

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas Utilidad en casos de
investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cláudia Filipa Lopes Gomes

DIRECTORES

Eduardo Arroyo Pardo
Juan Francisco Gibaja Bao

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA
PRESENTADA POR

Cláudia Filipa Lopes Gomes

DIRECTORES

Eduardo Arroyo Pardo
Juan Francisco Gibaja Bao

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología



TESIS DOCTORAL



**INVESTIGACIÓN DE PARENTESCO BIOLÓGICO
EN MUESTRAS CRÍTICAS**

Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense



CLÁUDIA F. LOPES GOMES

2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología



**Investigación de Parentesco Biológico en
Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica,
Antropológica y/o Forense**

CLÁUDIA FILIPA LOPES GOMES

Tesis Doctoral, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología



**Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica
y/o Forense**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

CLÁUDIA FILIPA LOPES GOMES

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES

EDUARDO ARROYO PARDO

Departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

JUAN FRANCISCO GIBAJA BAO

Departamento de Arqueología y Antropología
Institució Milà i Fontanals (CSIC-IMF)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Tesis Doctoral

Madrid, 2020

Fuente de las imágenes:

Portada. “Latona and her children, Apollo and Diana” - Smithsonian American Art Museum. Fuente de la foto:
William Henry Rinehart

Contraportada. “Silenus and baby Bacchus” – Musée du Louvre. Fuente de la Foto:
<https://www.pinterest.it/pin/383720830733176450/>

∞ Financiación

La presente tesis doctoral se ha realizado gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación, beca y contrato predoctoral:

- Proyecto de Investigación “*Estudio antropogenético de la transición neolítica en el mediterráneo noroccidental*”, HAR2015-67323-C2-2-P, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Gobierno de España, España. Investigadores principales: Eulàlia Subirà (UAB); Eduardo Arroyo Pardo (UCM).
- Proyecto de Investigación “*Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas*”, Banco Santander-Universidad Complutense de Madrid, PR41/17-21018, España. Investigadores principales: Bernardo Perea Pérez (UCM) y Elena Labajo González (UCM).
- Servei tècnic de localització, recuperació i anàlisi antropològica i genètica de restes òssies humanes de la Guerra Civil i la dictadura franquista (EXI-2017-53), Generalitat de Catalunya, España. Investigador responsable: Enric Tartera Bieto (Iltirta, S.A).
- Proyecto de investigación “*Contribución al mapa genético de las poblaciones de origen fenicio en Occidente*”, HAR2012-31989, Ministerio de Economía y Competitividad, España. Investigador responsable: Carlos González Wagner (UCM).
- Beca Predoctoral, Convenio FUE (Fundación Universidad-Empresa) – UCM (2013-2014)
- Contracto Predoctoral Santander-Universidad Complutense de Madrid [G/6401400/8000] (2015-2019)

∞ Agradecimientos

Há sete anos começou esta longa jornada. Um caminho muito, muito longo durante o qual aprendi e cresci, não só como profissional, mas também como pessoa.

O meu mais profundo agradecimento

A mis directores de tesis, Eduardo Arroyo y Juan Gibaja, por confiar en mí, por permitirme dar alas a mi curiosidad científica. Gracias por vuestro apoyo, confianza y por creer que era posible.

Al departamento de Medicina Legal, Psiquiatría y Patología de la UCM, personal docente, investigador, PAS y de manutención, por hacer posible mi trabajo de investigación. En especial a la Dra Elena Labajo y al Dr. Bernardo Perea, por su confianza.

A Ana M. López Parra, por toda tu orientación, por ser mi guía en estos momentos finales. Si he terminado este camino, si he llegado a la recta final, fue gracias a ti. Mi más profundo agradecimiento.

A todos los arqueólogos y antropólogos que han hecho realidad esta tesis. En especial a la Dra. Eulàlia Subirà, Dr. Jordi Roig, Dr. Juan Pereira, Dr. Enrique Dorado, Dr. Ildefonso Ramírez, Dr. Marc Guardià y una mención especial al Dr. Joan López. Un agradecimiento a Maite García, por toda su inestimable ayuda.

A todos los miembros del Servicio de Criminalística de la Guardia Civil (Madrid), del departamento de Biología, por toda vuestra colaboración.

A todo el grupo de Santiago de Compostela, por haberme recibido y hacerme sentir en casa. Muchas gracias por todo.

A Celia, a Sara y a Maribel, gracias por todo, principalmente por el ánimo que me demostráis e interés por esta aventura genética. Gracias por hacer parte de este camino.

A todos los alumnos que han pasado por el laboratorio, porque siempre aprendí algo con todos y con cada uno de vosotros. Un especial agradecimiento a Beatriz, a Paula y a Ariana, gracias por vuestra alegría, gracias por vuestro trabajo, gracias por confiar en mí. Parte de este trabajo, es vuestro.

A Pedro Cuesta, por ayudarme siempre con una sonrisa. A Antonio Luis Gallardo, por su entusiasmo, no solo con “los Celtas”, pero con la Historia en general. A todo el grupo Celta, por todo el ánimo y por ayudarme a viajar al pasado.

To Despina and Sofia, for your trust in me, for believing I would be worthy of study and to discover the secrets of “our” mummies. Thank you very much for your trust, and affection.

A Ángeles, por todo ese ánimo, por todas las conversaciones, muchas gracias. A Belén y a Rafael, por vuestra amistad.

A Gerard, gracias por tu entusiasmo, por creer en mí y en toda esta locura del DNA.

À Sofia Tereso, um enorme obrigada por me lembrares qual é o meu caminho e o que me trouxe até aqui.

A Oscar García, por toda tu ayuda y curiosidad científica. A Mercedes Aler, por todo tu cariño y por el ánimo, sobretudo, en esta última etapa.

A la Dra. Concha Magaña, por todas tus palabras, por todas las conversaciones y por todo el cariño.

Ao Rui, à Nádia e à Professora Maria João Prata o meu mais profundo agradecimento. Obrigada por estarem sempre aí, por ajudar-me sempre que necessito. Obrigada por nunca se esquecerem de mim e fazer-me sempre sentir em casa.

A mis compañeros de laboratorio. A Carlos, por todas las horas compartidas y conversaciones, por toda tu curiosidad científica. A César, por todo. Por creer en mí, por animarme, por apoyarme, por ayudarme, por no dejarme caer. Patxi y yo te lo agradecemos de corazón. A Sara, por enseñarme este mundo nuevo de la genética aplicada a la Historia, por ayudarme, por animarme, por todas las horas y días y meses compartidos, pero, principalmente por confiar en mí. Gran parte de esta tesis os la debo a vosotros. Mi más profundo agradecimiento.

A Carmen, gracias por estar siempre ahí, por tus palabras, por hacerme creer que vale la pena.

A Laura y a Sergio, gracias por los desayunos, por las meriendas, coffees y demás. Por vuestras palabras de ánimo, por vuestra amistad.

A Elena Ruiz, gracias por todas nuestras conversaciones, por tu alegría, gracias por amistad. Patxi y yo te agradecemos mucho, mucho el cariño.

A Jesús, simplemente, gracias por todo. Gracias por creer en mí, por confiar y por hacerme ver que hay luz al final del túnel. Gracias por ayudarme tantas veces a levantarme.

A Elsa, gracias por demostrarme el valor del sacrificio, el valor de la dedicación, que la genética no es solo una pasión, es parte de nuestro sueño. Nos volveremos a ver, nos volveremos a abrazar. Gracias por todo.

A Paola, por tu cariño y amistad incondicionales, por tu ánimo, por tu sonrisa, por estar siempre ahí. Gracias por hacerme creer que nada es imposible.

A Beatriz, mi Nana. Te agradezco por todo. Por tu apoyo, por tu confianza, por tus palabras que me levantan, cuando ya ni yo creo que es posible. Por escucharme, por leerme, por estar siempre aquí a mi lado, estando tan distantes. Simplemente, gracias por todo.

