómicos en el yacimiento de Los Cercados, podemos decir que los individuos 1CER y 3CER podrían estar emparentados a través de la línea materna siendo hermanas o medio-hermanas, sin embargo los datos no son suficientes para afirmar esta relación con gran solidez. Por otro lado, los restos correspondientes al cráneo 2CER y a la maxila 4CER parecen pertenecer al mismo individuo con una elevada probabilidad (LR de 5.91065e+010; probabilidad de un 99,99999999%) (Ver *Tabla 73*). No parece que exista ninguna otra relación de parentesco entre 1CER y 2CER o 4CER; ni entre 3CER y 2CER o 4CER. De modo que podríamos concluir que el enterramiento está formado por 3 individuos, y no por 4; de modo que las piezas correspondientes a los que fueron identificados como individuo 2CER Y 4CER, pertenecen a una misma persona. Es importante destacar, que ha sido posible determinar el sexo en la totalidad de los restos analizados, resultado todos ellos femeninos (*Tabla 80)*. Se corrobora así la sospecha arqueológica de que tres mujeres fueron víctimas de un rito. De ellas, dos pudieron haber sido hermanas (1CER y 3CER) aunque no disponemos de suficientes datos como para corroborar con seguridad esta relación.

6.4.6 Análisis De STRs Autosómicos En Los Rompizales (Alfoz De Quintanadueñas, Burgos)

El yacimiento burgalés de Los Rompizales ha proporcionado numerosos hoyos, uno de los cuales contenía un enterramiento simultáneo perteneciente al periodo Protocogotas I, en el cual se exhumaron los restos esqueléticos correspondientes a 4 individuos, y otro hoyo con restos de otro individuo. Dichos esqueletos fueron determinados antropológicamente como individuos jóvenes, 3 de ellos varones (1RPZ, 2RPZ y 4RPZ), una mujer (3RPZ) y un individuo indeterminable (5RPZ). Debido a la juventud de los individuos, el enterramiento simultáneo hacía pensar en que la muerte de ellos fuera por una causa no natural, quizá vinculada a alguna catástrofe o a algún tipo de muerte violenta, circunstancia que está siendo estudiada en detalle actualmente.

Resultaría interesante conocer si los individuos enterrados simultáneamente presentan lazos familiares próximos, tratándose de hermanos u otro tipo de parientes próximos, tales como primos por ejemplo.

Se han obtenido perfiles de marcadores autosómicos muy completos a partir del estudio de los restos

esqueléticos del individuo 2RPZ, y los individuos 1RPZ y 4RPZ también aportan perfiles bastante completos, siendo 3RPZ quien muestra resultados de peor calidad y perfiles con un menor número de marcadores amplificados. Por lo general la cantidad de STRs amplificados ha sido bastante satisfactoria (Ver *Tabla 74*).

El análisis de relaciones familiares apunta a que no existe ningún tipo de relación próxima entre los 4 individuos enterrados simultáneamente en este enterramiento, habiéndose extendido el análisis también al cuarto individuo del mismo yacimiento. Todos los LRs obtenidos son muy bajos (todos ellos por debajo de 3) (Ver *Tabla 75*). Además los haplotipos mitocondriales de los 4 individuos son diferentes entre sí, sólo cabría la posibilidad de cierta similitud entre el ADN mitocondrial de 1RPZ y 3RPZ, que varían en una única base. Sin embargo las relaciones establecidas entre ellos muestran LRs muy bajos incluso utilizando el criterio número 5, y aun así dichos LRs se establecer utilizando únicamente un marcador que comparte los mismos alelos entre los dos individuos. Entre el individuo 1RPZ y el 4PRZ, y entre 2RPZ y 4RPZ, se han empleado hasta 5 marcadores amplificados para establecer relaciones de parentesco, y sin embargo aun así los LRs obtenidos son mínimos, lo que sostiene más aún la hipótesis de que no estén emparentados entre sí (Ver *Tabla 75*).

En este caso, también se trató de establecer relaciones a través de la línea paterna, analizando STRs del cromosoma Y, sin embargo los resultados no fueron satisfactorios, ya que no fue posible la amplificación de ningún marcador en ninguno de los casos. En cualquier caso, los LRs obtenidos del análisis de STRs autosómicos no parecen mostrar posibilidades de que exista parentesco de hermandad o como primos, ni incluso primos segundos a través de la línea paterna.

Como conclusión al estudio de STRs autosómicos sobre los individuos del yacimiento de Los Rompizales, podemos decir que los individuos inhumados en este hoyo colectivo no presentan lazos familiares próximos entre sí, ni tampoco se encuentran emparentados a través de la línea germinal femenina (ADN mitocondrial).

6.4.7 Análisis De STRs Autosómicos En Tordillos (Aldeaseca De La Frontera, Salamanca)

El yacimiento Protocogotas I de Tordillos está situado en Aldeaseca de la Frontera, provincia de Salamanca. Se trata de un yacimiento que brinda una oportunidad única para contribuir el estudio de las características sociales de los Cogotas I, debido al elevado número de hoyos funerarios e individuos. Concretamente se encontraron un número mínimo de 22 individuos repartidos en 9 hoyos diferentes (tal como se describe en el punto 4.1.1.1.2.2).

Ante este caso, resulta interesante conocer si los individuos enterrados dentro de un mismo hoyo presentan lazos familiares próximos entre sí y diferentes del resto. Del mismo modo también se tratará de ver si existen lazos familiares entre individuos enterrados en los diferentes hoyos, y si la separación en

distintos hoyos responde a algún tipo de patrón de parentesco concreto. Al tratarse de enterramientos en los que los huesos se hallaron entre mezclados, también es importante determinar si algunos de los restos individualizados como personas diferentes, pertenecen a una misma persona, aunque esa tarea ya fue realizada durante la selección muestral, tratando siempre de seleccionar muestras bien individualizadas.

Los resultados del análisis de STRs autosómicos a partir de los individuos exhumados del yacimiento de Tordillos son bastante incompletos. Los individuos que han proporcionado mejores resultados han sido 1TOR y 7TOR, con la obtención de perfiles de hasta 6 marcadores en el primero y de 5 en el segundo (*Tabla 76*). En el resto de casos los perfiles son pobres, con entre 1 y 3 marcadores amplificados además del de la amelogenina, que fue amplificable en casi la totalidad de individuos (excepto en 8TOR, 9TOR y 10TOR), pudiendo de este modo determinar el sexo molecular de casi todos los individuos (*Tablas 76 y 80*). Debemos señalar que para poder completar los resultados del análisis de STRs autosómicos es necesario consultar los resultados del análisis de ADN mitocondrial (*Tabla 53*), para poder confirmar o descartar determinados tipos de relaciones familiares, sin embargo el ADN mitocondrial no proporcionó resultados satisfactorios en todos los casos, no obteniendo resultados válidos en 3TOR, 4TOR, 11TOR y 12TOR.

Para llevar a cabo el análisis de relaciones de parentesco se ha utilizado la misma herramienta de búsqueda "*a ciegas*" de relaciones entre los individuos con perfiles parcialmente completos de STRs autosómicos.

En los resultados de la *Tabla 77* podemos observar que la relación que muestra un LR más elevado se da entre los individuos 9TOR y 12TOR. Entre estos dos individuos observamos dos posibles relaciones. El mayor LR obtenido entre estos dos individuos es el que sugiere que se trata de restos óseos de un mismo individuo; sin embargo esta afirmación presenta algunas contradicciones: La primera contradicción relativa es que los restos de 9TOR y de 12TOR se ubican en dos hoyos diferentes. La segunda contradicción, es que los restos esqueléticos de 9TOR y de 12TOR presentan características antropológicas muy diferentes; de modo que 9TOR fue determinada antropológicamente como una mujer joven de entre 17 y 25 años; mientras que los restos óseos de 12TOR corresponden a un individuo infantil de sexo indeterminable. Además, no es posible comprobar que compartan el mismo ADN mitocondrial, ya que los resultados del análisis de ADN mitocondrial no han sido validados para el individuo 12TOR. Por último, hay que señalar que el LR para determinar que se trata del mismo individuo se ha establecido empleando únicamente un solo marcador STR, lo cual no es prácticamente nada informativo. En definitiva, por todos los datos aportados anteriormente debemos rechazar que 9TOR y 12 TOR sean el mismo individuo.

La relación con el segundo valor más elevado de LR y mayor probabilidad es la de hermandad entre esos mismos dos individuos (9TOR Y 12TOR) (*Tabla 77*). En este caso tampoco es posible confirmar mediante los haplotipos de ADN mitocondrial. Y en definitiva, la información es insuficiente como para aceptar la relación de hermandad, pero también lo es para rechazarla.

En la *Tabla 77* se establecen varias relaciones que afirman que distintos restos esqueléticos pertenecen al mismo individuo, sin embargo debemos rechazar todas esas hipótesis, ya que se trata en su totalidad

de individuos enterrados en hoyos diferentes que además no comparten las mismas características antopológicas de edad y sexo. Además se debe tener en cuenta que la mayoría de ellas están basadas en un número ínfimo de marcadores compartidos.

De entre todas las posibles relaciones de parentesco planteadas en la *tabla 77*, la relación que parece presentar características más fiables es la que establece una relación de hermandad entre los individuos 2TOR Y 7TOR. La relación de hermandad muestra un LR de 105,391 (probabilidad del 99,06%) utilizando los criterios 4 y 5. Para ello se han empleado 3 marcadores que comparten alelos entre sí. El LR no es extremadamente alto, pero dos hermanos reales podrían presentar LRs de hermandad entre sí incluso inferiores, llegando incluso a no compartir ningún alelo, y sin dejar por ello de ser hermanos. Se trata de dos varones de edades similares. Otras característica compatible con esta relación, es que además comparten el mismo haplotipo de ADN mitocondrial, lo cual parece dar mayor apoyo a la hipótesis. A pesar de tratarse de dos individuos enterrados en hoyos diferentes, todo parece apuntar a una posible relación de hermandad entre ellos dos.

Otra relación con un LR relativamente elevado que se plantea es que 1 TOR y 4TOR sean el mismo individuo (LR de 666,094 y probabilidad del 99,85% empleando el criterio 4). Sin embargo estos los restos correspondientes a cada uno de estos individuos se encuentran enterrados en dos hoyos diferentes, por lo que esta hipótesis pierde fiabilidad, que se reduce aún más porque presentan características muy diferentes, ya que 1TOR es un individuo infantil de 6 o 7 años de edad y 4TOR es un individuo varón adulto de más de 45 años. No obstante, dado que comparten alelos iguales en dos marcadores, podría valorarse la posibilidad de que se trate de una relación padre-hijo. Sin embargo los resultados obtenidos son muy escasos como para poder afirmarlo con certeza.

Los individuos 6TOR y 8TOR comparten el mismo haplotipo de ADN mitocondrial (263G, 315.1C), y además presentan el alelo 13 en el marcador D8S1179. Pero los datos de STRs autosómicos son insuficientes para poder establecer ningún parentesco. A pesar de que la diferencia de edad así como el pertenecer a un mismo linaje mitocondrial podría ligar a estos individuos de algún modo estrecho, pero no podemos confirmar esta relación por falta de datos.

Como conclusión final al análisis de STRs en este yacimiento, podemos decir que a grandes rasgos, entre los individuos analizados dentro del yacimiento de Tordillos, se obtenienen LRs claramente superiores a los observados para otros yacimientos, como por ejemplo los Rompizales. Y a pesar de la escasez de resultados se observa que los individuos enterrados en los diferentes hoyos, presentan alelos similares en diversos marcadores, por ejemplo mostrando una elevadísima frecuencia del alelo 13 en el marcador D8S1179 y también una elevada frecuencia de los alelos 17 y 18 en el marcador D22S1045. Esto parece apuntar a que los individuos aquí enterrados probablemente guarden relaciones más próximas entre sí que los que encontrábamos por ejemplo en Los Rompizales o en La cueva de la Revilla. Sin embargo, en cualquier caso los resultados son muy escasos para poder definir relaciones de parentesco cercanas con solidez. Una excepción podemos observarla respecto a los individuos 2TOR Y 7TOR, que posiblemente sean hermanos.

Esto apuntaría a que probablemente todos los individuos de los diferentes hoyos pudieran tener cierta vinculación más o menos intensa, y sin tener que pertenecer a un mismo hoyo para que el lazo familiar fuera más intenso, ya que esa es la única relación de parentesco más clara que ha sido perceptible. Sin embargo no podemos negar la existencia de otras relaciones como ocurría en el caso de Los Rompizales. Tal vez la organización en diferentes hoyos responda a otro tipo de causa, no sencillamente familiar, sino de carácter cronológico respecto del momento de la muerte, por ejemplo.

6.4.8 Análisis de STRs autosómicos en La Requejada (San Román de Hornija, Valladolid)

El análisis de STRs autosómicos de los restos esqueléticosd del yacimiento de La Requejada en el desarrollo de esta tesis doctoral, no ha generado resultados suficientes para poder ser considerados. Por esa razón, los resultados no se han incluido en el apartado “Resultados” de este trabajo, por no reunir la calidad suficiente.

No obstante, se han llevado a cabo estudios de ADN previos sobre el conjunto de individuos de este yacimiento y parecían apuntar a una posible relación de paternidad entre el individuo 1LR y el 3LR (*Esparza et al., 2012b: 307-308; Baeza et al., 2008*). Este resultado no es descartable con los resultados obtenidos durante el pertinente análisis llevado a cabo en esta tesis, pero los resultados tampoco son lo suficientemente sólidos como para confirar esa relación de paternidad.

6.4.9 Análisis de STRs autosómicos en El Cerro (La Horra, Burgos)

Al igual que ocurría en el caso anterior (La Requejada), en este de nuevo los resultados obtenidos tras el estudiod e STRs autosómicos han sido insuficientes para poder incluirlos en la presente tesis doctoral. No obstante, no debemos pasar por alto que con anterioridad se han llevado a cabo estudios de estas características sobre esos mismos restos esqueléticos; teniendo en cuenta que los criterios para el establecimiento de perfiles genéticos en dichos estudiso no fueron los mismos que los establecidos en esta tesis.

En los trabajos anteriores, se detectó la presencia de una posible relación de hermandad entre los individuos 1ELC y 3ELC (*Esparza et al., 2012b: 307-308; Baeza et al., 2008*). Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede añadir un dato más que aporta solidez a la hipótesis de hermandad, y este es el dato del ADN mitocondrial, inédito de esta tesis. Dado que los perfiles de ADN mitocondrial de dichos individuos (1ELC y 3ELC) son idénticos, se apoyaría en mayor medida la relación de hermandad entre ellos. No obstante, de nuevo el análisis de STRs autosómicos ha sido muy limitado, y no es posible asegurar la relación de hermandad de manera clara con los datos obtenidos en esta tesis; aunque sí podemos afirmar la probable relación de los tres individuos del enterramiento (1ELC, 2ELC y 3ELC) a través de la linea

germinal femenina (materna), por compartir el mismo haplotipo de ADN mitocondrial.

Por lo tanto, según el conjunto de datos antropológicos (edades relativas de los individuos), así como el análisis de ADN mitocondrial y STRs de ADN nuclear, todo parece indicar que se trate de tres individuos emparentados a través de la línea materna, y probablemente hermanos entre sí; sin embargo ese último dato no ha sido confirmable por completo mediante los resultados obtenidos en esta tesis empleando los criterios para el establecimiento de perfiles sólidos de STRs autosómicos propuestos.

6.4.10 Valoración Poblacional Del Análisis De STRs Autosómicos

Con los resultados relativos al análisis de STRs autosómicos, junto con las valoraciones realizadas en la anterior discusión (apartado 6.4), se ha construido la *tabla 80* en la que se muestran las relaciones de parentesco claramente establecidas, así como los linajes de ADN mitocondrial que podrían estar ligados a otras relaciones menos estrechas, así como la pertenencia de cada yacimiento a un periodo crono-cultural determinado.

A la luz de los resultados obtenidos, que pueden verse sumarizados en la *Tabla 80,* podemos observar que no se percibe una tendencia clara en los patrones de enterramiento grupal en función del parentesco entre los individuos. Sin embargo, debemos resaltar que en el caso de Tordillos parece probable que existan más relaciones de parentesco que las determinadas, que no ha sido posible detectar debido a la mala calidad de los resultados obtenidos; síntoma de que debiera ser así es una mayor proporción de linajes mitocondriales compartidos así como valores de LR más elevados de lo habitual a pesar de los perfiles pobremente completos obtenidos. Esta sería la única excepción, ya que en el caso de Los Tolmos, el enterramiento LTB no parece consistir en una tumba familiar, lo más probable es que se tratara de un enterramiento en el que fueron inhumadas de manera simultánea dos mujeres sin ningún parentesco aparente entre ellas, una de las cuales estaba embarazada.

No obstante, hay que tener presente, que no es muy frecuente encontrar a una familia al completo enterrada de forma simultánea, ya que no es lo habitual que la totalidad de una familia fallezca a la vez, a menos que estemos tratando con alguna situación excepcional en la que haya tenido lugar algún incidente que afecte a todos los miembros de una misma familia, cosa que podría haber ocurrido en enterramientos cogotenses triples de carácter simultáneo (*Esparza et al., 2012a, pp. 299-300*).

A la luz de los datos genéticos (sin consideraciones arqueológicas basadas en la proporción de enterramientos colectivos y múltiples e individuales), y considerando únicamente los enterramientos aquí estudiados, no parece que se perciba un mayor grado de familiaridad entre los individuos inhumados en los mismos espacios a medida que nos alejamos de la Edad de Cobre y nos adentramos en la Edad del Bronce. De modo que durante la cultura Protocogotas I se siguen observando enterramientos múltiples en los que los individuos inhumados no presentan ningún parentesco entre sí, como es por ejemplo el

caso de Los Rompizales. Y al mismo tiempo, podemos observar probables casos de hermandad entre individuos exhumados de tumbas colectivas durante el PreCampaniforme y la Edad del Bronce (Cueva de la Revilla y en el Hoyo ritual de Cercados) (*Tablas 71 y 73*).

6.5 DISCUSIÓN SOBRE EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL SEXO

La metodología más satisfactoria para el diagnóstico molecular del sexo fue el empleo de kits de amplificación de STRs que incluyen un fragmento del gen de la amelogenina, siendo el más efectivo el kit NGM. Sin embargo, cuando la única finalidad del estudio es la determinación del sexo (sin análisis de marcadores autosómicos), no compensa económicamente la utilización de un kit de estas características; por esta razón sería de gran utilidad la creación de un set de marcadores sexuales (del cromosoma X y del cromosoma Y) de pequeño tamaño molecular, que permitan la determinación del sexo de manera más directa y económica a partir de muestras críticas. No obstante, a pesar de obtenerse un diagnóstico molecular del sexo en un número inferior de casos mediante RT-PCR (*Alonso et al., 2004*), los resultados obtenidos mediante esta técnica han resultado de gran utilidad para confirmar los obtenidos mediante la amplificación de STRs en un total de 6 casos.

A pesar de las dificultades, en total se ha obtenido la determinación del sexo molecular en el 55,7% de los casos analizados (Ver *Tabla 81*).

En 15 casos (38,46%) el sexo molecular vino a corroborar el determinado mediante los protocolos antropológicos. En 7 casos (17,95%) no coincidieron los resultados moleculares con los antropológicos. En el 43,6% restante de los casos, no se había llegado a una determinación del sexo mediante protocolos antropológicos, de modo que en este gran conjunto el único modo para determinar el sexo fueron los métodos genéticos. Se trata de una proporción relativamente elevada de casos, en los cuales el único método posible para determinar el sexo sería el molecular (*Tabla 81*).

Con la excepción del periodo preCampaniforme, en el cual la proporción de varones y mujeres se observa bastante equitativa, durante el Bronce Antiguo y la cultura Protocogotas I se observa una mayor presencia masculina (*Figura 84*). En el caso del Bronce Antiguo debemos considerar que únicamente se dispuso de restos de dos yacimientos en los que se ha podido determinar el sexo únicamente en 6 individuos. Durante el periodo Protocogotas I llama la atención la desigual proporción de sexos encontrada siendo mucho más elevada la cantidad de hombres que de mujeres (Ver *Figura 85*).

El sesgo viene a unirse a otros señalados para los restos humanos de Protocogotas y Cogotas I, especialmente de índole paleodemográfica, que apuntan hacia el carácter no representativo del conjunto enterrado respecto de toda la población, y al entierro solamente de una fracción de la población atendiendo a circunstancias de la muerte (*Esparza et al, 2012a y 2012b*).

A veces creo que hay vida en otros planetas, y a veces creo que no. En cualquiera de los dos casos la conclusión es asombrosa.

Carl Sagan

7 CONCLUSIONES (Español)

7.1 CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS METODOLÓGICOS

7.1.1 Objetivo 1.

Evaluar la obtención de ADN a partir de muestras antiguas en función de distintas características de la muestra y el individuo: edad del individuo, tipo de tejido (óseo o dental), antigüedad, coloración de la muestra, presencia de consolidantes y/o tintas, etc. Así como en función de la técnica empleada: Amplificación de ADN mitocondrial, amplificación de marcadores autosómicos o marcadores para la determinación del sexo.

7.1.1.1 Conclusión 1.

Las principales causas de fracaso en la obtención de resultados fueron, por este orden, la presencia de daño molecular, que impidió la obtención de resultados sólidos en 28 muestras (16,27% del total), la ausencia total de ADN (en 22 muestras, el 12,79% del total) y finalmente, la presencia de ADN contaminante (en 8 muestras, el 4,65% del total).

7.1.1.2 Conclusión 2.

Los resultados fueron más efectivos en el análisis de ADN mitocondrial que en el análisis de STRs autosómicos. De modo que no fue posible amplificar ADN nuclear en el 36,6% de las muestras, frente a tan solo un 1,429% de fracaso en la amplificación de ADN mitocondrial.

7.1.1.3 Conclusión 3.

La antigüedad de la muestra valorada tanto en función de la datación radiocarbónica de la misma como en función de una organización que atienda a los distintos conjuntos crono-culturales estudiados, influye de manera significativa en la obtención de resultados válidos. Así se advierte una mejor conservación de los restos en los conjuntos cronológicamente más modernos, a excepción del grupo Cogotas I. Esta aparente excepción tal vez sea debida al pequeño tamaño muestral de este conjunto.

7.1.1.4 Conclusión 4.

Las muestras más problemáticas han sido las piezas óseas, especialmente cuando estas eran de individuos infantiles o perinatales, siendo más susceptibles de sufrir daño molecular, así como de ser contaminadas con ADN exógeno. La causa de este fenómeno seguramente se encuentra en que ese trata de piezas en crecimiento, con elevado grado de porosidad.

7.1.1.5 Conclusión 5.

Se ha observado que el empleo de muestras fragmentadas o con grietas influye significativamente en la obtención de resultados fiables, observándose hasta un 60% de fracaso en la obtención de resultados cuando la muestra presenta grietas. Este fracaso se debe fundamentalmente a la fragmentación directa de las cadenas de ADN, no estando asociado a fenómenos de alteraciones moleculares ni de contaminación. Ninguna otra característica macroscópica (caries, desgaste, coloración, etc.) parece influir de manera significativa en la obtención de resultados.

7.1.1.6 Conclusón 6.

Las tintas que componen los rotuladores indelebles, o los barnices empleados para proteger los rótulos, parecen influir de manera muy negativa en los resultados obtenidos, estando íntimamente relacionados con la obtención de resultados en los que se aprecia fragmentación y daño molecular (probablemente generado por compuestos como el tolueno o el xileno). Además también se aprecian niveles significativamente superiores de contaminación en las muestras rotuladas, probablemente esto sea un efecto derivado de la fragmentación y el daño molecular generado, que hace a la muestra más susceptible de ser contaminada.

7.1.2 Objetivo 2.

Comparar la eficiencia de dos metodologías diferentes para la extracción de ADN antiguo y su adecuación para el estudio de muestras críticas de origen arqueológico o forense. Del mismo modo se evaluará la eficiencia de un protocolo de extracción no destructivo.

7.1.2.1 Conclusión 7.

Según los resultados obtenidos, el protocolo 1 de extracción de ADN, parece resultar más eficiente que el protocolo 2; sin embargo debe tenerse en cuenta el limitado tamaño muestral con el que se ha trabajado.

7.1.2.2 Conclusión 8.

El método de pulverización de la muestra (mediante mortero, taladro o molino refrigerado con nitrógeno líquido) no parece ser la causa de la diferente eficiencia en la extracción, que parece radicar exclusivamente en el proceso de extracción.

7.1.2.3 Conclusión 9.

El método de extracción no destructivo parece ofrecer resultados tan válidos como los métodos destructivos. No obstante la prueba se ha realizado con un número reducido de muestras y sería muy recomendable llevar a cabo nuevas pruebas ampliando el tamaño muestral. Además hay que anotar que el aspecto macroscópico de la muestra tras someterla a la extracción no destructiva, no es el mismo que presentaba en su origen, por lo que aunque no sea completamente destructiva, sí que altera en mayor o menor medida el aspecto de la muestra.

7.1.3 Objetivo 3.

Definir un criterio específico para el establecimiento de perfiles consenso sólidos de STRs autosómicos a partir de perfiles parciales obtenidos tras el análisis de muestras antiguas o críticas.

7.1.3.1 Conclusión 10.

Tomando como premisa inicial que el mejor criterio es aquel que proporcione más información sin generar errores, se considera el criterio 3 como el más apropiado por ser suficientemente bueno, no generar falsos positivos hasta donde se ha observado y ser menos restrictivo que los criterios 1 y 2.

7.1.3.2 Conclusión 11.

Los criterios 4 y 5 pueden emplearse, pero maximizando las precauciones. Para ello siempre deben compararse con el resultado proporcionado por el criterio 3 y del mismo modo siempre habrá que tener muy en cuenta el número de marcadores empleados en el establecimiento de la relación de parentesco, así como considerar la coherencia de los resultados con los de otros marcadores (por ejemplo el ADN mitocondrial, cromosoma Y o cromosoma X).

7.1.4 Objetivo 4.

Evaluación de los diferentes métodos para la determinación del sexo molecular de los individuos.

7.1.4.1 Conclusión 12.

La metodología más satisfactoria para el análisis del sexo molecular es el empleo de kits de amplificación de STRs que incluyen un fragmento del gen de la amelogenina. No obstante este método también es el más costoso, económicamente hablando. Por ello es necesaria la exploración de este campo para crear una metodología más apropiada para la determinación del sexo, que no suponga el empleo de un costoso kit comercial cuya finalidad es mucho más amplia que una simple determinación del sexo.

7.2 CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS DE ÍNDOLE POBLACIONAL – CULTURAL

7.2.1 Objetivo 5.

Estimar la continuidad/discontinuidad genética entre los pobladores de la Submeseta norte de la Península Ibérica a lo largo de los periodos estudiados; desde el Precampaniforme (4000 B.P), hasta el final de la Edad del Bronce (2700 B.P).

7.2.1.1 Conclusión 13.

A la luz de los rseultados obtenidos, parecen existir dos grandes cambios en la composición genética de las poblaciones estudiadas a lo largo de los diferentes periodos analizados. Según los datos obtenidos a partir de las poblaciones analizadas de manera exclusiva en esta tesis doctoral, parece existir un cambio importante en la composición genética de la población de la Submeseta Norte con la aparición de la cultura Protocogotas I. Además, si analizamos los datos obtenidos a partir de las poblaciones analizadas en esta tesis de manera integrada con las poblaciones ya existentes en la Península Ibérica durante periodos anteriores (Paleolítico, Mesolítico y Neolítico); observamos que además, también habrá tenido lugar un cambio sustancial durante el periodo Precampaniforme.

7.2.1.2 Conclusión 14.

Los resultados obtenidos parecen sugerir que la Población Precampaniforme y la Protocogotas I son genéticamente diferentes entre sí.

7.2.1.3 Conclusión 15.

Tras el Neolítico Final, en los comienzos del Calcolítico, tuvo lugar la llegada de una población foránea caracterizada especialmente por una elevada frecuencia del haplogrupo K, que generó una reducción en el conjunto de la población de las frecuencias de los haplogrupos H y U, dominantes durante el Neolítico. Esta nueva población Precampaniforme llegó tal vez desde el noroeste peninsular y se fue expandiendo progresivamente, de modo que durante el Campaniforme ya no existían diferencias reseñables, ya que el efecto de llegada se fue disolviendo.

7.2.1.4 Conclusión 16.

Durante fa fase Protocogotas, parece haber tenido lugar de nuevo un importante cambio poblacional que se refleja en su composición genética, especialmente localizado hacia el sureste de la Submeseta Norte. En este caso el cambio podría venir dado en parte por un retroceso de las poblaciones propias del Precampaniforme (con dominancia del haplogrupo K) y también por la llegada de nuevos contingentes (principalmente asociados al haplogrupo HV0). El fenómeno de retroceso explicaría que las poblaciones Protocogotas presenten gran similitud con las poblaciones Neolíticas muy anteriores en el tiempo (con el incremento de frecuencias de los haplogrupos H y U). Sin embargo esto también podría ser ser debido a una nueva inmigración independiente, que traería consigo estos dos haplogrupos (H y U) además del HV0. Todos estos cambios podrían contribuir a esclarecer la formación de la cultura Protocogotas I - Cogotas I, todavía difícil de explicar, como se recogió en el punto 2.1.4 de la introducción.

7.2.1.5 Conclusión 17.

Al comienzo de las llegadas de nuevas poblaciones genéticamente diferentes, tanto durante el Precampaniforme como durante el periodo Protocogotas I, parece apreciarse cierto grado de aislamiento genético en diferentes puntos geográficos, especialmente entre el norte y el sur del Duero en la mitad oriental de la Submeseta Norte. Sin embargo, este aislamiento de las nuevas poblaciones respecto de las endémicas fue reduciéndose progresivamente, y se hizo imperceptible ya durante el Campaniforme, así como durante el desarrollo de la cultura Cogotas I.

7.2.2 Objetivo 6.

Establecer si las variaciones en el ritual funerario y la cultura material observadas a lo largo de los periodos estudiados consisten en cambios culturales que no implican un cambio en la población real de la región; o si por el contrario se detecta la llegada de contingentes humanos que contribuyan a tales cambios.

7.2.2.1 Conclusión 18.

Las dos culturas arqueológicas denominadas Campaniforme y Cogotas I si parecen estar relacionadas con un cambio sustancial en la población. Pero dicho cambio debió de producirse de forma previa al máximo desarrollo de cada una de las culturas. Es decir, el cambio genético en la población sucede de manera inmediatamente anterior al despliegue de la nueva cultura material. Por ello, se aprecia un cambio significativo en la composición genética de la población durante la fase Precampaniforme, aunque el cambio cultural (Campaniforme) llegará posteriormente. Lo mismo sucede con la cultura Cogotas I, ya que el cambio poblacional importante tiene lugar ya durante el periodo formativo Protocogotas I, que culmina en la fase de plenitud de la cultura Cogotas I. Se refuerza así la argumentación arqueológica de una continuidad entre las dos fases de esta gran cultura.

7.2.3 Objetivo 7.

Determinar si la transmisión de la cultura, especialmente en cuanto a la cerámica, sigue un patrón femenino. Teniendo en cuenta que las mujeres transmiten su ADN mitocondrial, los cambios en los patrones de trabajo de la cerámica podrían reflejar cambios en la población femenina.

7.2.3.1 Conclusión 19.

A la luz de los resultados obtenidos podemos afirmar que los cambios en los patrones de trabajo (técnicos y decorativos) de la cerámica pudieran asociarse en cierta medida a cambios en la composición femenina de la población, ya que las dos culturas más importantes estudiadas (Campaniforme y Cogotas I), se desarrollan tras un cambio sustancial en la composición genética de la población en lo que refiere al ADN mitocondrial, que es un marcador del linaje materno (femenino).

7.2.4 Objetivo 8.

Valorar en función de los resultados obtenidos dónde se sitúan con mayor probabilidad los orígenes de las culturas Campaniforme y Cogotas I.

7.2.4.1 Conclusión 20.

Las poblaciones de los Areneros y los Cercados, del periodo Precampaniforme de la Submeseta norte de la Península Ibérica, muestran cierta similitud genética con poblaciones Neolíticas Epi-Cardiales de la Península Ibérica, así como con las poblaciones de la cultura Schöningen de la zona de Sajonia. Por otro lado, el yacimiento de El Tomillar (también Precampaniforme), presenta características similares a

las del Neolítico Portugués, y a la Cultura Campaniforme Alemana. Todo ello parece indicar que la cultura Campaniforme de la Submeseta Norte de la Península Ibérica podría tener un origen a medio camino entre poblaciones propias de la Península y poblaciones procedentes del centro y norte de Europa. No obstante, aún es necesario profundizar en la investigación, ya que los elementos de comparación son muy escasos y distantes, resultando de especial interés disponer de información sobre los yacimientos del Campaniforme de Portugal.