Às minhas amigas de sempre e para sempre. À Daniela Machado, à Daniela Moutinho, à Nádia e à Leonor. Obrigada por sempre, sempre terem acreditado que isto era possível. Por terem tornado a distância mais pequenina, por todos os almoços, lanches e jantares. Pela vossa amizade incondicional, pelo vosso abraço que sempre me deu força para continuar. Estão no meu coração.

À minha Família. Às minhas Avós. Pela vossa luta, pela vossa história de vida, pelo vosso exemplo. Obrigada por todo o vosso afeto. Obrigada por fazer parte deste meu caminho e de toda a minha vida.

Ao Timtim. Porque jamais te esquecerei, obrigada por todos os anos juntos, de carinho e brincadeiras, estarás para sempre no meu coração.

Ao Patxi. Pelo teu olhar doce. Obrigada pelo gatinho afectuoso que és. Obrigada por encontrar-me e ajudar-me a seguir.

Aos meus Pais, ao meu Irmão. Não tenho palavras. Obrigada por entender a minha ausência, obrigada por apoiar-me, mesmo quando não estão de acordo, obrigada por simplesmente estar sempre aí. Obrigada por ajudar-me a respirar cada dia. Obrigada por todo esse amor incondicional. Obrigada por confiar em mim, obrigada por proteger-me. Obrigada por todos esses sacrifícios que nunca me contaram. Obrigada por dar-me a mão, por dar-me colo, por esperar-me e abraçar-me. Obrigada por fazerem parte de mim. Somos um.

"Se podes conservar o teu bom senso e a calma
No mundo a delirar para quem o louco és tu...
Se podes crer em ti com toda a força de alma
Quando ninguém te crê... Se vais faminto e nu,

Trilhando sem revolta um rumo solitário...
Se à torva intolerância, à negra incompreensão,
Tu podes responder subindo o teu calvário
Com lágrimas de amor e bênçãos de perdão...

Se podes dizer bem de quem te calunia...
Se dás ternura em troca aos que te dão rancor
(Mas sem a afectação de um santo que oficia
Nem pretensões de sábio a dar lições de amor)...

Se podes esperar sem fatigar a esperança...
Sonhar, mas conservar-te acima do teu sonho...
Fazer do pensamento um arco de aliança,
Entre o clarão do inferno e a luz do céu risonho...

Se podes encarar com indiferença igual
O triunfo e a derrota, eternos impostores...
Se podes ver o bem oculto em todo o mal
E resignar sorrindo o amor dos teus amores...

Se podes resistir à raiva e à vergonha
De ver envenenar as frases que disseste
E que um velhaco emprega eivadas de peçonha
Com falsas intenções que tu jamais lhes deste...

Se podes ver por terra as obras que fizeste,
Vaiadas por malsins, desorientando o povo,
E sem dizeres palavra, e sem um termo agreste,
Voltares ao princípio a construir de novo...

Se vivendo entre o povo és virtuoso e nobre...
Se vivendo entre os reis, conservas a humildade...
Se inimigo ou amigo, o poderoso e o pobre
São iguais para ti à luz da eternidade...

Se quem conta contigo encontra mais que a conta...
Se podes empregar os sessenta segundos
Do minuto que passa em obra de tal monta
Que o minuto se espraie em séculos fecundos...

Então, ó ser sublime, o mundo inteiro é teu!
Já dominaste os reis, os tempos, os espaços!...
Mas, ainda para além, um novo sol rompeu,
Abrindo o infinito ao rumo dos teus passos.

Pairando numa esfera acima deste plano,
Sem receares jamais que os erros te retomem,
Quando já nada houver em ti que seja humano,
Alegra-te, meu filho, então serás um homem!"

Rudyard Kipling.
trad. Félix Bermudes

Dedicada aos meus Pais e ao meu Irmão.

Às minhas Avós.

Índice general

☞ Índice de Figuras.....	25
☞ Índice de Tablas.....	29
☞ Abreviaturas.....	33

Resumen.....	37
--------------	----

Abstract.....	41
---------------	----

INTRODUCCIÓN

1. Parentesco Biológico. El concepto de Familia y de Parentesco.....	45
---	-----------

2. Familia, parentesco y ritual funerario.....	45
---	-----------

3. Análisis genético de DNA.....	47
---	-----------

3.1 Marcadores genéticos aplicados al estudio de relaciones familiares.....	47
---	----

3.1.1 DNA nuclear.....	47
------------------------	----

○ Tipos de marcadores genéticos más frecuentes.....	48
---	----

Marcadores <i>Short Tandem Repeats</i> (STR).....	48
---	----

 Marcadores bi-alélicos

<i>Single Nucleotide Polimorphisms</i> (SNP).....	48
---	----

<i>Insertion-Deletion</i> (InDel).....	49
--	----

3.1.1.1 Marcadores Nucleares recombinantes: cromosomas autosómicos.....	50
---	----

○ Transmisión de marcadores situados en cromosomas autosómicos.....	50
---	----

3.1.1.2 Marcadores Nucleares recombinantes: cromosoma X.....	51
--	----

○ Transmisión del cromosoma X.....	52
------------------------------------	----

○ Aplicaciones del estudio del cromosoma X.....	52
---	----

3.1.1.3 Marcadores Nucleares no recombinantes.....	53
--	----

○ El concepto de haplotipo y de haplogrupo.....	53
○ Marcadores Nucleares no recombinantes: Cromosoma Y.....	54
Polimorfismos presentes en el cromosoma Y.....	54
Aplicaciones del estudio del cromosoma Y: la herencia paterna del cromosoma Y.....	54
DNA no nuclear: DNA mitocondrial.....	55
Heteroplasmia.....	56
Aplicaciones del estudio del mtDNA: la herencia materna del mtDNA.....	57
3.2 Estudios genéticos de interés histórico, antropológico y arqueológico.....	58
3.3 Estudios genéticos de interés forense.....	59
3.3.1 Determinación de parentescos biológicos para la identificación de individuos.....	60
3.3.2 Determinación de una relación de parentesco concreta.....	62
4. Análisis genético en muestras degradadas	62
4.1 Factores de degradación del DNA.....	62
4.2 Problemáticas asociadas al análisis de DNA crítico.....	63
4.2.1 Contaminación.....	63
4.2.2 Análisis de perfiles parciales.....	64
El fenómeno de “ <i>allelic dropout</i> ”	64
Inhibición del DNA.....	65
JUSTIFICACIÓN.....	71
HIPÓTESIS.....	75
OBJETIVOS.....	79

1. OBJETIVOS METODOLÓGICOS.....	79
2. OBJETIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES FAMILIARES.....	79
3. OBJETIVO GENÉTICO-POBLACIONAL	79

RESULTADOS

Resultados - Estudios para el establecimiento de nuevos métodos de análisis.....	83
--	----

- **Artículo 1**

Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false?

- **Artículo 2**

"Inhibiting inhibitors": Preliminary results of a new "DNA extraction-amplification" disinhibition technique in critical human samples.

- **Artículo 3**

Spanish allele and haplotype database for 32 X-chromosome Insertion-Deletion polymorphisms.

Resultados - Estudios para el establecimiento de relaciones familiares y genético-poblacionales.....	99
--	----

Resultados y análisis publicados.....	99
---------------------------------------	----

- **Artículo 4**

Biological kinship analysis in extremely critical samples: The case of a Spanish Neolithic necropolis.

- **Artículo 5**

Paleogenetic evidence of a Pyrenean Neolithic Family: 1 kinship, physical appearance and biogeography multidisciplinary analysis.

- **Artículo 6**

A maternity case with human remains from a XIII-XIV century burial at Uceda, Guadalajara, Central Spain.

- **Artículo 7**

Study of medieval critical samples - A genetic approach to the study of the Mudéjar Community.

- **Artículo 8**

An unusual kinship case from the Spanish Civil War (1936-1939): Ancient *versus* degraded sample's investigation.

- **Artículo 9**
X-InDels efficacy evaluation in a critical samples paternity case: A Spanish Civil War case from the memorial of the Camposines (Tarragona, Spain).