7.2.4.2 Conclusión 21.

En lo relativo a la cultura Cogotas I, no se observa con claridad un origen alóctono. Se aprecia cierta proximidad de las poblaciones Protocogotas I con grupos de la Edad del Bronce de Alemania e incluso de Siberia, sin embargo la coincidencia no es lo suficientemente fuerte como para determinar una clara vinculación.

7.3 CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS RELACIONADOS CON EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES DE PARENTESCO

7.3.1 Objetivo 9.

Verificar las hipótesis de parentesco formuladas a partir de otras disciplinas (arqueología y antropología), mediante el análisis genético de marcadores nucleares STR en los distintos conjuntos de enterramientos colectivos.

Los Tolmos (Caracena, Soria)

7.3.1.1 Conclusión 22.

La tumba triple LTB del yacimiento de Los Tolmos no constituye un núcleo familiar completo. El enterramiento está compuesto por tres individuos femeninos, dos de los cuales son adultos y uno un individuo perinatal. El estudio de relaciones de parentesco realizado en conjunto con la información arqueológica y antropológica, parece indicarnos que el individuo LTB1 (en la parte derecha de la tumba) es la madre del individuo perinatal LTB3. Tratándose con elevada probabilidad de un enterramiento en el que se inhumaron dos mujeres una de las cuales (LTB1) embarazada a término. La otra mujer adulta (LTB2) no parece presentar ninguna vinculación a través del linaje materno con los otros dos individuos, ni tampoco se han encontrado signos de parentesco cercano, aunque no es posible descartar totalmente que se trate de una mujer del linaje paterno de LTB3, como podría ser la abuela o una tía paternas.

7.3.1.2 Conclusión 23.

El individuo del otro enterramiento (LTA) del yacimiento de Los Tolmos fue determinado genéticamente como varón, y no parece existir ningún lazo de parentesco cercano entre este individuo y las tres mujeres de la tumba LTB del mismo yacimiento.

Los Areneros (La Lastrilla, Segovia)

7.3.1.3 Conclusión 24.

Los individuos inhumados en el enterramiento colectivo del yacimiento de Los Areneros, no parecen mantener relaciones de parentesco cercano entre sí. Además tampoco están vinculados a través del linaje materno, ya que no comparten perfiles de ADN mitocondrial, excepto en el caso de los individuos 7ARE y 24ARE.

7.3.1.4 Conclusión 25.

No se han obtenido resultados suficientes para poder establecer una relación de parentesco entre los individuos 7ARE Y 24ARE, que comparten el mismo haplotipo de ADN mitocondrial.

La Cueva De La Revilla (Atapuerca, Burgos)

7.3.1.5 Conclusión 26.

La única relación de parentesco posible con un nivel de fiabilidad aceptable tiene lugar entre los individuos 1REV y 2REV, pudiendo tratarse de una relación de medio-hermanos (por vía paterna, ya que no comparten sus perfiles de ADN mitocondrial) (LR de 425,216) o de primos (también por vía paterna) (LR de 128,372). Sin embargo la probabilidad de esta relación no es lo suficientemente elevada como para afirmarla con seguridad, contando con la desventaja que aun tratándose de una relación cierta en este tipo de relaciones se puede establecer un LR relativamente bajo, sin que por ello sea falsa la relación.

Los Cercados (Mucientes, Valladolid)

7.3.1.6 Conclusión 27.

En el enterramiento colectivo del yacimiento de los Cercados, en el que se hallaron tres cráneos con rasgos antropológicos femeninos y una maxila que no pudo ser atribuida a ninguno de los cráneos por la metodología antropológica clásica, se ha podido determinar con seguridad que hay un total de tres individuos. En efecto, el análisis de STRs autosómicos ha permitido establecer que la maxila denominada como 4CER pertenece al mismo individuo que el cráneo denominado 2CER (LR de 5.91065e+010;

probabilidad de un 99,99999999%). Se pone de manifiesto así la potencia de la metodología para resolver este tipo de problemas de individualización, tan frecuente en las investigaciones arqueológicas.

7.3.1.7 Conclusión 28.

Los tres individuos que forman parte del enterramiento del yacimiento de Los Cercados han sido determinados molecularmente como tres mujeres, confirmando así, en este caso, la determinación del sexo mediante protocolos antropológicos.

7.3.1.8 Conclusión 29.

Se establece una posible relación de hermandad entre los individuos 1CER y 3CER (LR de 283,008; 99,65% de probabilidad) del yacimiento de Los Cercados. Sin embargo no ha sido posible confirmar esta relación mediante el análisis de ADN mitocondrial, por lo que no se puede descartar que esas dos mujeres fuesen medio-hermanas (LR de 141,186; 99,30% de probabilidad). Podría ser relevante para la investigación prehistórica el hecho de que las tres mujeres seleccionadas para un ritual violento tuviesen ese parentesco.

Los Rompizales (Quintanadueñas, Burgos)

7.3.1.9 Conclusión 30.

Los individuos exhumados en el hoyo múltiple simultáneo del yacimiento de los Rompizales no presentan lazos familiares próximos entre sí, ni tampoco se encuentran emparentados a través de la línea germinal femenina (ADN mitocondrial). El resultado es sorprendente frente a la tradicional suposición arqueológica de que los individuos enterrado sjuntos tendrían especial proximidad y deberá ser objeto de explicación a la luz de otros casos comparables.

Tordillos (Aldeaseca De La Frontera, Salamanca)

7.3.1.10 Conclusión 31.

No se han obtenido resultados suficientes como para establecer relaciones de parentesco claras entre los distintos individuos inhumados en los diferentes hoyos del yacimiento de Tordillos. Sin embargo, tampoco se puede descartar la relación de parentesco entre ellos, que son probables, ya que se observan elevadas frecuencias de ciertos alelos. No obstante el número de marcadores amplificados es muy bajo para poder determinar relaciones de parentesco en general, con la excepción de los individuos 2TOR Y 7TOR.

7.3.1.11 Conclusión 32.

Existe una posible relación de hermandad entre los individuos 2TOR Y 7TOR (LR de 105,391; probabilidad del 99,06%), ubicados en dos hoyos diferentes del yacimiento de Tordillos. Además los resultados obtenidos mediante el análisis de STRs autosómicos se ven apoyado por los perfiles de ADN mitocondrial. Es un dato interesante para su valoración arqueológica el que individuos emparentados, posiblemente hermanos, aparezcan enterrados en hoyos diferentes.

El Cerro (La Horra, Burgos)

7.3.1.12 Conclusión 33.

No ha sido posible el establecimiento de relaciones de parentesco cercano entre los tres individuos exhumados del enterramiento colectivo de El Cerro (La Horra, Burgos) a través del análisis de STRs autosómicos. Sin embargo el hecho de que compartan el mismo haplotipo de ADN mitocondrial, nos permite afirmar que con gran probabilidad se trata de individuos vinculados a través del linaje materno, pero no podemos concretar más el tipo de relación que les une.

7.3.2 Objetivo 10.

Establecer la existencia (o no) de diferentes patrones de enterramiento a lo largo de los periodos crono-culturales estudiados; en función de la observación o no de lazos familiares cercanos en enterramientos colectivos o múltiples.

7.3.2.1 Conclusión 34.

Según los resultados obtenidos, se observan patrones de enterramiento múltiple o colectivo en los que los individuos no guardan ningún tipo de parentesco cercano entre sí a lo largo de los diferentes periodos analizados (Precampaniforme, Bronce Antiguo y Protocogotas) sin una tendencia clara. Aunque no se pueden descartar ciertas relaciones de parentesco cercano concretas en casos muy determinados, no es la tendencia generalizada.

7.4 CONCLUSIONES CORRESPONDIENTES A LOS OBJETIVOS RELACIONADOS CON LA DETERMINACIÓN DEL SEXO

7.4.1 Objetivo 11.

Determinación del sexo molecular de los individuos, para poder contribuir a establecer la estructura de la población en lo referido al sexo.

7.4.1.1 Conclusión 35.

Con la excepción del periodo Precampaniforme, durante el cual la proporción de varones y mujeres es bastante equilibrada; durante el Bronce Antiguo y la cultura Protocogotas se observa una mayor presencia masculina en la muestra analizada.

7.4.1.2 Conclusión 36.

Es interesante el resultado concreto del enterramiento precampaniforme de los Areneros (La Lastrilla, Segovia), dónde hay más varones (6) que mujeres (1), importante sesgo que deberá ser tenido en cuenta en la publicación definitiva del yacimiento.

7.4.2 Objetivo 12.

Valorar la existencia de diferencias culturales (posición del cuerpo en el enterramiento, diferenciación en la cultura material, etc.) en función del sexo del individuo.

7.4.2.1 Conclusión 37.

En la mayor parte de los casos en los que ha sido posible la determinación del sexo molecular no se disponía de información arqueológica relativa a la posición del cuerpo ni había elementos culturales asociados, dado que en su mayoría se trataba de enterramientos con mezcla de individuos y restos esqueléticos dispersos. Por lo tanto, no ha sido posible la asignación de un patrón de enterramiento en función del sexo de los individuos. Con todo, los casos de éxito en la determinación de sexo en enterramientos individuales podrán ser incorporados en la correspondiente discusión arqueológica, contribuyendo así a dar mayor seguridad en la búsqueda de posibles pautas (decúbito lateral por sexos, especialmente).

8 CONCLUSIONS (English)

8.1 CONCLUSIONS ABOUT THE METHODOLOGICAL OBJECTIVES

8.1.1 Objective 1.

To evaluate the obtaining of DNA from ancient samples, depending on the different characteristics of the sample and the individual: age, kind of tissue (dental or osseous), antiquity, colour of the sample, treatments with glue and permanent markers, etc. In the same way, different experimental procedures for the amplification of DNA (mitochondrial DNA or nuclear DNA) will be evaluated.

8.1.1.1 Conclusion 1.

The main cause of failure to obtain successful results was the presence of molecular damage, which avoided to achieve solid results in 28 samples (16,27%). The second cause was a total absence of DNA (22 samples - 12,79%) and finally, the third cause was the presence of exogenous DNA (8 samples, the 4,65%).

8.1.1.2 Conclusion 2.

The mitochondrial DNA analysis was more successful than the autosomal STR analysis. So that, nuclear DNA amplification has not been possible in the 36,6% of the samples, versus only the 1,43% of failure rate in mitochondrial DNA amplification.

8.1.1.3 Conclusion 3.

The antiquity of the sample, valued by its radiocarbon dating or according to its belonging to the different crono-cultural periods, shows a significantly influence on the obtaining of good results. In such a way, the latest is the sample, the better is the result. With the exception of the Cogotas I group, probably because of the small sample size of this group.

8.1.1.4 Conclusion 4.

In relation to the kind of tissue, the most problematic samples were bones, even more when these samples came from children, new-borns or fetus. In all these cases, the samples have shown higher levels of molecular damage, and contamination. The cause of this phenomenon is probably concerning the fact that the bone tissue is growing in all these cases and so that it shows high levels of porosity.

8.1.1.5 Conclusion 5.

It has been observed that the use of fragmented samples or samples with cracks or cavities shows a significant influence on the obtaining of reliable results, with up to 60% of unsuccessful results when the sample has these characteristics. This failure is mainly due to the direct fragmentation of the DNA chains, but there is no evidence to prove an association with other phenomena like molecular damage or contamination with exogenous DNA. Furthermore, it looks like there is no other macroscopic feature showing a significant influence on the obtaining of reliable results.

8.1.1.6 Concluson 6.

The inks of the permanent markers, or the varnishes employed to protect the signs of some samples, seem to exert a very negative influence on the results, showing higher levels of DNA fragmentation and molecular damage (probably associated with components like toluene and xilene). Moreover, there have been detected also higher levels of contamination on signed samples, probably as a result of the DNA fragmentation and the molecular damage, which makes the sample more sensible to be contaminated.

8.1.2 Objective 2.

To compare the efficiency of two different methodologies for the ancient DNA extraction and their suitability to the study of critical archaeological or forensic samples. In the same way, it will be evaluated a non-destructive methodological procedure.

8.1.2.1 Conclusion 7.

In the light of the obtained results it appears that the protocol 1 for the extraction of DNA has been more efficient than the protocol 2, used in the Tor Vergata of Rome University. However, we must take into account the limitation of the number of samples analyzed.

8.1.2.2 Conclusion 8.

The different methodology employed in the sample pulverization, does not seem to be the cause of the different efficiency observed in DNA extraction. It looks like that the main cause of the different efficiency is only the extraction procedure.

8.1.2.3 Conclusion 9.

The non-destructive DNA extraction procedure seems to offer results so good as the destructive procedures. However, the experiment has been performed using a reduced number of samples, and it would be advisable to carry out additional experiments in order to increase the sample size. Moreover, we must note that the macroscopic appearance of the samples is not the same at the beginning and at the end of the process, so that in spite of the use of a non-destructive procedure, it modifies the appearance of the sample.

8.1.3 Objective 3.

To define an specific criterion for the establishment of solid consensus profiles of autosomal STRs from partial profiles of ancient or critical samples.

8.1.3.1 Conclusion 10.

Taking into account that the best criterion is the one that provides more quantity of information without mistakes, I consider that the criterion 3 is the most appropriate one because it is good enough and as far as we have observed it do not generates false positives.

8.1.3.2 Conclusion 11.

The criteria 4 and 5 can be employed, but always taking the necessary precautions. For this reason, the result obtained, by these two criteria, must be always compared with the result obtained through the criterion 3 and in the same way it must be always taken into account the number of markers considered in the relationship establishment, as well as the coherence of the results obtained with other kind of markers (like mitochondrial DNA or X and Y chromosomes).

8.1.4 Objective 4.

Evaluation of different methods for the molecular sex determination.

8.1.4.1 Conclusion 12.

The most satisfactory methodology for the molecular sex analysis is the detection by STR analysis of a fragment of the amelogenine gene. However, this method is also the most expensive. For this reason, it would be interesting the research in this way to find a most appropriate methodology for the

sex determination, not involving the use of an expensive commercial kit whose purpose is wider than a simple sex determination.

8.2 CONCLUSIONS ABOUT THE POPULATION - CULTURAL OBJECTIVES

8.2.1 Objective 5.

To estimate the genetic continuity or discontinuity between the people from the North Sub-plateau of the Iberian Peninsula along the time periods studied; since the Pre Bell Beaker period (4000 B.P.), until the end of the Bronze Age (2700 B.P.).

8.2.1.1 Conclusion 13.

In light of the results obtained, it seem to exist two main changes in the genetic composition of the studied populations along the different time periods analysed. According to the results obtained, it looks like there is an important change in the population genetic composition of the North Sub-plateau with the appearance of the Protocogotas I culture. Moreover, if we analyse the results obtained in this thesis with the results from other studies about more ancient populations (Palaeolithic, Mesolithic and Neolithic populations) of the Iberian Peninsula, it is possible to appreciate that there is another important change during the Pre Bell Beaker period.

8.2.1.2 Conclusion 14.

It can be stated that the Pre Bell Beaker Period and Protocogotas I population seem to be genetically different.

8.2.1.3 Conclusion 15.

At the beginning of the Chalcolithic period, took place the arrival of a foreign population characterized by a higher frequency of the K haplogroup. Consequently, this fact generated a decreasing of H and U haplogroups, which were dominants during Neolithic period. This new Pre Bell Beaker population probably arrived from the northwest (where we can observe the highest genetic distances respect earlier periods) and later they were expanding progressively, in such a way that during the Bell Beaker Period there was no important differences, because of the dissolution of the effect of arrival.

8.2.1.4 Conclusion 16.

During the Protocogotas I period, there was a new important population change in the southeast of the North Subplateau (Figures 48 and 49), that we can appreciate through the analysis of the genetic composition of it population. In this case the change could be partially associated with a recoil of the typical Pre Bell Beaker period populations (characterized by the K haplogroup) besides the arrival of new populations (mainly associated with the HV0 haplogroup). The recoil phenomena could explain why the Protocogotas I populations show great similarities with much older Neolithic populations with high frequencies of H and U haplogroups. However, it could be also explained due to a new independent immigration that could have brought these two haplogroups (H and U) besides the HV0. All these changes could cleared up the constitution of the Protocogotas I culture.

8.2.1.5 Conclusion 17.

At the beginning of the arrival of new genetically different populations, both during Pre Bell Beaker period and Protocogotas I, it is possible to appreciate that there was certain degree of genetic isolation in different regions. This phenomena is especially clear between the north and south sides of the Duero River on the east middle of the North Sub-plateau. However, the isolation of the new populations with respect to the endemic population was progressively reduced, along the time and disappeared during the Bell Beaker period and the Cogotas I culture.

8.2.2 Objective 6.

To establish whether the funerary rituals and material culture changes observed along the different temporal periods studied are mere cultural changes that do not imply changes in the population composition, or instead there took place the arrival of human contingents that contributed to these changes

8.2.2.1 Conclusion 18.

The Bell Beaker culture and the Cogotas I culture, seem to be associated with substantial changes in the population. However, the genetic results point that these changes should took place ahead of the time of the maximum development of each of both cultures. That is, the genetic change in the population took place immediately before of the expansion of the new material culture, both with the Bell Beaker and Cogotas I culture. Because of that, it is possible to appreciate a significant change in the genetic population composition during the Pre Bell Beaker Period, although the cultural change happens after that (Bell Beaker). The same happened with the appearance of the Cogotas I culture. The most important population change took place during the Protocogotas I period, which culminate later with the Cogotas I culture.

8.2.3 Objective 7.

To determine if the transmission of the material culture, specially about the pottery, follow a female pattern. Taking into account that the women transmit their mitochondrial DNA, the changes in the work patterns of the pottery could reflect changes in the women population.

8.2.3.1 Conclusion 19.

In light of the results obtained, it could be said that the changes in the pottery patterns are associated, to a certain extent, with changes in the female composition of the population. The two main cultures studied (Bell Beaker and Cogotas I), were mainly developed after a substantial changes in the genetic composition of the mtDNA of the population, which is a marker of the maternal lineage.

8.2.4 Objective 8.

To evaluate in terms of the results obtained, where the origin of the Bell Beaker and Cogotas I cultures is most probably located.

8.2.4.1 Conclusion 20.

On one hand, the Pre Bell Beaker populations from Areneros and Cercados sites (Sub-plateau of Iberian Peninsula) show certain genetic similarity with Neolithic populations from the Iberian Peninsula, as well as with Schöningen populations from Saxony. On the other hand, the Pre Bell Beaker population from El Tomillar site (Pre Bell Beaker) shows similarities with Portuguese Neolithic populations and with populations from Bell Beaker culture from Germany. In conclusion, it appears that the Bell Beaker culture from the North Sub-plateau of Iberian Peninsula could have an intermediate origin between Iberian populations and other populations from the Middle and North of Europe. However it is necessary to go in depth into the research, because the elements compared are limited and distant.

8.2.4.2 Conclusion 21.

Regarding the Cogotas I culture, it is not possible to determinate an origin in the Iberian Peninsula. It is possible to appreciate certain proximity with the Bronze Age populations from Germany and Siberia, however the association is not enough solid to determinate a clear relationship.

8.3 CONCLUSIONS ABOUT THE OBJECTIVES RELATED TO THE KINSHIP ANALYSIS

8.3.1 Objective 9.

To verify the hypotheses of kinship formulated by other disciplines (archaeology and anthropology), through the genetic analysis of autosomal STRs in the different multiple and collective burials.

Los Tolmos (Caracena, Soria)

8.3.1.1 Conclusion 22.

The LTB tomb from Los Tolmos site do not correspond to a complete familiar nucleus. The burial is composed by three females, two of them are adults and the third is a new-born or fetus. The result of the kinship analysis performed together with the archaeological and anthropological information points that the individual LTB1 is the mother of LTB3. In fact, LTB is probably a burial where were inhumed two women, one of them, LTB1, was pregnant when she died. The other woman, LTB2, does not seem to have any relationship through the mitochondrial or nuclear DNA with the others, but it is not possible to discard that she could be a woman related to LTB3 through hers father´s lineage, like a paternal aunt or grandmother.

8.3.1.2 Conclusion 23.

The individual LTA4 from the burial LTA of the Los Tolmos site was genetically determined as a male, and there is no evidence of any kinship between this individual and the three females from LTB tomb.

Los Areneros (La Lastrilla, Segovia)

8.3.1.3 Conclusion 24.

The inhumed individuals from Los Areneros site, do not seem to have closed genetic relationships among them. Furthermore they are not related through the maternal line (mitochondrial DNA), with the exception of 7ARE and 24ARE individuals.

8.3.1.4 Conclusion 25.

It was not possible to obtain enough results to establish a kinship relationship between 7ARE and 24ARE, which share the same mitochondrial DNA haplotype.

La Cueva De La Revilla (Atapuerca, Burgos)

8.3.1.5 Conclusion 26.

The unique possible kinship that counts with an acceptable level of reliability is between 1REV and 2REV. They could be half-brothers (LR = 425,216) or cousins (LR=128,372) through the father´s line, because they do not share the same mitochondrial DNA profile. However, the probability of this relationship is not high enough to assure it, taking into account the disadvantage that even in the case that we could confirm this relationship, these kind of relationships can share a low LR, without being false the relationship.

Los Cercados (Mucientes, Valladolid)

8.3.1.6 Conclusion 27.

In the collective burial of Los Cercados were found three skulls with feminine traits and one upper jaw, which by anthropological methodology could not be attributed to any of the skulls. It has been possible to determine with certainty that there are a total number of three individuals. The autosomal STRs analysis has allowed us to establish that the jaw (4CER) belongs to the same individual as the skull called 2CER (LR = 5,91065e+010; probability of 99,99999999%). This fact demonstrate the power of ancient DNA analysis solving such problems.

8.3.1.7 Conclusion 28.

The three individuals from Los Cercados site have been genetically determined as women, confirming in this way the result of the anthropological analysis.

8.3.1.8 Conclusion 29.

There is a possible sisterhood relationship between 1CER and 3CER (LR = 283,008; 99,65% of probability) from Los Cercados site. However, it was not possible to confirm this kinship through the analysis of mitochondrial DNA, so that it is possible that these two women were only half-sisters (LR = 141,186, 99,30% of probability).

Los Rompizales (Quintanadueñas, Burgos)

8.3.1.9 Conclusion 30.

The individuals exhumed from the multiple tomb of Los Rompizales do not show close kinship between them. There is also no relationship determined through the analysis of their maternal line (mitochondrial DNA).

Tordillos (Aldeaseca De La Frontera, Salamanca)

8.3.1.10 Conclusion 31.

There is no enough results to establish or discard clear kinship between the different individuals inhumed from de various tombs of Tordillos site. However, it is possible to observe that there are many high frequencies of determinate alleles, which could point to possible relationships, but there is no enough evidence to assure it. The number of amplified markers is low to determinate kinship in general, with the exception of the individuals 2TOR and 7TOR.

8.3.1.11 Conclusion 32.

There is a possible brotherhood relation between 2TOR and 7TOR (LR=105,391; 99,06% of probability), which were located in two different pits from Tordillos. Furthermore, the obtained results, by autosomal STR analysis, are supported by the mitochondrial DNA profiles. This data is interesting from an archaeological perspective, because there are two individuals that shares a relationship, probably brothers, located in different pits.

El Cerro (La Horra, Burgos)

8.3.1.12 Conclusion 33.

It was not possible the establishment of closed kinship between the three individuals exhumed in the same tomb of El Cerro. However, the fact that they share the same mitochondrial DNA profile allows us to think that it is possible that the three individuals were related through the maternal line. However, we cannot confirm the kind of relationship.

8.3.2 Objective 10.

To establish the existence of different burial patterns along the different crono-cultural periods studied; according to the analysis of kinship in collective and multiple burials.

8.3.2.1 Conclusion 34.

According to the results obtained, it is possible to observe collective and multiple burial patterns where the individuals have not any kind of relationship with each other along the different periods of time analysed (Pre Bell Beaker, Ancient Bronze and Protocogotas culture) without a clear tendency. It is true that it is not possible to discard certain closed kinship in concrete cases, but it is not a general trend.

8.4 CONCLUSIONS ABOUT THE SEX DETERMINATION OBJECTIVES

8.4.1 Objective 11.

Molecular sex determination, to contribute to the knowledge of the population structure as regards to sex.

8.4.1.1 Conclusion 35.

With the exception of the Pre Bell Beaker period, when the proportion of males and females is equilibrated, in general, there is a higher masculine presence in the samples used.

8.4.1.2 Conclusion 36.

It is interesting the result obtained concretely in the site of Los Areneros (La Lastrilla, Segovia), where there are much more men (6) than women (1), question that must be taken into account.

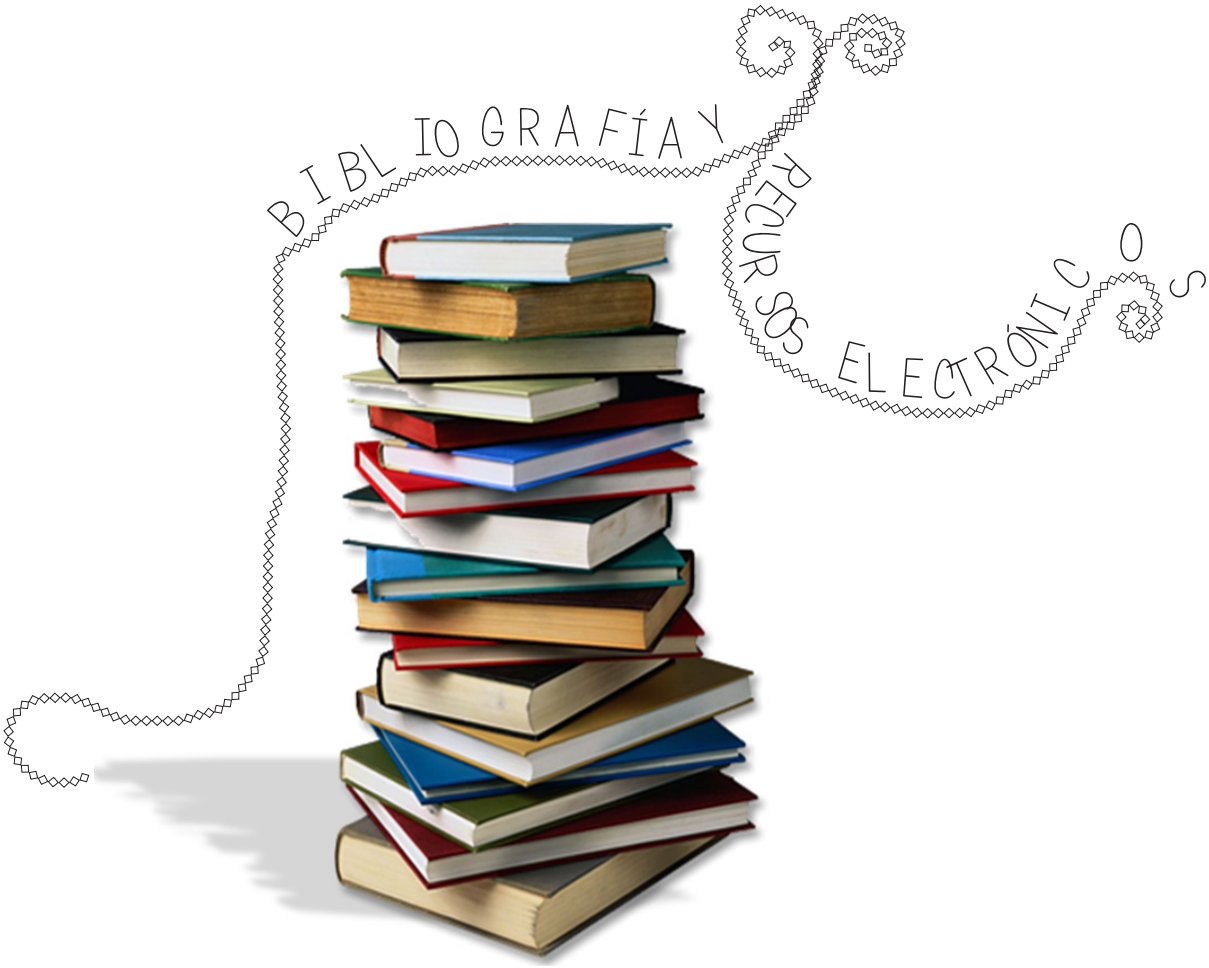
8.4.2 Objective 12.

To evaluate the existence of cultural differences depending on the sex of the individual.

8.4.2.1 Conclusion 37.

In most cases, where the sex molecular determination has been possible, there was no archaeological information about the body orientation and there was no cultural elements associated. This fact could be explained because the burials were constituted by mixed and dispersed skeletal remains. In conclusion, it has not been possible the assignation of a pattern depending on the sex of the individuals.

BIBLIOGRAFÍA Y RECURSOS ELECTRÓNICOS



Si consigo ver más lejos, es porque he conseguido auparme a hombros de gigantes.

Isaac Newton

9 BIBLIOGRAFÍA Y RECURSOS ELECTRÓNICOS

9.1 BIBLIOGRAFÍA

ABARQUERO MORAS, F. J. 2005: Cogotas I. La difusión de un tipo cerámico durantela Edad del Bronce. Valladolid, Junta de Castilla y León.

ABARQUERO MORAS, F. J.; DELIBES DE CASTRO, G.; FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, M. L. y LÓPEZ SÁEZ, J. A. 2009. "Una ojeada a la hipótesis de la hipermovilidad de los 'pastores de excisión y boquique' a la luz de los documentos de 'El Pelambre'". En González Fernández, M.L. (coord.): 'El Pelambre' Villaornate, León. El horizonte Cogotas I de la Edad del Bronce y el periodo tardoantiguo en el valle medio del Esla . Madrid: Tragsa. , pp. 291-301.

ABARQUERO-MORAS, F.J. 2005. La cerámico de Cogotas I: Nuevas respuestas a viejas preguntas. Cogotas I. La difusión de un tipo cerámico durante la Edad del Bronce (Monografías 4). Valladolid: Junta de Castilla y León. ISBN: 84-9718-293-6

ABARQUERO-MORAS, F.J., BLANCO-GONZÁLEZ, A., ESPARZA-ARROYO, Z., AND RODRÍGUEZ-MARCOS, J.A. 2013. The Central Iberian Meseta at the time of the Thera eruption: an overview. Tagungen des L andesmuseums für VorgeschichTe haLLe - Band 9.

ABARQUERO-MORAS, F.J., DELIBES DE CASTRO, G., GUERRA-DOCE, E., PALOMINO-LÁZARO, A.L. DEL VAL RECIO, J. 2012. Cuarenta siglos de explotación de sal en las lagunas de Villafáfila, Zamora (2.500A.C. - 1.500 D.C). Junta de Castilla y León. ISBN: 978-84-9718-623-0. Plan c estudio + creativo.

ABARQUERO-MORAS, F.J., PALOMINO LÁZARO, A.L., NEGREDO GARCÍA, M.J. 2005. La Cueva de la Revilla, u. n enterramiento colectivo del Bronce Protocogotas en la Sierra de Atapuerca (Burgos). BSAA arqueología, LXXI. pp. 89-136.

AKANE, A. 1998. Sex determination by PCR analysis of the X-Y amelogenin gene. Forensic DNA profiling protocols. Methods in Molecular Biology Volum 98, pp 245-249.

ALLENTOFT, M.E., COLLINS, M., HARKER, D., HAILE,J., OSKAM, C.L., HALE, M.L., CAMPOS, P.F., SAMANIEGO, J.A., GILBERTE, M.T.P., WILLERSLEV, E., ZHANG, G., SCOFIELD, R.P., HOLDAWAY, R.N. AND BUNCE, M. 2012. The half-life of DNA in bone: measuring decay kinetics in 158 dated fossils. Proc. R. Soc. B (2012) 279, 4724 - 4733. doi: 10.1098 / rspb. 2012.1745.

ALONSO, A., MARTÍN, P., ALBARRÁN, C., GARCÍA, P., GARCÍA, O., DESIMÓN, L.F., GARCÍA´HISCHFELD J., SANCHO M., DE LA RUA, C., Y FERNÁNDEZ-PIQUERAS, J. 2004. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. Forensic Sci. Int 139; pp. 141-149.

ALONSO, A., MARTÍN, P., ALBARRÁN, C., GARCÍA, P., PRIMORAC, D., GARCÍA, O., FERNÁNDEZ DE SIMÓN, L., GARCÍA-HIRSCHFELD, J., SANCHO, M., FERNÁNEZ-PIQUERAS, J. 2003. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in Forensic and Ancient DNA studies. Croatian medical Journal. Forensic Sciences. 44(3): pp. 273-280.