Resultados y análisis genéticos no publicados.....157

- Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico neolítico de Can Gambús -1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España).....159
- Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico neolítico de El Llord (Castellar de la Ribera, Lleida, Cataluña, España).....166
- Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico de las Edades del Cobre-Bronce de Minferri (Lleida, Cataluña, España).....170
- Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico medieval de Galligants (Girona, Cataluña, España).....180
- Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico medieval de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España).....185

Resultados y análisis genéticos no publicados.....193

1. Procesos experimentales en el laboratorio.....195

2. Análisis bioinformático y estadístico global.....195

- Análisis estadístico de las variables biológicas analizadas.....195
- Análisis biogeográfico.....196
 - Análisis AMOVA198
 - Estudio de diferencias poblacionales, F_{ST}198
- Análisis biogeográfico - resultados.....199
 - ESTUDIO SINCRÓNICO.....199
 - Periodo neolítico199
 - Periodo de las Edades del Cobre y Bronce200
 - Periodo medieval200

ESTUDIO DIACRÓNICO.....	208
-------------------------	-----

DISCUSIÓN

1. OBJETIVOS METODOLÓGICOS.....	215
Objetivo 1.	215
Objetivo 2.....	217
Objetivo 3.....	220
Objetivo 4.....	221
Objetivo 5.....	222
2. OBJETIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES FAMILIARES	223
Objetivo 6.....	223
Periodo Neolítico.....	223
Edades del Cobre – Bronce.....	224
Época Medieval.....	225
Época Moderna.....	226
Consideraciones finales.....	226
3. OBJETIVO GENÉTICO-POBLACIONAL	227
Objetivo 7.....	227
Consideraciones generales.....	227
ANÁLISIS BIOGEOGRÁFICO SINCRÓNICO.....	227
○ Neolítico.....	227
Distribución de los linajes de mtDNA.....	227
Varianza molecular y diferenciación genética entre poblaciones neolíticas.....	228
○ Edades del Cobre y Bronce.....	229
Distribución de los linajes de mtDNA.....	229
Varianza molecular y diferenciación genética entre poblaciones de las Edades del Cobre-Bronce.....	230
○ Época Medieval.....	231
Distribución de los linajes de mtDNA.	231

Varianza molecular y diferenciación genética entre poblaciones medievales.....	232
ANÁLISIS BIOGEOGRÁFICO DIACRÓNICO.....	232
Análisis genético – poblacional – consideraciones finales.....	234
Discusión - Consideraciones finales: problemas y perspectivas de futuro.....	234
CONCLUSIONES.....	239
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	245
Material Suplementario.....	257

∞ Índice de Figuras

Figura 1	Representación esquemática de un marcador de tipo STR (“ <i>Short Tandem Repeat</i> ”).	Pág.48
Figura 2	Representación esquemática de un marcador SNP.	49
Figura 3	Representación esquemática de un polimorfismo de tipo <i>InDel</i> .	50
Figura 4	Modo de transmisión de cromosomas autosómicos.	51
Figura 5	Modo de transmisión del cromosoma X.	53
Figura 6	Representación esquemática de la estructura de una molécula de mtDNA.	56
Figura 7	Representación gráfica de la presencia de heteroplasmia y homoplasmia en una célula humana nucleada.	57
Figura 8	Visión global de un electroferograma completo, considerando un determinado conjunto de marcadores genéticos.	66
Figura 9	Electroferograma con tres marcadores genéticos (D5S818, D13S317 y D7S820), con los respectivos alelos y la respectiva altura en RFUs.	67
Figura 10	Planta general de la necrópolis neolítica de Can Gambús -1.	160
Figura 11	Posible linaje de parentesco 1, entre los individuos 569, 256, 583 y 1858, yacimiento de Can Gambús -1.	161
Figura 12	Posible linaje de parentesco 2, entre los individuos 1864 y 1825, yacimiento de Can Gambús -1.	162
Figura 13	Posible linaje de parentesco 3, entre los individuos 150 y 363, yacimiento de Can Gambús -1.	162
Figura 14	Planta de una de las zonas del yacimiento de Minferri, donde se localizan los dos silos analizados en el presente estudio (SJ-399 y SJ-418).	170
Figura 15	Hipótesis I de parentesco entre los individuos 5312, 5310, 5307 y 5213 del yacimiento arqueológico de Minferri.	174
Figura 16	Hipótesis II de parentesco entre los individuos 5312, 5310, 5307 y 5213 del yacimiento arqueológico de Minferri.	174
Figura 17	Hipótesis III de parentesco entre los individuos 5312, 5310, 5307 y 5213 del yacimiento arqueológico de Minferri.	175
Figura 18	Plano del yacimiento arqueológico de Galligants (Girona, Cataluña, España).	180
Figura 19	Pozo de agua donde se han encontrado los individuos I-374 y II-374, yacimiento de Can Gambús-1 (medieval).	186
Figura 20	Gráfico de la distribución χ^2 de Pearson.	196
Figura 21	Zonas geográficas consideradas en el estudio diacrónico.	197
Figura 22	Representación en el espacio del análisis MDS, de los yacimientos del periodo Neolítico, a través del método PROXCAL.	207

Figura 23	Representación en el espacio del análisis MDS, de los yacimientos de las Edades del Cobre y Bronce, a través del método PROXCAL.	207
Figura 24	Representación en el espacio del análisis MDS, de los yacimientos del periodo Medieval, a través del método PROXCAL.	207
Figura 25	Representación en el espacio 2D del análisis MDS, de los estudiados en la región de Castilla la Mancha, a través del método PROXCAL.	211
Figura 26	Representación en el espacio 2D del análisis MDS, de los yacimientos estudiados en la región de Cataluña a través del método PROXCAL.	211
Figura 27	Localización de la porción petrosa (color verde), del hueso temporal y ejemplo de una muestra de porción petrosa, perteneciente al individuo 3036 del yacimiento de Galligants (Girona, Cataluña, España).	218
Figura 28	Tipos de enterramiento más frecuentes en el periodo Neolítico.	224
Figura 29	Tipos de enterramientos más frecuentes en el periodo del Cobre-Bronce.	225
Figura 30	Tipo de enterramiento más frecuente en el periodo Medieval.	226
Figura 31	Distribución de los haplogrupos mitocondriales en el Período Neolítico.	228
Figura 32	Distribución de los haplogrupos mitocondriales en el Período de las Edades del Cobre y Bronce	230
Figura 33	Distribución de los haplogrupos mitocondriales en el Período Medieval.	231