ÁLVAREZ GARCÍA, A., MUÑOZ, I., PESTONI, C., LAREU., M.V., RODRÍGUEZ-CALVO, M.S. Y CARRACEDO, AL. 1996. Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. Int. J. Legal Med 109: pp. 125-129.

ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., DE BRUIJN, M.H., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F. et al. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial gnome. Nature 290: pp. 457-465.

ANDREWS, R. M., KUBACKA, I., CHINNERY, P.F., LIGHTOWLERS, R.N., TURNBULL, D.M., Y HOWELL, N. 1999. Reanalysis and revision

of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNa. Nat Genet 23:147.

ANTEQUEM, S.L. 2009. Informe final de la ex¬cavación arqueológica en el yacimiento 'Los Rompizales'. Proyecto constructivo Circunvalación de Burgos BU-30. Tramo Villalbilla de Burgos-Quintanadueñas (Provincia de Burgos). Informe Técnico depositado en el Servicio Terri¬torial de Cultura (Junta de Castilla y León) de Burgos.

ARNAIZ ALONSO, M. A. y MONTERO GUTIÉRREZ, J. 2003/04. "El yacimiento de Cogotas I 'Tres Chopos- Abarre' (Villegas, Burgos): esbozo paleo-económico e implicaciones en las formas de organizaciôn social. Boletín del Seminario de Estudios de Arte y Arqueología 69-70, pp. 75-114.

ARROYO PARDO, E., OCAÑA, M.A., ARROYO, J.J., PÉREZ-PÉREZ, A., TURBÓN, D., TRANCHO, G., RODRÍGUEZ-ALBARRÁN, M.S., CASAS, J.D., ROBLEDO, B. Y BANDRÉS, F. 2002. HPLC and UV-Spectrophotometry examinatio of Ancient DNA and PCR inhibitors in Old Human Remains. Ancient Biomolecules 4:33.

ARROYO-PARDO, E., LÓPEZ-PARRA, A.M., BARRIO, P. 2009. La genealogía molecular: El ADN como herramienta de apoyo en los estudios genealógicos. Antzina. A Volumen 8. pp. 64-6.

BAEZA, C., GAMBA, C., TIRADO, M., FERNÁNDEZ, E. Y ARROYO-PARDO, E. 2008. Estudio de las relaciones familiares entre individuos procedentes de cuatro yacimientos de la Cultura Cogotas I. Informe inédito para el proyecto HUM 2005-00139/HIST.

BANDELT, H.J., FORSTER, P., RÖHL, A. 1999. Median-Joining Networks for inferring INtraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 16 (1): pp. 37-48.

BANDELT, H.J., KLOSS-BRANDSTÄTTER, A., RICHARDS, M.B., YAO, Y.G., LOGAN, I. 2013. The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference sequence (rCRS) and the standardization of notation inhuman mitochondrial DNA studies. Journal of Human Genetics 59, pp. 66-77. doi: 10.1038.

BLASCO-BOSQUED, M.C.. 2004. Los Poblados ribereños de Hoyos en el entorno madrileño. Un modelo de asentamiento de la Edad del Bronce peninsular. En: La Península Ibércia en el II milenio A.C.: poblados y fortificaciones /coord. Rosario García Huerta, Francisco Javier MOrales Hervás, 2004, ISBN 84-8427-301-6, pp. 349-387.

BAUER, C.M., NIEDERSTÄTTER, H., McGLYNN, G., STADLER, H., PARSON, W. 2013. Comparision of morphological and molecular genetic sex-typing on mediaeval human skeletal remains. Forensic Science International: Genetics 7. pp. 581-586.

BEHAR, D.M., VAN OVEN, M., ROSSET, S., METSPALU, M., LOOGVÄLI, E-L., SILVA, N.M., KIVISILD, T., TORRONI, A. AND VILLEMS R. 2012. A "Coopernican" Reassessment of the Human MItochondrial DNA tree from its Root. The American Journal of Human Genetics 90, pp. 675-684.

BEHAR, D.M., VILLEM, R., SOODYALL, H., BLUE-SMITH, J., PERIERA, L., METSPALU,E., SCOZZARI, R., MAKKAN, H., TZUR, S, COMAS, D., BERTRANPETIT, J., WUINTANA-MURCI-L, TYLER-SMITH, C., WELLS, R.S., ROSSET, S., AND THE GENOGRAPHIC CONSORTIUM. 2008. The dawn of human matrilineal diversity. Am. J. Hum. Genet. 82(5). pp. 1130-40. doi: 10.1016/j.ajhg.

BENDALL, K.E., MACAULAY, V.A., BAKER, J.R., SYKES, B.C. 1996. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. Am. J. Hum. Genet. 59: pp. 1276-1287.

BENSASSON, D., FELDMAN, M.W., PETROV, D.A. 2003. Rates of DNA duplication and mitochondrial DNA insertion in the human genome. J. Mol. Evol. 57: pp. 343-354.

BENZÉCRI, J.P. 1973. L´Analyse des Données. Volume II. L´analyse des Correspondances. Paris, France. Dunod.

BERNABEU AUBÁN, J. 1996. Indigenismo y Migracionismo. Aspectos de la neolitización en la fachada oriental de la península Ibérica.

Trabajos de Prehistoria 53(2): 37 -54.

BETTENCOURT, A.M. 2010. La Edad el Bronce en el Noroeste dela Península Ibérica: un análisis a partir de las prácticas funerarias. Trabajos de prehistoria 67, nº1. Enero-Junio 2010. pp. 139-173.

BLANCHARD, J.L. AND SCHMIDT, G.W. 1996. Mitochondrial DNA migration events in Yeast and Humans: Integration by a common end-joining mechanism and aleternative perspectives on nucleotide substitution patterns. Mol. Biol. Evol. 13(3): pp. 537 - 548.

BLANCO-GONZÁLEZ, A. 2011. Práctica social, memoria y ritual en Cogotas I: esbozo teórico para un enfoque renovado. Trabajos de prehistoria 68. nº1, enero-junio 2011. pp. 123-146. ISSN: 0082-5638.

BLASCO-BOSQUED, M. C. 2004a. "Hacia una definición del Horizonte Cogotas I: algo más que un estilo cerámico". En HERNÁNDEZ, L. y HERNÁNDEZ, M. S. (eds.): La Edad del Bronce en tierras valencianas y zonas limítrofes. Alicante-Villena: Instº Juan Gil-Albert - Ayuntamiento de Villena, pp. 564-584.

BLASCO-BOSQUED, M.C. 2012. Cogotas I en la Meseta Española. En Rodríguez Marcos, J.A. y Fernández Manzano, J. (eds.): Cogotas I: una cultura de la Edad del Bronce en la Península Ibérica. Valladolid: Universidad de Valladolid. pp. 187-218.

BLASCO-BOSQUED, M.C. 1997. La Edad del Bronce en el interior Peninsular. Una aproximación al II Milenio A.C. en las cuencas de los ríos Duero y Tajo. CuPAUAM 24, pp. 59-100

BLASCO-BOSQUED, M.C. 1997. Manifestaciones funerarias de la Edad del Bronce en la Meseta. SAGVNTM (PLAV), 30: pp. 173-190

BLASCO-BOSQUED, M.C., BAENA PREYSLER, J. 1996. El yacimiento de Las Carolinas y la cerámica simbólica cmapaniforme. Algunos datos para su interpretación. En: "El hombre fosil" 80 años después: volumen conmemorativo del 50 aniversario de la muerte de Hugo Obermaier / coord. por José Alfonso Moure Romanillo, 1996, ISBN 84-8102-139-3. pp. 417-446.

BLASCO-BOSQUED, M.C.; RECUERO-VELAYOS, V. y BAENA-PREYSLER.1996; Estudio espacial del bronce final-hierro I en el bajo Manzanares apoyado en los SIG. Arqueología Espacial 15, pp. 51-66.

BOSCH GIMPERA, P., 1932. Etnología de la Península Ibérica. Barcelona: Editorial Alpha.

BRANDT, G., HAAK, W., ADLER, C., ROTH, C., SZÉCSÉNYI-NAGY, KARIMNIA, S., BÖLLER-RIEKER, S., MELLER, H., GANSLMEIER, R., FRIDERICH, S., DRESELY, V., NICKLISCH, N., PICKRELL, J.K., SIROKO, F., REICH, D., COOPER, AL, ALT, K.W. AND THE GENOGRAPHIC CONSORTIUM. 2013. Ancient DNA reveals key stages in the formation of Central European mitochondrial genetic diversity. Science. 2013 Otober, 11;342 (6155). pp. 257-261. doi: 10.1126/sicience. 12411844.

BROTHERTON, P., ENDICOTT, P., SANCHEZ, J.J., BEAUMONT, M., BARNETT, R., AUSTIN, J., AND COOPER, A. 2007. Novel high-resolution characterization of ancient DNA reveals C>U-type base modification events as the sole cause of post mortem miscoding lesions. Nucleic Acids REasearch, vol. 35. No. 17. 5717-5728. doi: 10.1093/nar/gkm588.

BROTHWELL, D.R. 1987. Digging up bones. The excavation, treatment and study of human skeletal remains. 3rd ed. Cornell University Press. Ithaca, New York.

BUBNER, T. 1976. Acerca de la población campaniforme de la Península Ibérica. Quaderns de Prehistòria I Arqueologia de Castelló. 3, pp. 51-79.

BUENO RAMÍREZ, P., BARROSO BERMEJO, R. Y DE BALBÍN BEHRMANN, R. 2005. Ritual campaniforme, Ritual colectivo: La necrópolis de cuevas artificiales del Valle de las Higueras, Huecas, Toledo. Trabajos de Prehistoria 62, nº2, 2005. pp.67-90.

BUIKSTRA, J.E., UBELAKER, D.H. 1994. Standards for Data Collection From Human Skeletal Remains. Fayetteville, Arkansas: Arkansas Archaeological Survey Report Number 44.

BURGER, J., HUMMEL, S., HERMANN, B., Y GENKE, W. 1999. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. Electrophoresis 20. pp. 1722-1728

BURGER, J., KIRCHNER, M., BRAMANTI, B., HAAK, W., Y THOMAS, M.G. 2007. Absence of the lactase persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. Proceedings of the National Academy of Sciences 104. pp. 3736-3741.

BUS,M.M. AND ALLEN, M. 2014. Collecting and preserving biological samples from challenging environments for DNA analysis. Biopreserv. Biobank. 12(1): 17-22. doi. 10.1089/bio.2013.0060.

BUTLER, J.M. 2005. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. Academic Press. ISBN 0-12-147952-8

CALLOWAY, C.D., REYNOLDS, R.L., HERRIN, G.L., ANDERSON, W.W. 2000. The frequency of heteroplasmy in teh HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age. Am. J. Genet. 66: 1384-1397.

CARAMELLI, D. AND LAGO, G. 2006. Advances in ancient DNA studies. Journal of Anthropological Sciences. Vol. 84. pp. 65-83.

CASTRO-MARTÍNEZ, P.V., MCO-PÉREZ, R., SANAHUJA YLL, M.E. 1995. Genealogía y Cronología de la Cultura Cogotas I (El estilo cerámico y el grupo de Cogotas I en su contexto arqueológico).

COBLE, M.D., LOREILLE, O.M., WADHAMS,M.J., EDSON, S.M., MAYNARD, K., MEYER, C.E., NIEDERSTÄTTER, H., BERGER, C., BERGER, B., FASETTI, A.B., ET AL. 2009. Mystery Solved: The Identification of the Twoo Missing Romanov Children Using DNA Analysis. PLoS ONE 4: e4838

COOPER, A. AND POINA.R, H.N. 2000. Ancient DNA: Do in Right or Not at all. Science 289:1139

COOPER, A., LALUEZA-FOX, C., ANDERSON, S., RAMBAUT, A., AUSTIN, J., AND WARD, R. 2001. Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. Nature 409, 704-707 (8 February 2001). doi: 10.1038/35055536.

COX, M., AND MAYS, S. 2000. Human osteology: In archaeology and forensic science. Cambridge University Press. ISBN-13 978-0-521-69146-8.

CURREY, J.D. 2002. Bones: Structure and Mechanics. Princeton University Press. ISBN 0-691-09096-3.

DE TORRES, T., ORTIZ, J.E., LLAMAS, F.J., CANOIRA, L., JULIA, R., Y GARCÍ-MARTÍNEZ, M.J. 2002. Bear dentine aspartic acid racemization analysis: aproxy for the dating of Pleistocene cave infills. Archaeometry 44. pp. 417-426.

DEBRUYNE, R; BARRIEL, V; TASSY, P. 2003. Mitochondrial cytochrome b of the Lyakhov mammoth (Pro- boscidea, Mammalia): new data and phylogenetic analyses of Elephantidae. Mol Phylogenet Evol., núm. 26 (3), pp. 421-434.

DELIBES DE CASTRO, G. y HERRÁN MARTÍNEZ, J. I. 2007. La Prehistoria. Valladolid: Diputación de Valladolid

DELIBES DE CASTRO, G. 1977. El vaso campaniforme en la meseta norte española. Valladolid: Universidad de Valladolid.

DELIBES DE CASTRO, G. 1987. Sobre los enterramientos del grupo campaniforme de Ciempozuelos: diversidad y tradición. En: M. Fernández-Miranda (ed.) El Origen de la Metalurgia en la Península Ibérica. II.Seminario de la Fundación Ortega y Gasset, Oviedo. pp. 37-51.

DELIBES DE CASTRO, G. 1978. Una inhumación triple de facies Cogotas I en San Román de Hornija (Valladolid). Trabajos de Prehistoria 35, pp. 225-250.

DELIBES DE CASTRO, G. Y DEL VAL RECIO, J.M. 2008. La explotación de la sal al término de la Edad del Cobre en la Meseta Central Española ¿Fuente de riqueza e instrumento de poder de los jefes Ciempozuelos?. Veleia, 24-25 791-811. 2007-2008. ISSN 0213-2095.

DELIBES DE CASTRO, G. Y ESPARZA ARROYO, A.L., ARATIKOS ARUQEÓLOGOS, S.L. 2007. Informe técnico: Excavación arqueológica en Los Areneros de las Zumaqueras. La Lastrilla (Segovia). Junta de Castilla y León, consejería de Cultura y Turismo. Dirección general de patrimonio y bienes culturales.

DELIBES DE CASTRO, G. y FERNÁNDEZ-MANZANO,J. 2000. La trayectoria cultural de la Prehistoria reciente (6400-2500 BP) en la Submeseta Norte principales hitos de un proceso. En Jorge V.O. (coord): Pré-história recente da Península Ibérica (3º Congresso de Arqueología Peninsular, vol. 4). Porto: ADECAP, pp. 95-122

DELIBES DE CASTRO, G. Y ROMERO CARNICERO, F. 1977. El último milenio a.C. en la Cuenca del Duero. Reflexiones sobre la secuencia cultural. pp. 233-256

DELIBES DE CASTRO, G., HERRÁN-MARTÍNEZ, J.I., SANTIAGO-PARDO, J. Y VALRECIO, J. 1995. Evidence of Social complexity in the Copper Age of the Northern Meseta. 1995. pp. 44-63 en: Lillios, K.T., (Ed.): Ther origins of complex societies in Late Prehistoric Iberia, Ann Arbor: International Monographs in Prehistory

DELIBES DE CASTRO, G., Y FERNÁNDEZ MIRANDA, M. 1999. Los orígenes de la civilización: el calcolítico ene l Viejo Mundo. Síntesis.

DELIBES DE CASTRO, G., Y ROMERO CARNICERO, F. 2011. La plena colonización agraria dle Valle Medio del Duero. Complutum. vol 22, nº2 pp. 49-94. ISSN 1131-6993. ISSN-e 1988-2327.

DELIBES DE CASTRO, G.; ROMERO CARNICEROR, F.; SANZ MINGUEZ, C.; ESCUDERO NAVARRO, Z. y SAN MIGUEL MATÉ, L.C. 1995. Panorama arqueológico de la Edad del Hierro en el Duero medio. En Delibes de Castro, G., Romero Carnicero, F., Morales Muñiz, A. y Escudero Navarro, Z. (eds.). Arqueología y Medio Ambiente: El primer milenio a.C. en el Duero medio. Valladolid : Junta de Castilla y León, pp. 49-146.