∞ Índice de Tablas

Tabla 1	Individuos analizados del yacimiento arqueológico de Can Gambús -1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España), respectivas muestras biológicas analizadas, así como el sexo y edades determinados a nivel antropológico.	Pág.164
Tabla 2	Individuos analizados pertenecientes al yacimiento arqueológico de Can Gambús -1, sus respectivas estructuras y muestras analizadas. Se detalla también el haplotipo y siempre que fue posible, el haplogrupo mitocondrial determinado.	165
Tabla 3	Individuos analizados del yacimiento arqueológico de El Llord (Castellar de la Ribera (Solsonès), Cataluña, España), muestras biológicas analizadas, sexo y edades determinados a nivel antropológico.	168
Tabla 4	Individuos analizados pertenecientes al yacimiento arqueológico neolítico de El Llord (Castellar de la Ribera (Solsonès), Cataluña, España), donde se detalla el haplotipo y, siempre que fue posible, el haplogrupo mitocondrial determinado, así como la frecuencia en la base de datos.	169
Tabla 5	Datos arqueológicos de los 16 individuos (Ind.) estudiados pertenecientes al yacimiento de Minferri (Lleida, Cataluña, España), incluyendo las muestras analizadas en el estudio genético, sexo y edades determinados a nivel antropológico. y su respectiva nomenclatura	176
Tabla 6	Perfiles genéticos (haplotipos) consenso de mtDNA de los 16 individuos estudiados del yacimiento de Minferri (Lleida, Cataluña, España), así como, su haplogrupo más probable y su frecuencia en la base de datos AmtDB.	177
Tabla 7	Perfiles genéticos consenso obtenidos, tras la valoración de los resultados obtenidos para los individuos estudiados del yacimiento arqueológico de Minferri en las sucesivas amplificaciones de STRs autosómicos, llevadas a cabo con el kit AmpF [®] STR [®] MiniFiler [™] PCR Amplification Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC)..	178
Tabla 8	Perfiles genéticos consenso obtenidos tras la valoración de los resultados obtenidos para los individuos analizados del yacimiento arqueológico de Minferri, en las sucesivas amplificaciones de X-InDels, publicados de acuerdo con Pereira et al., (2012).	178
Tabla 9	Valores de LR obtenidos, considerando el análisis de los 32 X-InDels (Pereira et al., 2012), comparando distintas hipótesis de parentesco biológico. Los valores de LR presentados han sido obtenidos comparando cada hipótesis de parentesco indicada <i>versus</i> “no emparentado”.	179
Tabla 10	Muestras utilizadas para el estudio genético de los ocho individuos exhumados del yacimiento arqueológico de Galligants (Girona, Cataluña, España).	182
Tabla 11	Perfiles genéticos (haplotipos) consenso de mtDNA de los 8 individuos estudiados, así como su haplogrupo más probable.	183
Tabla 12	Perfiles genéticos consenso obtenidos para los individuos 3094 y 3057, tras el análisis genético con los kits comerciales VeriFiler [™] Express y AmpFLSTR [™] NGM SElect [™] PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific, Foster City, USA).	184
Tabla 13	Individuos analizados del yacimiento arqueológico de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España) y respectivas muestras biológicas analizadas, sexo y edades determinados a nivel antropológico.	189
Tabla 14	Individuos analizados pertenecientes al yacimiento arqueológico de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España). Se detalla el haplotipo y, siempre que fue posible, el haplogrupo mitocondrial	191

	determinado, así como la frecuencia en la base de datos AmtDB.	
Tabla 15	Resultados del análisis estadístico de las variables biológicas analizadas (hueso, diente, saliva y sangre), calculándose el “éxito”, χ^2 de Pearson y Prueba exacta de Fisher.	196
Tabla 16	Análisis de la varianza molecular (AMOVA), comparando los yacimientos neolíticos, de las Edades del Cobre –Bronce y medievales analizados en la presente tesis, con la información previamente publicada de otros yacimientos del mismo periodo histórico.	201
Tabla 17	Valores de diferenciación genética F_{ST} obtenidos, comparando el yacimiento de Can Gambús-1, con la información previamente publicada de otros yacimientos neolíticos.	202
Tabla 18	Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} en los yacimientos del periodo Neolítico	202
Tabla 19	Valores de diferenciación genética F_{ST} , obtenidos tras comparar el yacimiento de Minferri, con la información previamente publicada de otros yacimientos de las Edades del Cobre-Bronce.	203
Tabla 20	Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} en los yacimientos de las Edades del Cobre y Bronce.	204
Tabla 21	Valores de diferenciación genética F_{ST} , obtenidos tras comparar los yacimientos medievales analizados en la presente tesis, con la información previamente publicada de otros yacimientos medievales.	205
Tabla 22	Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} en los yacimientos medievales	206
Tabla 23	Análisis de la varianza molecular (AMOVA), en las regiones de Castilla la Mancha y Cataluña.	209
Tabla 24	Valores de diferenciación genética F_{ST} , comparando los yacimientos estudiados en la región de Castilla la Mancha.	210
Tabla 25	Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} obtenidos comparando los yacimientos estudiados en la región de Castilla la Mancha.	210
Tabla 26	Valores de diferenciación genética F_{ST} , comparando los yacimientos estudiados en la región de Cataluña.	210
Tabla 27	Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} obtenidos comparando los yacimientos estudiados en la región de Cataluña.	210

Abreviaturas

- a.C. “Antes de Cristo”
- AD *Anno Domini*
- AMOVA *Analysis of molecular variance*, análisis de la varianza molecular
- AmtDB *Ancient mt DataBase*, Base de datos de DNA antiguo
- Aprox. Aproximadamente
- auDNA DNA autosómico
- A, G, C, T Adenina, Guanina, Citosina, Timina
- B.C. *Before Christ*, antes de Cristo.
- BCE *Before Current Era*, antes de la Era común.
- bp *Base pairs*, pares de bases.
- B.P. *Before present*, antes del presente.
- BSA *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino.
- cal Fecha calibrada
- CRS *Cambridge Reference Sequence*, secuencia de referencia de Cambridge.
- “D.A.F” *Dispersion Accounted For*, dispersión explicada por
- D-Loop *Displacement Loop* o *Control Region*, región control.
- DNA *DeoxyriboNucleic Acid*, Ácido desoxirribonucleico
- fa Formato *FASTA*
- fig. Figura
- g Gramo
- gl Grado de libertad

- HV, HVS Región hipervariable
- IBD *Identical By Descent*, idéntico por descendencia.
- InDel *Insertion-Deletion*, inserción-delección.
- kb Kilo base
- MDS *Multidimensional scaling*, escalamiento multidimensional.
- MEC *Mean exclusion chance*, poder de exclusión *a priori*.
- mL Mililitro
- MPS *Massive parallel sequencing*, secuenciación masiva en paralelo.
- mtDNA DNA mitocondrial
- mt-SNPs SNP del mtDNA
- NGS *Next Generation Sequencing*, secuenciación de próxima generación.
- nuDNA DNA nuclear
- PAR *Pseudo-Autosomal Region*, región pseudo-autosómica.
- PCR *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa
- PD *Power of discrimination*, poder de discriminación.
- PROXCAL *PROXimity SCALing*
- rCRS *Revised Cambridge Reference Sequence*, secuencia de referencia de Cambridge revisada.
- RFUs Unidades Relativas de Fluorescencia
- RM-Y-STRs *Rapidly Mutating STRs*, STRs de mutación rápida.
- S, L *Short, Long*
- s. Siglo
- SNP *Single Nucleotide Polimorphism*
- STR *Short Tandem Repeats*
- X-InDel InDel situado en el cromosoma X

- X-STR STR situado en el cromosoma X
- Y-SNP SNP situado en el cromosoma Y
- Y-STR STR situado en el cromosoma Y
- μL Microlitro

∞ **Nota:** En la presente tesis se adoptó redactar con palabras la numeración inferior a 10, (por ejemplo, “tres”, “cuatro”) y con número cuando era igual o superior a 10 (por ejemplo, “12”, “54”), de acuerdo con “*fundéu* - asesorada por la Real Academia Española”.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **R**esumen

Aunque las relaciones de parentesco son una realidad universal para todos los seres humanos, los conceptos de “familia” y de “vínculo familiar” dependen tanto de la región geográfica, como del momento histórico al que se hace referencia. Por otra parte, la idea de “parentesco”, *kinship* en inglés, es considerado un vínculo entre personas, prácticamente siempre ligado a lazos biológicos de consanguinidad. Si por un lado los conceptos de familia y parentesco pueden afectar al dónde y con quién un individuo será enterrado, el pensamiento inverso es también posible. El lugar y la persona con quien está enterrado un individuo pueden informarnos acerca del parentesco entre él y sus descendientes y en relación con una comunidad, con otros individuos de la misma necrópolis, o incluso con los que están enterrados en la misma tumba. Así, los rituales funerarios y de enterramiento pueden representar una posible filiación de parentesco biológico (u otros tipos de relaciones sociales).

Para llevar a cabo los estudios de parentesco, tanto en contextos forenses como arqueológicos, la herramienta primordial es el análisis genético de DNA. El objetivo es ser capaz de relacionar o descartar posibles parentescos biológicos entre los inhumados, estén estos enterrados en fosas individuales o en una misma tumba. Aunque existan registros indicando un parentesco, solamente el estudio genético permitirá cerciorarse de tal información. Pese a la indiscutible utilidad del análisis genético, la degradación del DNA es normalmente un factor presente en la investigación de parentescos, ya que esta casuística, tanto forense como arqueológica, está frecuentemente asociada a casos no actuales. Efectivamente, el frecuente avanzado estado de descomposición de estas muestras biológicas, hacen que la concentración del material genético se encuentre en valores muy reducidos (muestra crítica). Por este motivo, en la presente tesis se pretendió determinar y optimizar un conjunto de nuevas técnicas de análisis (extracción, amplificación y secuenciación de DNA) con las que mejorar el análisis de muestras críticas.