DÍAZ DEL RÍO ESPAÑOL, P. 2001. La formación del paisaje agrario. Madrid en el III y II milenios BC. – Madrid: Comunidad de Madrid [Arqueología, Paleontología y Etnografía, 9].

EGELAND, T. MOSTARD, P.F., MEVÂG, B., Y STENERSEN, M. 2000. Beyond traditional paternity and identification cases. Selecting the most probable pedigree. Forensic Sci. Int 110. pp. 47-59

ESPARZA ARROYO, A. 2011. Los Castros del oeste de la Meseta. En Aldeas y ciudades en el primer milenio a.C. La Meseta Nort ey los orígenes del urbanismo. Complutum. Vol. 22(2) 2011. ISSN: 1131-6993. pp. 9-10.

ESPARZA ARROYO, A., DELIBES DE CASTRO, G., RAMOS FRAILE, SALVADOR VELASCO, M., VELASCO VÁZQUEZ, J. 2008. Una nueva sepultura del grupo Cogotas I en “El Juncal” (Villaralbo, Zamora). Zephyrus, LXI, enero-junio 2008, pp. 155-175. ISSN: 0514-7336.

ESPARZA ARROYO, A., VELÁSCO VÁZQUEZ, F. Y DELIBES DE CASTRO, G. 2012a. HUM 2005-00139: Planteamiento y primeros resultados de un proyecto de investigación sobre la muerte en Cogotas I. En FERNANDEZ MANZANO, J. y RODRIGUEZ MARCOS, J.A. (eds.), Una cultura de la Edad del Bronce en la Península Ibérica : Homenaje a Mª Dolores Fernández-Posse. Valladolid : Universidad de Valladolid. pp. 259-320.

ESPARZA ARROYO, A., VELASCO VÁZQUEZ J., Y DELIBES DE CASTRO, G. 2012b. Exposición de cadáveres en el yacimiento de Tordillos (Aldeaseca de la Frontera, Salamanca). Perspectiva bioarqueológica y posibles implicaciones para el estudio del ritual funerario de Cogotas I. BIBLID (0514-7336 (2012) LXIX, enero-junio pp. 95-128).

ESPARZA ARROYO. A.; VELÁSCO VÁZQUEZ, J. y DELIBES DE CASTRO, G. 2015. Nueva luz sobre un viejo hallazgo: el enterramiento de las terrazas del Manzanares (Rivas-Vaciamadrid, Madrid) y su supuesta vinculación al grupo Cogotas I. CUPAUAM (en prensa)

ESTEBARANZ, F., FERNÁNDEZ, E., MARTÍNEZ, L., GAMBA, C., ALROUSAN, M., TURBÓN, D., ARROYO PARDO E., IGNASI OMS, J., PÉREZ PÉREZ, A., Y ANFRUNS, J. 2008. Análisi antropológica de les retes neolítiques dela caserna de Sant Pau (biometría, dneticó, ADNA i mmicroestriació dentária). Quarhis; Quaderns d´Arqueoogía i Historia de la Ciutat de Barcelona. pp. 76-82

ESTEVE CODINA, A., NIEDERSTÄTTER, H., PARSON, W. 2009. "GenderPlex" a PCR multiplex for reliable gender determination of degraded human DNA samples and complex gender constellations. Int J Legal Med 123. pp. 459 - 464.

ETXEBERRÍA GABILONDO, F. 2001. Informe sobre los restos humanos procedentes del enterramiento colectivo de "El Tomillar" (Bercial de Zapardiel, Ávila). En el libro: "El aspecto funerario durante el Calcolítico y los inicios de la Edad del Bronce en la Meseta Norte" de Fabián-García J.F. ISBN: 84-7481-800-1

EXCOFFIER, L., SMOUSE, PE., CUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular vriance infered from metric distances among DNa haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131. (2). pp. 479-91. ISSN 0016-6731. pmc 1205020. PMID 1644282.

EXCOFFIER, L., Y LISCHER, HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources 10. pp. 564-567.

FABIÁN GARCÍA, J.F. Y BLANCO GONZÁLEZ, A. 2012. Cuatro enterramientos calcolíticos en hoyo del Cerro de la Cabeza (Ávila). Complutum, Vol. 23 (1). pp. 99-120. ISSN: 1131-6993.

FABIÁN-GARCÍA, J.F. 1973. El enterramiento campaniforme del túmulo 1 de Aldeagordillo (Ávila)). BSAA 58. pp. 97-135.

FABIÁN-GARCÍA, J.F. 2001. "El aspecto funerario durante el Calcolítico y los inicios dede Fabián-García J.F. ISBN: 84-7481-800-1

FABIÁN-GARCÍA, J.F. 2006. El IV y III milenio AC en el Valle de Amblés (Ávila). VAlladolid: Junta de Castilla y León (Arqueología en Castilla y León. Monografías, 5). pp. 323.

FAZEKAS IG AND KOSÁ F. 1978. Forensic fetal osteology. Budapest: Akademiae Kiadó.

FERNÁNDEZ, E. 2005. Polimorfismos de ADN mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea.

FERNÁNDEZ, E., PÉREZ-PÉREZ,A., GAMBA, C., PRATS, E., CUESTA, P., ANFRUNS, J., MOLIST, M., ARROYO-PARDO, E., TURBÓN, D. 2014. Ancient DNa analysis of 8000 B.C. Near Eastern Farmers supports an early neolithic pioneer maritime colonization of mainland Europe through Cyprus and the Aegean Islands. PLoS Genet 10 (6): 21004401, doi: 10.1371 / journal. pgen. 1004401.

FERNÁNDEZ, E., THAW, S., BROWN, T.A., ARROYO-PARDO, E., BUXÓ, R., SERRET, M.D., ARAUS, J.L. 2013. DNA analysis in charred grains of naked wheat from several archaeological sites in SpainJournal of Archaeological Science. 40. pp. 659-670.

FERNÁNDEZ-POSSE, MªD. 1986. La Cultura Cogotas I. En Homenaje a Luis Siret (1934-1984),Sevilla: Junta de Andalucía, pp. 475-487.

FRÉGEAU, C.J., FOURNEY, R.M. 1993. DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. Biotechniques. 15 (1). pp. 100-19.

FULTON, T.L., 2012. Setting up an ancient DNA laboratory. Methods Mol Biol. 2012; 840: 1-11. doi: 10.1007/978-1-61779-516-9_1

GAIBAR PUERTAS, 1974. Descubrimiento de la terraza würmiense en la margen izqueirda dle río Manzanares. Aportaciones paleoclimáticas. Nuevos restos y restimonio del madrileño hombre prehistórico y protohistórico. En: Estudios Geológicos, ISSN 0367-0449, VOL. 30, Nº2-3, 1974. PAGS. 235-252.

GAMBA, C., FERNÁNDEZ, E., TIRADO, M., DEGUILLOUX, M.F., PEMONGE, M.H.,UTRILLA, P., EDO, M., MOLIST, M., RASTEIRO, R., CHIKHI, L, AND ARROYO-PARDO, E. 2012. Ancient DNA form an Early Neolithic Iberian population supports a pioneer colonization by firsts farmers. Molecular Ecololy. Vol. 21. pp. 45-56.

GAMBA, C., FERNÁNDEZ, E., TIRADO, M., PALOMO-DÍEZ, S., DEGUILLOUX, M.F., PEMONGE, M.H. Y ARROYO-PARDO, E. 2011. ADN ancien d´echantillons néolithiques de la péninsule Ibérique. En: Bulletins de la Société Préhistorique Française. Actes du XXVIIe Congrés Prehistorique de France Trnasitions, Ruptures en Continuité durant la Préhisotire Transitions, Ruptures, and Continuity in Prehistory. Bordeaux-Les Eyzies

GAMBA, C., FERNÁNDEZ, E., TIRADO, M., PASTOR, J., ARROYO-PARDO, E. 2010. Ancient nuclear DNA and kinship analysis: The case of a medieval burial in San Esteban church in Cuellar (Segovia). American Journal of Physical Anthropology. 2010 - 00250.

GARCÍA ATIÉNZAR, G. 2010. Las comarcas centromeridionales valencianas en el contexto de la Neolitización de la fachada noroccidental del Mediterráneo. Trabajos de Prehistoria 67(1): 37-58

GARCÍA BARRIOS, A.S. 2007. Un enfoque de género en la Arqueología de la Prehistoria Reciente del VAlle Medio del Duero: Los cráneos femeninos calcolíticos de Los Cercados (Mucientes, Valladolid), en C. de la Rosa Cubo et al. (coords.): Nuevos enfoques para la enseñanza de la Historia: Mujer y Género ante el Espacio Europeo de Educación superior. Madrid: Asociación Cultural Almudayna, pp. 41-56.

GARCÍA SÍVOLI, C., MONTIEL, R., MALGOSA MORERA, A. 2005. Análisis de haplogurpos de ADN mitocondrial en restos dentales del Neolítico y Bronce catalán. Rev. Esp. Antrop. Fís (2003/4) 24: 109 - 122.

GARCÍA-BOUR, J., PÉREZ-PÉREZ, A., ALVAREZ, S., FERNÁNDEZ, E., LÓPEZ-PARRA, A.M., ARROYO-PARDO, E., Y TURBÓN, D. 2004. Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia: ancient ntDNA sequences and Y-chromosome STR characterization. Am. J. Phys. Anthropol 123: 361-370.

GARCÍA-MARTÍNEZ DE LAGRÁN, I.; GARRIDO PENA, R., Y ROJO GUERRA, M.A.. El Campaniforme en la Meseta Central de la Península Ibérica. 2005. pags. 411-436 en García-Martínez de Lagrán, I.; Garrido Pena, R. y Rojo Guerra, M.A. (coords.): El campaniforme enla Península Ibérica y su contexto europeo. Valladolid: Universidad de Valladolid / Junta de Castilla y León

GARCÍA, O., FREGEL, R., LARUGA, J.M., ÁLVAREZ, V., YURREBASO, I., CABRERA, V.M. Y GONZÁLEZ, A.M. 2011. Using mitochondrial DNA to test the hypothesis of a European post-glacial human recolonization from te Franco-Cantabrian refuge. Heredity 16: 37-45.

GARRIDO-PENA, R. 1999. El Campaniforme en la meseta: Análisis de su contexto social, económico y ritual. Tesis Doctoral 1999. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Prehistoria. Facultad de Geografía e Historia.

GARRIDO-PENA, R. 2005. El fenómeno campaniforme: un siglo de debates sobre un enigma sin resolver.

GARRIDO-PENA, R., MUÑOZ LÓPEZ-ASTILLEROS, K. 2000. Visiones sagradas para los líderes. Cerámicas campaniformes con decoración simbólica en la Península Ibérica. Complutum, 11, 285-300.

GASBARRINI, G., RICKARDS, O., MARTÍNEZ-LABARGA, C., PACCIANI, E., CHILLERI, F., LATERZA, L., MARANGI, G., SCALDAFERRI, F., GASBARRINI, A. 2012. Origin of celiac disease: How old are predisposing haplotypes?. World J. Gastroenterol. October 7; 18(37); 5300-5304.

GILBERT, M.T.P., BINLADEN, J., MILLER, WEBB, WIUF, C., WILLERSLEV, E., POINAR, H., CARLSON, J.E., LEEBENS-MACK, J.H. AND SCHUSTER, S.C. 2007. Recharacterization of ancient DNA miscoding lesions: insights in the era of sequencig by synthesis. Nucleic Acids Research, 2007. Bol. 35, no. 1 pp. 1.10. doi: 10.1093/narlgkl483.

GILBERT, M.T.P., SHAPIRO, B., DRUMMOND, A., Y COOPER A., 2005. Post-mortem DNA damage hotspots in Bison (Bison bison) provide evidnece for both damage an mutational hotspots in human mitochondrial DNA. Journal of Archaeological Science. 32:1053-1060

GILBERT, M.T.P., WILLERSLEV, E., J.HANSEN, A., BARNES, I., RUDBECK, L., LYNNERUP, N., AND COOPER, A. 2003. Distibution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. Am. J. Hum. Genet. 72:32-47.

GILBERT,M.T.P., HANSEN, A.J., WILLERSLEV, E., RUBDECH, L, BARNES, I., LYNNERUP, N., Y COOPER, A., 2003a. Characterization of Genetic Miscoding Lesions Caused by Postmortem Damage. Am J Hum Genet 72:48-61

GILL, P., GUSMAO, L, HANED, H., MAYR, W.R., MORLING, N., PARSON, W., PRIETO, L., PRINZ, M., SCHNEIDER, H., SCHNEIDER, P.M., WEIR, B.S. 2012. DNA commission of hte international society of Forensic Genetics: Recommendatios on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. Forensic Science International: Genetics. N. 6. 679-688.

GILL, P., IVANOV, P.L., KIMPTON, C., PIERCY, R., BENSON, N., TULLY, G., EVETT, I., HAGELBERG, E., Y SULLIVAN, K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. Nat Genet 6: 130-135

GITTELSON, S., BIEDERMANN, A., BOZZA, S., TARONI, F. 2014. Decision analysis for the genotype designation in low-template-DNA profiles. Forensic Science International: Genetics. N.9. 118-133.

GOMES, C., MAGALHÄES, M., ALVEZ, C., AMORIM, A., PINTO, N., GUSMÄO, L. 2012. Comparative evaluation of alternative batteries of genetic markers to complement autosomal STRs in kinship investigations: autosomal indels vs. X-Chromosome STRs. Int J Legal Med. DOI 10-1007 / s00414-012-0768-5.

GOMES, C., MAGALHAES, M., AMORIM, A., ALVES, C., PINTO, N., GUSMAO, L. 2011. How useful is your X in discerning pedigrees? Forensic Science International: GEnetics Supplement Seris 3 (2011) e161-e162.

GÓMEZ-SÁNCHEZ, D., OLALDE, I., PIERINI, F., MATAS-LALUEZA, L., GIGLI, E., LARI, M., CIVIT, S., LOZANO, M., VERGÉS, J.M. CARAMELLI, D., RAMÍREZ, O., LALUEZA-FOX, C. 2014. Mitochondrial Dna from El Mirador Cave (Atapuerca, Spain) rEveals the Heterogeneity of Chalcolithic Populations. PLos ONE 9(8): e105105. doi: 10.1371/journal.pone. 0105105.

GONZÁLEZ A. 2008. Mitos y realidades en torno a la excavación, el tratamiento y el estudio de los restos arqueológicos no-adultos. En: Gusi Jener F, Ortiz S, Olária C (coord.) Nasciturus: Infans, Puerulus. Vobis Mater Terra. La muerte en la infancia. Castellón: Servei d´Investigaciones Arqueològiques i Prehistòriques. pp. 57-76.

GOODWIN, W., LINACRE, A., HADI, S. 2011. An introduction to forensic genetics. Willey-Blackwell. ISBN: 978-0-470-71019-7.

GREENACRE, M. 1983. Theory and Applications of Correspondence Analysis. London: Academic Press. ISBN 0-12-299050-1

GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C., GELBART, W.M. 2002. Genética. McGraw-Hill- Interamericana de España, S.A.U.. ISBN: 84-486-0368-0.

GRISEDALE, K.S. AND VAN DAAL, A. 2012. Comment on Kokshoorn, B, and Blankers, bj, response to Grisedale, KS, and Van Daal, A: Comparision of STR profiling from low template DNA extracts with and without the consensus profiling method. Investigative Genetics, 3:14.

GRISEDALE, K.S. AND VAN DAAL, A. 2012. Comparision of STR profiling from low template DNA extracts with and without the consensus profiling method. Investigative Genetics, 3:14.

GUSMAO, L., ALVES, C., SÁNCHEZ-DIZ, P., ZARRABEITIA, M.T., ABOVICH, M.A., ARAGÓN, I, ARCE, B., ARRIETA, G., ARROYO, E., ATMETLLA, I, AMORIM, A., et al.2008. Results of the GEP-ISFG collaborative study on an X-STR Decaplex. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 1. 677-679.

GUSMAO, L., SÁNCHEZ-DIZ, P., ALVEX, C., GOMES, I., ZARRABEITIA, M.T., BRAVO, L., BUILES, J., CAINÉ, L., CALVO, R., AMORIM, A., et al. 2009. A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. Int J Legal Med 123:227 - 234. doi 10.1007 /s00414-008-0309-4.

HAAK, W., BRANDT, G., DE JONG, H.N., MEYER, C., GANSLMEIER, R., HEYD, V., HAWKESWORTH, C., PIKE, A.W.G., MELLER, H., ALT, K.W. 2008. Ancient DNa, Strontium isotopes and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. PNAS 18226-18231. vol. 105 no. 47.

HAGELBERG, E., SYKES, B.,Y HEDGES, R., 1989. Ancient bone DNA amplified. Nature 342:485.

HANDT, O., HÖSS, M., KRINGS, M., Y PÄÄBO, S. 1994. Ancient DNA: Methodological challeges. Experientia 50: 524-529.

HARDING, A AND FOKKENS, H. 2013. The Oxford Handbook of the European Bronze Age. Oxford: Oxford chiveraty press. p. 179.

HERVELLA, M., IZAGIRRE, N., ALONSO, S., FREGEL, R., ALONSO, A., CABRERA, M.V., DE LA RÚA, C. 2012. Ancient DNa from hunter-gatherer and farmer groups from northern Spain supports a random dispersion model for the Neolithic expansion into Europe. PloS One. 7(4): e34417. doi: 101371 / journal.pone. 0034417.

HIGUCHI, R., BOWMAN, B., FREIBERGE, M., RYDER, O.A., Y WILSON, A.C. 1984. DNA sequences from the quagga, an extict member of the horse family. Nature 312:282-284.

HOFREITER, M., SERRE, D., POINAR, H.N., KUCH, M., Y PÄÄBO, S., 2001b. Ancient DNA. Nat Rev Genet 2: 353-359.

HOFREITER,M. Nondestructive DNA extraction from museum specimens. Methods Mol Biol. 2012;840:93-100.

HUMMEL, S., 2003. Ancient DNA typing: methods, strategies, and applications. Springer.

IZAGUIRRE, N. Y DE LA RÚA, C. 2000. Aportación de la biología molecular al estudio antropológico de las poblaciones humanas del pasado: análisis del ADN mitocondrial. Rev. Esp. Antrop. Biol. 21: 1-10.

JEFFREYS, A. J.; ALLEN, M. J.; HAGELBERG, E.; SONNBERG, A. 1992. «Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis». Forensic Sci Int., núm. 56 (1), p. 65-76.

JIMENO MARTÍNEZ, A., 1984. Los Tolmos de Caracena (Soria). Campañas de 1977. 1978 y 1979. Nuevas bases para el estudio de la Edad del Bronce en la zona del Alto Duero). Madrid: Ministerio de Cultura [Excavaciones Arqueológicas en España, 134].

JIMENO MARTÍNEZ, A. 1988. La Investigación del Bronce Antiguo en la Meseta Superior. Trabajos de Prehistoria, 45: 103-121.

JIMENO MARTÍNEZ, A. y FERNÁNDEZ MORENO, J.J.. 1991. Los Tolmos de Caracena (Soria). Madrid: Ministerio de Cultura [Excavaciones Arqueológicas en España, 161].

JIMENO, A. 2001. El modelo de trashumancia aplicado a la cultura de Cogotas I. En: La Edad del Bronce ¿Primera edad de oro en España?: sociedad, economía e ideología / coord. por Marisa Ruiz-Gálvez Priego, 2001, ISBN 84-8432-299-8, PAGS. 139-180.

JOBLING, M.A. AND TYLER SMITH, C., 2003. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. Nat Rev Genet 4:598-612.

JOBLING, M.A., HURLES, M., Y TYLER-SMITH, C. 2003. Human Evolutionary Genetics: Origins, Pepoles and Diseas. 10 ed. Garland Science.

KAESTLE, F., AND HORSBURGH, K.A. 2002. Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications an Ethics. Yearbook of physical anthropology 45:92-130.

KIMPTON, C., FISHER, D., WATSON, S., ADAMS, M., URQUHART, A., LYGO, J., GILL, P. 1994. Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. Int J Leg Med. 106: 302-311.

KLING, D., TILLMAR, A.O., EGELAND, T. 2014. Familias 3 - Extensions and new functionality. Forensic Science International: Genetics. Vol. 13, Novembre 2014, Pages 121 -127.

KLOSS-GRANDESTÄTTER, A., PACHER, D., SCHÖNHERR, S., WEISSENSTEINER, H., BINNA, R., SPECHT, G., AND KRONENBERG, F. 2010. Haplogrep: A fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. Human mutation. 32:25-32.

KOKSHOORN, B., AND BLANKERS, B.J. 2012. Response to Grisedale and Van Daal: comparison of STR profiling from low template DNA extracts with and without the consensus profiling method. Investigative Genetics, 4:1.

KOLMAN, C., CENTURION-LARA, A., LUKEHART, S., OWSLEY, D., TUROSS, N., 1999, Identification of Treponema pallidum subspecies pallidum in a 200-year-old skeletal specimen, Journal of Infectious Diseases180(6):2060-3

KOLMAN, C.J., Y TUROSS, N. 2000. Ancient DNA analysis of human populations. Am. J. Phys. Anthropol 111: 5-23.

KRÜTTLI, A., BOUWMAN, A., AKGÜL, G., DELLA CASA, P., RÜHLI, F., WARINNER, C. 2014. Ancient DNA analysis reveals high frequency of European lactase persistence allele (T-13910) in Medieval Central Europe. PLoS ONE 9(1): E86251. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0086251.

KUROSAKI, K., MATSUSHITA, T., Y UEDA, S. 1993. Individual DNA identification from ancient human remains. Am. J. Hum. Genet. 53: 638-643.

LARRÉN IZQUIERDO, H. Y VAL RECIO, J. del, 1993: "Arqueología preventiva y de gestión (1984-1988). Zamora.", Numantia. Arqueología en Castilla y León 3, pp. 335-346.

LIESAU VON LETTOW-VORBECK, C., ESPARZA-ARROYO, A, SÁNCHEZ-POLO, A. 2014. ¿Huesos en la basura o depósito ritualizado? Los perros descuartizados de La Huelga (Dueñas, Palencia). BIBLID (0514-7336 (2014) lxxiv, JULIO-DICIEMBRE; 89-115. issn: 0514-7336.

LINDAHL, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362: 709-715.

LÓPEZ AMBITE, F. 2003. El poblamiento de Cogotas I en el valle de los ríos Aguisejo y Riaza (Segovia). Complutum. ISSN 1131-6993. Nº 14. pags. 125-168.

LÓPEZ JIMÉNEZ, O., Y BENET, N. 2004. Nuevos resultados en la investigación de "La plaza de Toros" del Cerro de San Pelayo (Martinamor, Salamanca): Un enterramiento tumular con inhumación en los inicios del primer milenio en el área occidental de la Meseta norte. Trabajos de prehistoria 61, nº1. pp. 157 - 173.

LÓPEZ-PARRA, A.M., MESA, M.S., GUSMALO, L., AMORIM, A. Y ARROYO-PARDO, E. 2005. Isonimia y Genética: Variabilidad geográfica de los individuos apellidados Castilla. Revista Española de Antropología Física. Vol. 25 pp.:87.

LORENZ, M.G. AND WACKERNAGEL, W. 1987. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. Appl Environ Microbiol 53: 2948 - 2952.

LOVEJOY, C.O., MEINDL, R.S., PRYBECK, T.R. AND MENSFORTH, R.P. 2005. Chronological metamorphosos of the auricular surface of the ilium: A new method for the determination of adult skeletal age at death. American Journal of Physical Anthropology. Doi: 10.1002 /ajpa. 13330680103.

MAGALHAES, M., PINTO, N, GOMES, C., PEREIRA, R., AMORIM, A., ALVES, C., GUSMAO, L. 2011. When the alleged father is a close relative of the real father: the utility of insertion/deletion polymorphisms. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 3 (2011) e9-e10.

MARTÍN CARBAJO, M.A., MARCOS CONTRERAS, G.J., MISIEGO TEJADA, J.C., SANZ GARCÍA F.J. Y REONDO MARTÍNEZ, R. 2012. Un poblado de Cogotas I en la Tierra de Campos leonesa: Canto Blanco (Sahagún y Calzada del Coto, León). En: Rodríguez Marcos, J.A., y Fernández Manzano, J. (eds.): Cogotas I- Una Cultura de la Edad del Bronce en la Península Ibérica. Homenaje a Mª Dolores Fernández-Posse. Valladolid: Universidad de Valladolid, 523-540. ISBN 978-84-8448-672-5.

MARTÍN CARBAJO, M.A.; MISIEGO TEJADA, J.C; PÉREZ RODRÍGUEZ, F.J.FERNÁNDEZ JIMÉNEZ, J.M. y SANZ GARCÍA, F. J. 1993. Documento funerario del Bronce Medio en la Submeseta Norte: «Carrelasvegas» (Santillana de Campos, Palencia). Boletín del Seminario de Estudios de Arte y Arqueología 59, pp. 69-88.

MARTÍNEZ-LABARGA, C., RICKARDS, O. 1999. La utilización del DNA antiguo en la investigación de la historia evolutiva humana. Revista Española de Antropología Biológica, vol. 20: 195-213. (Sociedad Española de Antropología Biológica, Universidad de León, España).

MAYS, S., ELDERS, J., HUMPHREY, L., WHITE, W., AND MARSHALL, P. 2013. Science and the Death. A guideline for the destructive smapling of archaeological human remains for scientific analysis. Advisory Panel on the Archaelogy of Burials in England. Producto code 51801. English Heritage.

MEYER, M., FU, Q., AXIM-PETRI, A., GLOCKE, I., NICKEL, B., ARSUAGA J.L., MARTÍNEZ, I., BERMÚDEZ DE CASTRO, J.M., CARBONELL, E., PÄÄBO, S. 2014. A mitochondrial genome sequence of a hominin from Sima de los Huesos. Nature 12788. doi: 10.1038.

MISIEGO TEJADA, J.C., PÉREZ RODRÍGUEZ, F.J., SANZ GARCÍA, F.J., MARCOS CONTRERAS, G.J., Y MARTÍN CARBAJO, M.A. La Huelga, Bronce medio en la Meseta Norte. Revista de Arqueología, 136, pp. 18-25.

MOLHANDESAN, E., PROST, S., HOFREITER, M. 2012. Case estudy: Using a nondestructive DNA extraction method to generate mtDNA sequences from historical chimpanzee specimens. Methods Mol Biol. 2012; 840: 101-10. doi: 10.1007/978-1-61779-516-9_14

MONROE, C., GRIER, C., KEMP, B.M. 2013. Evaluating the efficacy of various thermo-stable polymerases against co-extracted PCR inhibitors in ancient DNA samples. Forensic Science International. Vol. 228, issues 1-3, pp. 142-153.

MONTERO-GUTIÉRREZ, J. 2011. Manifestaciones rituales e ideología durante la Edad del Bronce en el interior Peninsular. La dimensión social de las prácticas funerarias de Cogotas. 2011. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos. Departamento de Ciencias HIstóricas y Geografía, área de Arqueología.

MONTERO-RUÍZ, I. Y RUÍZ-TABOADA, A. Enterramiento colectivo y metalurgia en el yacimiento neolítico de Cerro Virtud (Cuevas de Almanzora, Almería). Trabajos de Prehistoria. 53, nº2, 1996, pp.55-75.

MONTIEL R., GARCÍA, C., CAÑADAS, M.P., ISIDRO, A., GUIJO, J.M., MALGOSA, A. 2003. DNA sequences of Mycobacterium leprae recovered from ancient bones. FEMS Microbiol Left. sep 26; 226 (2):413-4.

MORRIS, A.G., HEINZE, A., CHAN, E.K.F., SMITH, A.B and HAYES v.m. 2014. First ancient Mitochondrial Human genome from Prepastoralist sothern African. Genome Biol Evol. doi. 10.1093/qbe(evu202.

MULERO, J.J., CHANG, C.W., LAGACÉ, R.E., WANG, D.Y., BAS, J.L., MCMAHON, T.P. AND HENNESSY, L.K. 2008. Development and validation of the ampSTR (r) MiniFilerTM PCR Amplification kit: A MiniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNa. Journal of Forensic Sciences 53: 838-852.

MULLER, J., Y VAN WILIGEN, S. 2001. New radiocarbon evidnece for European Bell Beakers and the consequences for the diffusion of the Bell Beaker Phenomenon. en: Bell beakers today: pottery, people, culture, symbols in prehistoric Eurpe. Franco Nicolis. p 59-75.

MULLIS, K-B. Y FALOONA, F.A. 1987. Specific Syinthesis of DNa in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol 155: 335-350

NÁJERA COLINO, T., MOLINA GONZÁLEZ, F., SÁNCHEZ ROMERO, M., ARANDA JIMÉNEZ, G. 2006. Un enterramiento infantil singular en el yacimiento de la Edad del Bronce de la Motilla del Azuer (Daimiel, Ciudad Real). Trabajos de prehistoria 63, nº1, Enero-Junio 2006. pp. 149-156.

NAKAHORI, Y., TAKENAKA, O., NAKAGOME, Y. 1991. A human X-Y homologous region encodes “amelogenin”. Genomics. Vol. 9, issue 2, Frebruary 1991, pp. 264-269.

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292. doi: 10.1086/282771.

NEI, M. 1987. Genetic distance and molecular phylogeny. In: Population Genetics and Fishery Management (N.Ryman and F. Utter, eds.), University of Washington Press, Seattle, WA, pp. 193-223.

NEI, M. 1987. Molecular Evolutionay Genetics (Chapter 9). New York: Columbia University Press.

NIELSEN-MARSH, C.M., Y HEDGES R.E.M. 2000. Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of site environments. Journal o Archaeological Sciences 27: 1139-1150

OLALDE, I., SÁNCHEZ-QUINTO, F., DTTA, D., MARIGORTA, U.M., CHIANG, C.W.K., RODRÍGUEZ, J.A., FERNÁNDEZ-CALLEJO, M., GONZÁLEZ, I., MONTFORT, M., MATAS-LALUEZA, L., CIVIT, S., LUISELLI, D., CHARLIER, P., PETTENER, D., RAMÍREZ, O., NAVARRO, O., NAVARRO, A., HIMMELBAUER, H., MARQUÉS-BONET, T., AND LALUEZA-FOX, C. 2013. Genomic analysis of the blood atributed to Louis XVI (1754-1793), King of France. Scientific Reports. 4:4666. doi: 10.1038 / srep04666.

OOTA, AH., SAITOU, N., MATSUSHITA, T., Y UEDA, S. 1995. A genetic study of 2000 year old human remains from Japan using mitochondrial DNa sequences. Am. J. Phys. Anthropol. 98: 133-145.

ORLANDO, L. 2014. A 400000 year-old mitochondrial genome questions phylogenetic relationships among archaic hominins; using the latest advances in ancient genomics, the mitochondrial genome sequence of a 400,000 year-old hominin has been deciphered. Bioessays, 36(6): 598-605. Doi: 10.1002/bies. 201400018.

PÄÄBO, S., 1985. Preservation of DNa in ancient Egyptian mummies. Journal of Archaeological Science 12: 411-417

PÄÄBO, S., 1989. Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Vol. 86, pp.1939-1943, March 1989. Genetics.

PÄÄBO, S., 1990. Amplifying ancient DNA. En: PCR Protocols: A Guide to Methods an Applicatiosn. London and San Diego: Academic Press. p. 159-166.

PÄÄBO, S., POINAR, H., SERRE, D., JAENICKE-DESPRES, V., HEBLER, J., ROHLAND, N., KUCH, M., DRAUSE, J., VIGILANT, L, Y HOFREITER, M., 2004. Genetic analyses from ancient DNA. Annu. Rev. Genet. 38:645-679

PÄÄBO, S., Y WILSON , A.C., 1991. Miocene DNA sequences - a dream come true? Curr. Biol 1: 45-46.

PÄÄBO, S., Y WILSON, A.C., 1988. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. Nature 334: 387-388

PAKENDORF, B., AND STONEKING, M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 6:165-83.

PALOMINO LÁZARO, A.L., NEGREDO GARCÍA, M.J., ARATIKOS. ABARQUERO MORAS, F.J. 1999. Cabañas, silos y tumbas en el yacimiento de El Cerro, La Horra (Burgos): A vueltas sobre el significado de un cmapo de hoyos en la Edad del Bronce de la Meseta. Nvmantia. Arqueologia en Castilla y León, 7, 1999, páginas 21/41.

PALOMINO-LÁZARO, A.L., ABARQUERO-MORAS, F.J. 2000. Informe técnico: Excavación arqueológica en la Cueva de la Revilla (Atapuerca, Burgos). 2ª Fase. Aratikos Arqueólogos S.L. Gabinete arqueológico y estudios sobre Patrimonio Histórico.