De esta forma, la implementación de nuevas metodologías de análisis ha sido fundamental para llevar a cabo el objetivo primordial: la determinación de parentescos biológicos, estudiando muestras críticas de enterramientos múltiples, fuesen o no simultáneos. Dicha metodología ha consistido en la extracción no destructiva de DNA en material óseo o dental, la asociación de BSA con un incremento de $MgCl_2$ durante las amplificaciones de mtDNA, la aplicación por primera vez de X-InDels a muestras degradadas, conllevando al desarrollo previo de una base de datos haplotípica y alélica de esos polimorfismos en más de 500 individuos de la población Española actual, y el inicio de la optimización de la técnica de MPS aplicada a muestras extremadamente degradadas.

Así, el estudio genealógico genético, a través de la publicación de seis artículos y de otras cinco investigaciones todavía no publicadas, permitió arrojar luz sobre la posible relación entre

el concepto de parentesco biológico entre individuos encontrados enterrados tanto en tumbas individuales, como múltiples. Aunque no se observó un patrón único, lo más frecuente es que aquellas personas enterradas en sepulturas individuales no estén emparentadas, independientemente del periodo histórico considerado. En lo que concierne a los enterramientos múltiples, la situación fue totalmente contraria. Se verificó que los inhumados simultáneamente están biológicamente emparentados, independientemente del período histórico. En cambio, en los enterramientos múltiples no simultáneos no se ha observado un único patrón, pudiéndose encontrar tanto individuos biológicamente emparentados, como sin ningún vínculo biológico.

A parte del estudio principal, hay ciertos aspectos a nivel metodológico, como poblacional, que son relevantes.

En relación a la metodología, se observó que las muestras que mejores resultados han proporcionado en individuos con un elevado estado de degradación, ha sido la porción petrosa y los dientes. Por su parte, sobre muestras frescas, se observa que la saliva ofrece mejores resultados que la sangre.

No se detectaron diferencias a la hora de estudiar individuos adultos o fetos/bebés/infantiles o jóvenes, ya que en todos ellos fue posible obtener información nuclear y de mtDNA, así como el sexo molecular. Efectivamente, no es la edad del individuo la que afecta a los resultados genéticos, sino el proceso de degradación *versus* conservación del material genético. Por otro lado, el empleo de marcadores de cromosoma X ha permitido solucionar casos de parentesco biológico, determinar el sexo de individuos cuando no se obtienen datos del gen de la amelogenina, así como, asociado al análisis de mtDNA, proponer el posible incesto en ciertos casos complejos de parentesco. Se ha confirmado también la elevada eficiencia forense de los polimorfismos X-InDel, a través de los valores obtenidos de PD y MEC, tanto para dúos como para tríos.

A nivel poblacional, se ha verificado que el linaje mitocondrial con una mayor representatividad en todos los periodos históricos estudiados ha sido el H. Con respecto al estudio sincrónico realizado, se observa que el mayor porcentaje de variabilidad genética siempre es mayor dentro de una misma población, permitiendo concluir que existiría un cierto grado de homogeneidad entre ellas. Finalmente, con respecto al análisis diacrónico, se observa que la mayor variabilidad genética se encuentra dentro de cada periodo histórico, existiendo una continuidad de los linajes mitocondriales a lo largo de las distintas épocas históricas.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **A**bstract

Although kinship relationships are a universal reality for all human beings, the concepts of "family" and "family bond" depend both on the geographic region and the historical moment to which it refers. On the other hand, the idea of "kinship" is considered a link between people, always linked to biological ties of consanguinity. If, on the one hand, the concepts of family and kinship can affect where and with whom an individual will be buried, reverse thinking is also possible. The place and the person with whom an individual is buried can inform us about the relationship between his/her and his/her descendants and concerning a community, with other individuals from the same necropolis, or even with those who are buried in the same tomb. Thus, funeral and burial rituals may represent a possible biological kinship parentage (or other types of social relationships).

To carry out kinship studies, both in forensic and archaeological contexts, the primary tool is the genetic analysis of DNA. The aim is to be able to relate or rule out possible biological relationships between the buried, whether they are buried in individual graves or in the same grave. Although there are records indicating a relationship, only the genetic study will make it possible to ascertain such information. Despite the indisputable usefulness of genetic analysis, DNA degradation is normally a factor present in kinship investigation, since this casuistry, both forensic and archaeological, is frequently associated with non-current cases. Indeed, the frequent advanced state of decomposition of these biological samples means that the concentration of the genetic material is very low (critical sample). For this reason, this thesis aimed to determine and optimize a set of new analysis techniques (DNA extraction, amplification and sequencing) trying to improve the analysis of critical samples.

In this way, the implementation of new analysis methodologies has been essential to carry out the main objective: the determination of biological relationships, studying critical samples from multiple burials, whether or not they were simultaneous. This methodology has consisted of the non-destructive extraction of DNA in bone or dental material, the association of BSA with an increase in MgCl₂ during mtDNA amplifications, the application for the first time of X-InDels to degraded samples, leading to the previous development of a haplotype and allelic database of these polymorphisms in more than 500 individuals from the current Spanish population, and the beginning of the optimization of the MPS technique applied to extremely degraded samples.

Thus, the genetic genealogical study, through the publication of six articles and five other investigations not yet published, shed light on the possible relationship between the concept of biological kinship between individuals found buried both in individual and multiple graves. Although no unique pattern was observed, the most common is that those buried in individual graves are not related, regardless of the historical period considered. About multiple burials, the

situation was the opposite. It was verified that those buried simultaneously are biologically related, regardless of the historical period. On the other hand, in non-simultaneous multiple burials, a single pattern has not been observed, being able to find both biologically related individuals, and without any biological link.

Apart from the main study, there are certain aspects at a methodological level, such as population, that are relevant.

In relation to the methodology, it was observed that the samples that have provided the best results in individuals with a high state of degradation have been petrous bone and teeth. On the other hand, on fresh samples, it is observed that saliva offers better results than blood.

No differences were detected when studying adult individuals or foetuses/babies/infants or young people, since in all of them it was possible to obtain nuclear and mtDNA information, as well as molecular sex. Indeed, it is not the age of the individual that affects the genetic results, but the degradation process *versus* conservation of the genetic material. On the other hand, the use of X chromosome markers has made it possible to solve cases of biological kinship, determine the sex of individuals when data on the amelogenin gene are not obtained, as well as, associated with the analysis of mtDNA, propose possible incest in certain complex kinship cases. The high forensic efficiency of the X-InDel polymorphisms has also been confirmed, with the values obtained from PD and MEC, both for duos and trios.

At the population level, it has been verified that the mitochondrial lineage with the highest representativeness in all the historical periods studied has been the H. Regarding the synchronous study carried out, it is observed that the highest percentage of genetic variability is always greater within the same population, allowing to conclude that there would be a certain degree of homogeneity between them. Finally, concerning the diachronic analysis, it is observed that the greatest genetic variability is found within each historical period, with a continuity of mitochondrial lineages throughout the different historical epochs.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **I**nroducción

1. Parentesco Biológico

El concepto de Familia y de Parentesco

Desde los inicios, se piensa que el ser humano siempre se ha organizado en grupos familiares (Maynes y Waltner, 2012). Si, por un lado, las relaciones de parentesco son una experiencia humana universal, por el otro, el concepto de “familia” y de “vínculo familiar” no son conceptos universales, ni en el espacio, ni en el tiempo (Johnson y Paul, 2016).