PALOMO-DÍEZ, S., BAEZA-RICHER, C., FERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E., GAMBA, C., TIRADO VIZCAÍNO, M. Y ARROYO-PARDO, E. 2011. Análisis molecular de relaciones familiares en los restos hallados en dos tumbas triples de la Cultura Cogotas I (Bronce Final). La Requejada (San Román de Hornija, Valladolid) y Los Tolmos (Caracena, Soria). Actas del Congreso Nacional de la Sociedad Española de Antropología Física. Barcelona.

PALOMO-DÍEZ, S., ESPARZA-ARROYO, A., LÓPEZ-PARRA, A., BAEZA-RICHER, C Y ARROYO PARDO, E. 2013. Diversity of collective burials of the Copper and Bronce Ages on the north plateau of the Iberian Peninsula. 2013. Annali dell- Universitá di Ferrara Museologia Scientifica e Naturalistica. ISSN 1824-2707. Vol. 9/1

PALOMO-DÍEZ, S., ESPARZA-ARROYO, A., LÓPEZ-PARRA, A., BAEZA-RICHER, C Y ARROYO PARDO, E. 2013. Los Cercados: determination of the number of individuals through the genetic study of osteological remains. 2013. Annali dell- Universitá di Ferrara Museologia Scientifica e Naturalistica. ISSN 1824-2707. Vol. 9/1

PALOMO-DÍEZ, S., GOMES, C., LÓPEZ-PARRA, A., Y ARROYO-PARDO, E. 2014. Introducción al ADN antiguo en arqueología y antropología. Congreso internacional de Arqueología de Valencina de la Concepción 2014.

PALOMO-DÍEZ, S., Y ARROYO-PARDO, E. 2012. Arqueogenética: una introducción a las aplicaciones de la genética sobre lso restos arqueológicos. Nuevos paradigmas en la investigación arqueológica. Actas del II Congreso de Arqueología de Chamartín (Ávila). Agosto 2011. pp. 51-64

PEREIRA, V., TOMAS, C., AMORIM, A., MORLING, N., GUSMAO, L., Y PRATA, M.J. 2011. Study of 25 X-chromosome SNPs in the Portuguese. Forensic Sci Int Genet 5: 336-338.

PÉREZ DE BARRADAS, J. 1933-1935. Nuevos estudios sobre prehistoria madrileña. La Colección Bento. Anuario de Prehistoria madrileña IV-VI: 1-90.

PÉREZ RODRÍGUEZ, F.J.; MISIEGO TEJADA, J.C.; SANZ GARCÍA, F.J.; MARCOS CONTRERAS, G.J.; MARTÍN CARBAJO, M.A. y FERNÁNDEZ GIMÉNEZ, J.M. 1994: "'La Huelga': Un interesante yacimiento de la Edad del Bronce en el centro de la Cuenca del Duero (Dueñas, Palencia)", Numantia. Arqueología en Castilla y León, 5, pp. 11-32 .

PINTO, N., MAGALHAES, M., CONDE-SOUSA, E., GOMES, C., PEREIRA, R., ALVES, C., GUSMAO, L, AMORIM, A. 2013. Assesing paternities with inconclusive STR results: The suitability of bi-allelic markers. Forensic Science International: Genetics 7(2013) 16-21.

PRIETO, L., ZIMMERMANN, B., GOIOS, A., RODRÍGUEZ-MONGE, A., PANETO,G.G., ALVES, C., ALONSO, A., FRIDMAN, C., CARDOSO, S., LIMA, G., ANJOS, M.J., WHITTLE, M.R., MONTESINO, M., CICARELLI, R.M.B., ROCHA, A.M., ALBARRÁN, C., DE PANCORBO, M.M., PINHEIRO, M.F., CARVALHO, M., SUMITA, D.R. PARSON, W. 2011. The GHEP-EMPOP collaboration on mtDNA population data- a new resource for forensic casework. Forensic Science International: Genetics 5. 146-151.

ROBLEDO, B., Y TRANCHO, G.J. 2001. Estudio bioantropológico de una sepultura múltiple. La tumba 13 de El Tomillar (Bercial de Zapardiel, Ávila). Dpto. Biología Animal (Antropología) Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

RÖCK, A.W., DÜR, A., VAN OVEN, M., PARSON, W. 2013. Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likeligood approach (EMMA). Forensic science international: genetics 7. 601-609.

RODRÍGUEZ MARCOS, J. A.. 2008. Estudio secuencial de la Edad del Bronce en la Ribera del Duero (provincia de Valladolid). Valladolid: Junta de Castilla y León. Monografías. Arqueología en Castilla y León, 7.

RODRÍGUEZ MARCOS, J.A. Y ABARQUERO MORAS, F.J. 1994. Intervención arqueológica en el yacimiento de la Edad del Bronce de "El Cementerio-ElPrado", Quintanilla de Onésimo (Valladolid). Numantia 5: 33-57.

RODRÍGUEZ MARCOS, J.A. y FERNÁNDEZ MANZANO, J. (Eds.) 2012. Cogotas I : Una cultura de la Edad del Bronce en la Península Ibérica : Homenaje a Mª Dolores Fernández-Posse. Valladolid : Universidad de Valladolid.

RODRÍGUEZ MARCOS, J.A. 2012. Algunas notas acerca delproceso formativo de la Cultura Cogotas I. En Rodríguez Marcos, J.A. y Fernández Manzano, J. (eds.); Cogotas I: Una cultura de la Edad del Bronce en la Península Ibérica, Valladolid. Universidad de Valladolid, pp. 147-174.

ROHLAND, N. Y HOFREITER, M. 2007a. Ancient DNA extraction from bones an teeth. Nat. Protocols 2: 1756-1762

ROHLAND, N. Y HOFREITER, M. 2007b. comparison and optimization of ancient DNa extraction. Bio Techniques 42: 343-352.

ROHLAND, N., SIEDEL, H. AND HOFREITER, M. 2009. A rapid column - based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. Molecular Ecology. Resources. Doi: 10.1111/j.1755-0998.1009.02824.

ROJO-GUERRA, M.A., CARRIDO-PENA, R., GARCÍA-MARTÍNEZ DE LAGRÁN, I. 2008. No sólo cerveza. Nuevos tipos de bebidas alcohólicas identificados en análisis de contenidos de cerámicas campaniformes del valle de Ambrona (Soria). Cuadernos de prehistori ay arqueología de la Universidad de Granada. ISSN 0211-3228, nº18, 2008. PP. 91-105.

ROJO-GUERRA, M.A., KUNST, M., GARRIDO-PENA, R., GARCÍA, MARTÍNEZ DE LAGRÁN, I. 2006. La neolitización de la Meseta NOrte a la luz del C-14: análisis de 47 dataciones absolutas inéditas de dos yacimientos doméstico sdle Valle de Ambrona, Soria, España. Archivo de Prehistoria Levantina. Vo. XXVI (Valencia, 2006)

ROMANOWSKI, G., LORENZ, M.G., Y WACKERNAGEL,W. 1991. Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. Appl Environ Microbiol 57: 1057 - 1061.

SALAS, A., LAREU, M.V., CARRACEDO, A. 2001. Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. Int Legal Med 114: 186 - 190.

SAMBROOK, J., AND RUSSELL, D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. By Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SAMPIETRO, M.L., GILBERT, M.T.P, LAO, O., CARAMELLI, D., LARI, M., BERTRANPETIT, J., AND LALUEZA-FOX, C. 2006. Traking down human contamination in ancient human teeth. Mol. Biol. Evol. 23(9): 1801-1807. doi: 10.1093/molbev/ms1047.

SÁNCHEZ-POLO, A. 2011. Aproximación espacial a una composición decorativa en cerámicas de Cogotas I. Actas del I Congreso de Arqueología de Chamartín (Ávila). 105-116.

SÁNCHEZ-POLO, A. 2010. La muerte en la Arqueología: Visiones cruzadas / posiciones encontradas. El Futuro del Pasado nº1. pp.173-187

SANGER, F., NICKLEN, S., AND COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 74, No. 12, pp, 5463-5467

SCHAFFNER, S.F. 2004. The X chromosome in population genetics. Nat Rev Genet 5: 43-51

SCORRANO, G; VALENTINI, F., MARTÍNEZ-LABARGA, C., ROLFO, MF., FIAMMENGHI, A., LO VETRO, D., MARTINI, F., CASOLI, A., FERRARIS, G., PALLESCHI, G., PALLESCHI, A AND RICKARDS, O. 2014. Methological strategies to assess the degree of bone preservation for ancient DNA studies. Annals of Human Biology. doi: 103109/03014460.2014.954614.

SERRE, D., LANGANEY, A., CHECH, M., TESCHLER-NICOLA, M., PAUNOVIC, M., MENNECIER, P., HOFREITER, M., POSSNERT, G., Y PÄÄBO, S. 2004. No evidnece of Neandertal mtDNa contribution to Early Modern Humans. PLoS Biol 2: e57.

SHA, Y., ZHOU, W., YANG, Z., ZHU, X., XIANG, Y., ET AL. 2014. Changes in Poly (ADP_Ribosyl)ation Patterns in Workers Exposed to BTX. PLos ONE 9(9): e 106146. doi: 10.1371/journal.pone.0106146.

SIMON, M., JORDANA, X., ARMENTANO, N., SANTOS, C., DÍAZ, N., SOLÓRZANO, E., LÓPEZ, J.B., GONZÁLEZ-RUÍZ, M., AND MALGOSA, A. 2011. The presence of nuclear families in Prehistoric collective burials revisited: The Bronze Age burial of Montanissell Cave (Spain) in the Light of aDNA. Am. Journal of Physical Anthropology

SKOGLUND, P., NORTHOFF, B.H., SHUNKOV, M.V., DEREVIANKO, A.P., PÄÄBO, S., KRAUSE, J., AND JAKOBSSON, M. 2013. Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberin Neandertal. PNAS. VOL. 111. no. 6. 2229-2234. doi: 10.1073.

SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139:457-462.

SOARES, P., ACHILLI, A., SEMINO, O., DAVIES, W., MACAULAY,V., BANDELT, H.J., TORRONI, A., Y RICHARDS, M.B. 2010. The archaeogenetics of Europe. Curr. biol 20:R174-183

STLOUKAL, M., Y HANAKOVA,H. 1978. Die Länge der Längsknochen altslavischer Bevölkenrungen unter besorderer Berücksichtigung von Wachstumsfragen. Homo, 29, págs. 53-59.

STONEKING, M. 2000. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. Am. J. Hum. Genet. 67: 1029-1032.

STRATO, S.L. GABINETE DE ESTUDIOS SOBRE PATRIMONIO HISTÓRICO Y ARQUEOLÓGICO. INFORME TÉCNICO: Trabajos arqueológicos anexos a las obras de construcción de Plataforma del Corredor Norte-Noroeste de Alta Velocidad. Tramo: Palencia-León. Subtramo: Río Cea- Bercianos del Real Camino (León). Excavación en área en el yacimiento de “Canto Blanco” (Calzada del Coto / Sahagún, Provincia de León). A petición de la empresa: Constructora San José, S.A. Adjuditaria del proyecto: Adif, Ministerio de Fomento.

STRATO, S.L.: 2009. Trabajos arqueológicos necesarios en la obra de construcción de la red arterial ferroviaria de Valladolid. Variante Este. Plataforma. Excavación arqueológica en el yacimiento de "Fuente de La Mora" (Valladolid). Fase de excavación en área, Informe técnico depositado en elServicio Territorial de Eduación y Cultura de la Junta de Castilla y León en Valladolid.

SUCHEY, J.M., BROOKS, S.T., AND KATZ, D. 1988. Instructions for the use of hte Suchey-Brooks system for age determination for the female os pubis. Instructional materials accompanying female pubic symphyseal models of the Suchey-Brooks system, distributed by France Casting (Diane France, 20102 Buckhorn Rd., Bellvue, CO 80512, USA).

SULLIVAN, K.M., MANNUCCI, A., KIMPTON, C.P. and GILL, P. 1993. A rrapid and quantitative DNA sex rest: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. Biotechniques 15, 636–641.

TAKEZAKY, N. AND NEI, M. 1996. Genetic distances an reconstruction of phylogenetic trees frommicrosatellite DNa. Genetics 144: 389-399.

THILLAUD, D. 1994. Lesions Osteo-Archeologiques. Recueil et Identification. Ed. Kronos.

TOMAS, C., SNACHEZ, J., BARBARO, A., BRANDT-CASACEVALL, C., HERNANDEZ, A., BEN DHIAB, M., RAMON, M. Y MORLING, N. 2008. X-Chromosome SNP analyses in 11 human Mediterranean populations show a hith overall genetic homogeneity except in North-wet Africans (Moroccans). BMC Evolurionary Biology 8:75.

TORRONI, A., ACHILLI, A., MACAULAY, V., RICHARDS, M., Y BANDELT H.J., 2006. Harvesting the fuit of the human mtDNa tree. Trens Genet 22: 339-345.

TUROSS, N. 1994. The biochemistry of ancient DNA in bone. Experientia 50: 530-535.

UBELAKER, D.H. 1978. Human skeletal remains. Excavation, analysis, interpretation. Smithsonian institution. Ed. Taraxacum-Washington.

UNDERHILL, P.A., AND KIVISILD, T. 2007. Use of Y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations. Annu. Rev. Genet. 41: 539 - 64.

VAN OVEN, .M, AND KAYSER, M. 2008. Updated Comprehensive Phylogenetic Tree of Global Human mItochondrial DNA variation. Human mutation. Mutation in Brief; 1039, 30:E386-E394, (2008) online.

VÁZQUEZ-CUESTA, A. 2009. Reflexión sobre el Campaniforme a partir de la evidencia funeraria de la cuencia del Tajo (España y Portugal). Arqueoweb. Revista sobre arqueología en internet. 11, 2009.

VERNESI, C., DI BENEDETTO, G., CARAMELLI, D., SECCHIERI, E., SIMONI, L., KATTIN, E., MALASPINA, P., NOVELLETTO, A., MARIN, V.T. Y BARBUJANI, G., 2001. Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:13460-13463

VIVES, S., GILBERT, M.P., ARENAS, C., GIGLI, E., LAO, O. AND LALUEZA-FOX, C. 2008. Statistical analysis of post mortem DNA damage-derived miscoding lesions in Neandertal mitochondrial DNA. BMC Research notes. Short Report. 1:40. doi: 10.1186/1756-0500-1-40..

VON WURMB-SCHWARK, N., HIGUCHI, R., FENECH, A.P., ELFSTROEM, C., MEISSNER, C., OEHMICHEN, M., CORTOPASSI, G.A. 2002. Quantification of human mitochondrial DNA in real time PCR. Forensic Science International. 126 (2002) 34-39.

WHALLON, R.J.R. 1968. A new approach to pottery typology. Museum of Anthropology. University of Michigan. Vo. 37, nº 1. pp. 13-33.

WILSON, E.G. 1997. Inhibition an facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63:3741-3751.

YAN SHA, WEI ZHOU, ZHEINYU YANG, XIAOLING ZHU, YINGPING XIANG, TIANDI LI, DEXIANG ZHU, XINYUE YAG. 2014. Changes in Poly (ADP-ribosyl)ation patterns in workers exposed to BTX. PlosONE 9(9): e106146.doi:10.1371/journal.pone.0106146.

9.2 RECURSOS ELECTRÓNICOS

Google Earth - https://www.google.es/intl/es/earth/index.html

IBM SPSS Statistics V.22.

Arlequin V. 3.5 (Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.) (http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/).

Chromas V. 2.4.3 (http://technelysium.com.au/).

Mutation Surveyor (R) Software. (http://www.softgenetics.com/mutationSurveyor.html).

Familias V.3.. Norwegian Institute of Public Health, Department of Family Genetics. Kling, D., Tillmar, A.O. Egeland. T. 2014. Familias 3- Extensions and new functionality. Forensic Science International. Genetics. (http://familias.no/english/help/).

Surffer (R) V. 11. (http://www.goldensoftware.com/products/surfer).

CONTENIDO DEL CD

- VERSIÓN DIGITAL DE LA TESIS DOCTORAL

- MATERIAL SUPLEMENTARIO:

  - S.1. Matrices de distancias genéticas FSTs
  - S.2. Perfiles genéticos de STRs autosómicos y haplotipos de ADN mitocondrial del personal implicado en la investigación
  - S.3. Secuencias de los clones correspondientes a cada una de las muestras clonadas.
  - S.4. Perfiles de STRs autosómicos completos obtenidos de cada una de las amplificaciones llevadas a cabo a partir de cada muestra.