De acuerdo con Johnson y Paul (2016), la “familia” es una institución y construcción humana fundamental, que forma la unidad básica social de acción colectiva, más allá del individuo. Por otro lado, según Maynes y Waltner (2012), las “familias” son pequeños grupos formados por personas, ligadas por lazos de matrimonio reconocidos culturalmente, o formas similares de vida conyugal, descendientes, adoptados o no, que comparten un espacio común (doméstico) durante un período de tiempo concreto. Ese tiempo de residencia varía según las etapas del círculo familiar y según la sociedad en cuestión. Los lazos familiares no se rompen simplemente por el hecho de salir del espacio compartido por la familia, aunque las relaciones familiares sí pueden cambiar. Sin embargo, el hecho de habitar un mismo espacio no significa que pertenezcan a una misma “familia” (Maynes y Waltner, 2012).

Por otro lado, “parentesco”, *kinship* en inglés, es considerado un vínculo entre personas, casi siempre ligado a lazos biológicos de consanguinidad, ampliándose cuando hace referencia a hijo/as adoptado/as. Por ejemplo, un individuo infantil dado en adopción tras su nacimiento tiene una relación de parentesco (biológico) con su progenitora (madre-hijo/a), pero no existe entre los dos una relación familiar.

En diversas sociedades, el concepto de parentesco se ve restringido a los parientes de sangre más cercanos al individuo, tales como madre, padre, hermanos, abuelos, tíos y primos, con quien se sigue manteniendo un contacto estable a lo largo del tiempo. Por su parte, el concepto de familia se extiende a un número variable de individuos, pudiendo hasta incluir vecinos con un vínculo especial (Maynes y Waltner, 2012; Johnson y Paul, 2016).

2. Familia, parentesco y ritual funerario

Si por un lado el concepto de familia y parentesco puede afectar al dónde y con quién un individuo será enterrado, el pensamiento inverso, según Harper y Tung (2012), es también posible. En efecto, dónde y con quién está enterrado un individuo puede informarnos acerca del estado de parentesco y del de sus descendientes (tanto biológicos como no-biológicos) en

relación con una comunidad, a otros individuos de la misma necrópolis, o incluso a los que están enterrados en la misma tumba. Así, los rituales funerarios y de enterramiento pueden representar una posible filiación de parentesco biológico (u otros tipos de relaciones sociales), resaltando los beneficios y responsabilidades, como la “*herencia de tierras o animales y la obligación de cuidar adecuadamente de ellos*” (Harper y Tung, 2012). Según Harper y Tung (2012), los ritos funerarios funcionan como una identidad tanto de la persona que entierra, como del individuo fallecido. El estudio de las ceremonias fúnebres está basado fundamentalmente en registros escritos, donde esa práctica se describe de acuerdo con la tradición familiar y/o de la sociedad.

En sociedades prehistóricas, tales como las neolíticas o las de la Edad del Bronce, entre otras, el estudio del ritual funerario, el tipo de enterramiento o incineración y los posibles parentescos entre los individuos se centran en regiones geográficas concretas, dada la falta de información escrita que permitiría determinar si cierto procedimiento era común a varias localidades o típico de una comunidad en concreto. En la mayoría de los casos, estos estudios son realizados por equipos especializados de arqueólogos y antropólogos (Stojanowski y Schillaci, 2006), que, a través de distintos objetos encontrados y tipologías de enterramiento, van abordando diversas cuestiones relacionadas con posibles redes de parentesco (Alt y Vach 1995, 1998; Stojanowski y Schillaci, 2006). Subyacente a estos análisis está la idea de aumentar la comprensión de la organización social, ya que puede ayudar a aclarar también las divisiones sociales y las relaciones internas y externas de las personas que poblaron un territorio en concreto (Gibaja, 2003, 2004; Harper y Tung, 2012, Gibaja et al., 2018). Si por un lado es posible que dos individuos enterrados juntos pertenezcan a la misma familia, también es posible que entre ellos no exista ningún tipo de parentesco biológico.

Los estudios moleculares, más específicamente los análisis genéticos de **DNA** (sigla internacional para ácido desoxirribonucleico, “*DeoxyriboNucleic Acid*”), se emplean con el objetivo de identificar las relaciones de parentesco dentro de una mismo territorio o necrópolis (Keyser-Tracqui, et al., 2003, Le Roy et al., 2016), ya que los indicadores morfológicos de parentescos, tales como semejanzas craneales, dentales, etc., son menos precisos que los datos genéticos. Por otro lado, solamente el estudio genético de una población permitirá determinar que dos o más individuos no están biológicamente relacionados, aunque existan registros, tanto escritos como de tradición oral, que indiquen un posible parentesco entre ellos. El estudio de una fosa común, donde el estudio genético indique total ausencia de parentesco cercano o de cualquier tipo de linaje biológico común entre los individuos enterrados, abre indudablemente otras vías de investigación. Hipótesis como guerras y conflictos, enfermedades o una estructura o área donde se enterraban personas no identificadas, son ejemplos de casos donde, en principio, el análisis de DNA sería útil para confirmar la ausencia o no de relaciones biológicas entre los inhumados.

3. Análisis genético de DNA

Dentro del núcleo de cada célula humana existe una molécula que contiene toda la información necesaria para el desarrollo y mantenimiento del ser humano – el DNA (Tamarin, 1998, Butler, 2005, Griffiths, et al., 2005). En general, el DNA nuclear tiene dos funciones principales: 1) replicarse, permitiendo la multiplicación y división celular, y 2) guardar las instrucciones para la síntesis proteica y otras estructuras celulares (Butler, 2005).

Tanto en casos arqueológicos, como de índole forense, el estudio genético se centra casi siempre en la identificación del donante de la muestra biológica o en la determinación de su procedencia biogeográfica, en describir su fenotipo externo, y en relacionar dos o más muestras. Así, en cada análisis se caracteriza un conjunto de polimorfismos de DNA, también denominados **marcadores genéticos**, localizados casi siempre en *loci* (lugares físicos) no codificantes del genoma humano (Butler, 2005; Pinheiro, 2010). Por otro lado, cada variante dentro de un mismo marcador genético se denomina **alelo** (Butler, 2005). Prácticamente en todos los estudios genéticos, el objetivo es la obtención del **perfil genético** del individuo. Éste podría definirse como un conjunto de características heredables (alelos), para un determinado número de marcadores genéticos, detectable en cualquier muestra que le pertenezca. O sea, para el mismo conjunto de marcadores genéticos, una muestra de sangre y de tejido pulmonar de un mismo individuo, deberán presentar la misma información genética.

A continuación se explican los polimorfismos de DNA más utilizados en el análisis e investigación de parentescos biológicos.

3.1 Marcadores genéticos aplicados al estudio de relaciones familiares

3.1.1 DNA nuclear

El DNA nuclear (nuDNA) presente en todas las células vivas humanas nucleadas se organiza en cromosomas, donde se encuentra altamente compactado y protegido por proteínas denominadas histonas. Se divide en DNA autosómico (auDNA), con 22 pares de cromosomas, y DNA heterosómico, compuesto por dos cromosomas X (en las mujeres), o por un cromosoma X y un cromosoma Y (en los varones). Por otro lado, no todo el DNA pasa por procesos de recombinación, pudiéndose dividir en marcadores nucleares recombinantes (auDNA y cromosoma X) y marcadores nucleares no – recombinantes (cromosoma Y) (Pinheiro, 2010, Crespillo-Márquez y Barrio, 2019).

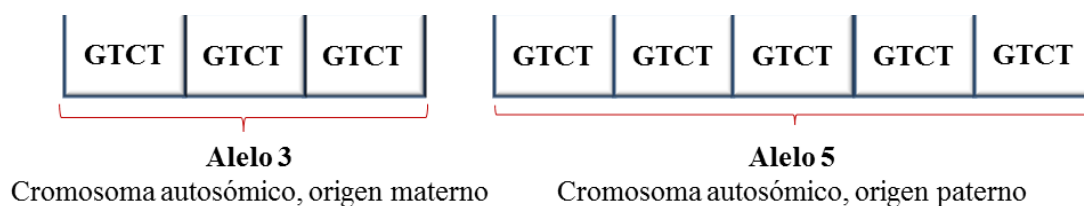
Tipos de marcadores genéticos más frecuentes

➤ Marcadores *Short Tandem Repeats* (STR)

Los polimorfismos STR consisten en pequeñas secuencias de DNA, con una longitud inferior a 350bp (pares de bases) (Butler, 2005; Goodwin, et al., 2007; Pinheiro, 2010), que ocupan cerca del 3% de todo el genoma humano. Son muy utilizados en genética forense, ya que su información se obtiene fácilmente con una simple amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Butler, 2005). Son altamente polimórficos, o sea, muestran un elevado número de distintos alelos por marcador genético, siendo por eso efectivos a la hora de identificar individuos (Butler, 2005; Goodwin, et al., 2007, Crespillo-Márquez y Barrio, 2019).

Los STRs tienen una región repetitiva o unidad de repetición (**figura 1**), entre 2 y 6bp de longitud (Goodwin, et al., 2007), que se repiten en *tandem*. Entre los distintos tipos de STRs, los tetranucleotídicos son los más frecuentes en el genoma humano, siendo los más utilizados para fines forenses, tanto a la hora de analizar auDNA, cromosoma X o cromosoma Y. En los STRs, los alelos corresponden al número de repeticiones presentes en ese *locus*, para ambos cromosomas homólogos, materno y paterno (**figura 1**).

Figura 1. Representación esquemática de un marcador de tipo STR (“Short Tandem Repeat”). En la figura, la unidad repetida correspondiente a un determinado marcador genético en *tandem* es “GTCT” (en otro marcador la unidad repetida será diferente y característica de ese marcador). El alelo materno es el 3 y el paterno el 5, por lo que, para el marcador genético considerado, el perfil genético del individuo es 3-5. (*Imagen de elaboración propia*).



➤ Marcadores bi-alélicos

➤ *Single Nucleotide Polimorphisms* (SNP)

El tipo de polimorfismo más simple es el SNP, con una única diferencia en la secuencia de DNA (**figura 2**) (Butler, 2005; Goodwin et al., 2007). Según Goodwin y colaboradores (2007), una de las explicaciones más aceptada para la formación de un SNP es la aparición de mutaciones durante la replicación del DNA en la meiosis.

Exceptuando el análisis de DNA mitocondrial, los SNPs no son la herramienta más utilizada en genética forense. Efectivamente, los SNPs tienen en su mayoría solo dos alternativas o alelos por *locus*, por ejemplo, Guanina (G) o Adenina (A), Timina (T) o una Citosina (C), no siendo por eso muy polimórficos (Butler, 2005; Goodwin et al., 2007). Así, para un marcador genético hipotético cuyos alelos pueden ser A y G, los genotipos para un individuo serían solamente AA; GG; o AG. Sin, embargo, tienen la ventaja de estar relacionadas con el pequeño tamaño de los productos amplificados en la reacción de PCR – inferiores a 100bp. Por un lado, pueden ser mejor detectados en muestras en avanzado estado de descomposición; se pueden analizar en “multiplex”; la automatización del análisis en el laboratorio no es complicada; y, por último, no tienen artefactos inespecíficos o *stutters* asociados (Butler, 2005).

Figura 2. Representación esquemática de un marcador SNP. Para una misma región estudiada, se observa una única diferencia entre las dos secuencias. En el caso materno, el alelo T, en el caso paterno, el alelo C. (*Imagen de elaboración propia*).



➔ *Insertion-Deletion (InDel)*

Los polimorfismos *InDel* son secuencias de DNA localizadas en cromosomas autosómicos, en cromosoma X o Y, caracterizadas por la inserción o por la deleción, de uno o más nucleótidos (**figura 3**) (Butler, 2005; Pereira et al., 2011). Cuando el alelo es la deleción, el genotipo se representa por “S” (*short*) o “1”, cuando el alelo es la inserción, se representa por “L” (*long*) o “2”. Después de los SNPs, los *InDels* son los polimorfismos más abundantes en el genoma humano.

El estudio de este tipo de marcadores genéticos se ha incrementado a lo largo de los años. En 2002 Weber y colaboradores describieron aproximadamente 2000 polimorfismos de tipo *InDel*, capaces de discriminar cuatro grupos poblacionales humanos (europeos, africanos, japoneses y nativos americanos) (Weber, et al., 2002; Pereira, et al, 2012).

Figura 3. Representación esquemática de un polimorfismo de tipo *InDel*. En el cromosoma materno, el polimorfismo es la ausencia de nucleótido (“Delección”); en el cromosoma paterno, para el mismo marcador genético, el polimorfismo es la “inserción” de una Timina. El perfil genético para ese individuo, para ese marcador genético sería 1-2, siendo el “1” la delección, y el “2” la inserción. (*Imagen de elaboración propia*).



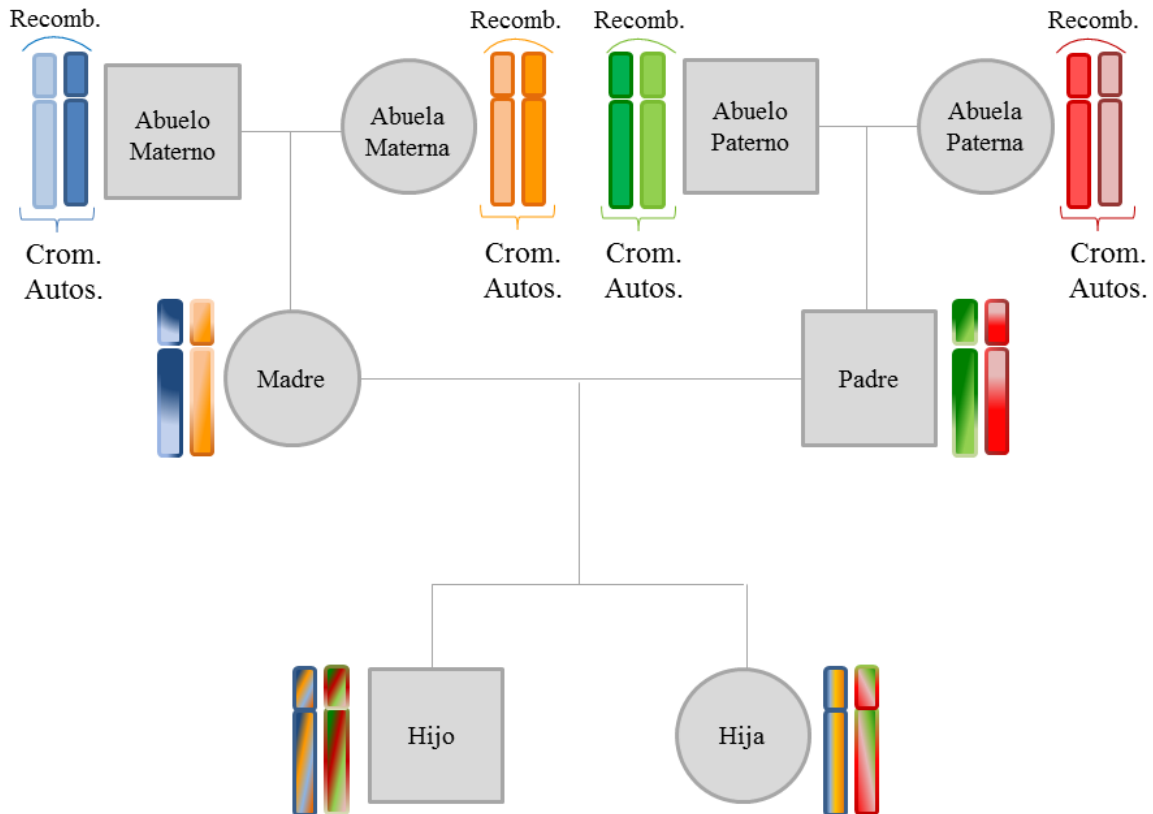
3.1.1.1 Marcadores nucleares recombinantes: cromosomas autosómicos

Transmisión de marcadores situados en cromosomas autosómicos

Tanto el padre como la madre transmiten a todos sus descendientes, hijos e hijas, un cromosoma de cada par homólogo autosómico. Es decir, cada descendiente recibe 22 cromosomas autosómicos vía paterna y otros 22 homólogos vía materna. Esta copia que cada descendiente recibe podrá ser o no el resultado de una recombinación entre los cromosomas autosómicos del padre y de la madre respectivamente (**figura 4**).

Teniendo en cuenta la transmisión de información autosómica, se considera una incompatibilidad mendeliana cuando la información presente en la descendencia no coincide con la información parental. Por ejemplo, para un hipotético marcador autosómico, si el padre tiene los alelos (1-2) y la madre (3-3), se espera que la descendencia tenga como posibles genotipos las combinaciones de alelos (1-3) o (2-3). Si uno de los descendientes exhibe el genotipo (3-6), el alelo “6” es considerado una inconsistencia, ya que no está presente en la información genética parental. En general se utiliza el modelo “*stepwise mutation*” (Kimura y Ohta, 1978) para considerar la existencia de mutación, cuando los alelos de los descendientes expresan una unidad de repetición menos (-1) o una de más (+1), en el caso de los STRs, respecto a los alelos parentales. Aunque también existen casos de ± 2 o ± 3 . Por otro lado, utilizando el mismo ejemplo, si uno de los descendientes expresa el genotipo (1-1), se podrá pensar también en la hipótesis del “*silent allele*”, un alelo recesivo, tradicionalmente denominado raro, cuya frecuencia es inferior al 1% en la población (Amorim y Carneiro, 2008). En este caso, la madre para ese marcador no será homocigota; es decir, no presentará la misma información alélica para un *locus*, 3-3, si no que su genotipo será 3-*s*, siendo *s* el *silent allele*. En ese caso, el descendiente hereda por vía materna el alelo *s*, siendo su genotipo (1-*s*), aunque en el perfil genético se detecta solamente el alelo **1**.

Figura 4. Modo de transmisión de cromosomas autosómicos. Tanto por vía masculina como por vía femenina, los cromosomas autosómicos se transmiten a todos sus descendientes, pudiendo ocurrir fenómenos de recombinación (“Recomb”). ■ - Hombre; ● - Mujer. (Imagen de elaboración propia).



En genética forense, debido al poder de discriminación de los STRs, el análisis de STRs autosómicos independientes se ha convertido en el estudio más frecuente, siendo la herramienta más utilizada tanto en identificaciones, como en investigaciones de parentesco (Bobillo et al., 2007).

3.1.1.2 Marcadores Nucleares recombinantes: cromosoma X

El modo de transmisión específico del cromosoma X, distinto de todos los otros cromosomas humanos (Szibor, 2007), es lo que motiva su utilización e interés, tanto a nivel poblacional como en cuestiones forenses complejas.

En células femeninas somáticas o no gaméticas, existe un par de cromosomas X que puede recombinarse tal como lo hacen los cromosomas autosómicos. Sin embargo, cuando nos referimos a una célula masculina, el cromosoma X no tiene otro cromosoma homólogo. En estas células, el par de cromosomas sexuales está formado por un cromosoma X y por un cromosoma

Y, observándose recombinación (obligatoria) solamente en una pequeña porción de los dos cromosomas: la región PAR (*Pseudo-Autosomal Region*) 1, situada en una de las zonas teloméricas de los cromosomas. Sin embargo, no existe ningún marcador genético incorporado en *kits* comerciales para genética forense localizado en PAR1. Así, a efectos de estudios forenses, se considera que entre el cromosoma X y el cromosoma Y no existe recombinación.

Transmisión del cromosoma X

Un padre trasmite a todas sus hijas una copia íntegra de su cromosoma X, sin recombinación. Por otro lado, una madre transmitirá a todos sus descendientes una copia de uno de sus cromosomas X, pudiendo existir recombinación entre sus cromosomas X homólogos (**figura 5**).

Para simplificar, se presenta la transmisión de la información materna con recombinación, pero sin considerar la posibilidad de mutación. En el cromosoma X, igual que en los cromosomas autosómicos, pueden existir eventos mutacionales, aunque es un cromosoma bastante estable, con una baja tasa de mutación. En casos de una posible “paternidad” y/o “maternidad”, analizando marcadores de cromosoma X, donde exista una incompatibilidad mendeliana y se pueda descartar la mutación, también se deberá considerar la posibilidad del “*silent allele*”.

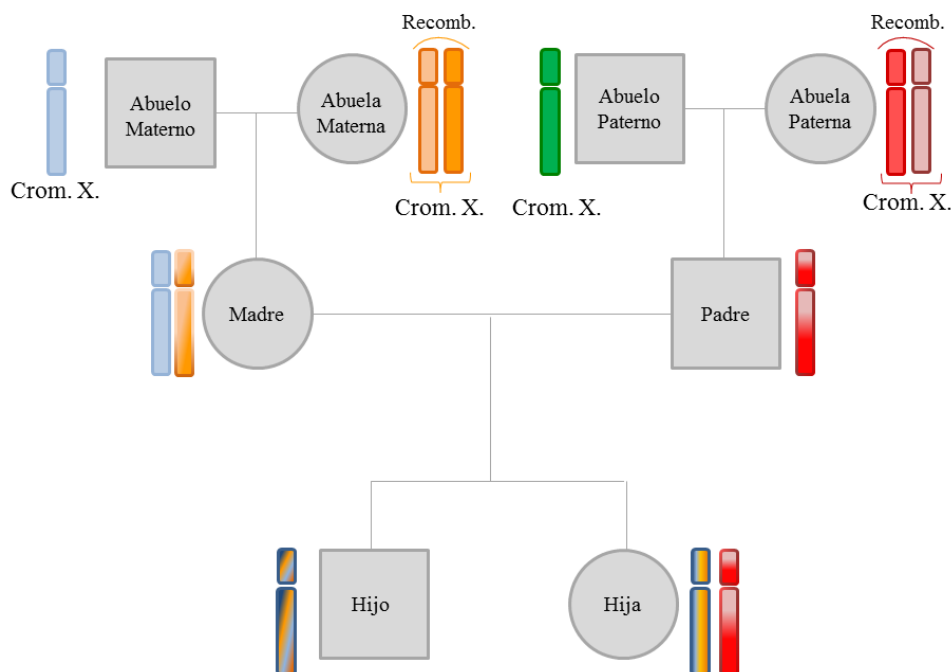
➤ Aplicaciones del estudio del cromosoma X

Aunque la transmisión de marcadores autosómicos es bastante informativa, utilizar este análisis puede no servir para mucho, teniendo en cuenta que dos hermanos pueden no compartir ninguna información genética para algún marcador. Consecuentemente, hay algunos casos del ámbito forense donde el estudio de marcadores autosómicos no es informativo, ya que no se obtienen criterios sólidos para tomar una decisión acerca de la existencia o no de filiación biológica (Szibor, 2007; Gomes et al, 2011, 2012, Crespillo-Márquez y Barrio, 2019). En los casos que aparecen a continuación, es necesario recurrir a otro tipo de marcadores como por ejemplo los marcadores del cromosoma X:

- a) Relaciones de parentesco, cuyo poder de discriminación de los marcadores autosómicos es nulo. Por ejemplo, casos de investigación de los parentescos biológicos medio hermana-paterna y abuela paterna – nieta (Gomes et al, 2011, 2012);

- b) Pruebas de paternidad donde el presunto padre es pariente del verdadero padre. Sería el caso, por ejemplo, de un presunto padre que, en realidad, es el abuelo o el tío paterno (Gomes et al, 2011, 2012).

Figura 5. Modo de transmisión del cromosoma X. En la figura se puede verificar la transmisión del cromosoma X de madre para sus hijos e hijas, pudiendo haber ocurrido recombinación (“Recomb”). También se verifica la transmisión de la copia del cromosoma X paterna, únicamente para su descendencia femenina, sin cualquier evento de recombinación. ■ - Hombre; ● - Mujer. (Imagen de elaboración propia).



3.1.1.3 Marcadores nucleares no recombinantes

El concepto de haplotipo y de haplogrupo

Tanto en el caso del cromosoma Y como del mtDNA, al conjunto de polimorfismos heredados a lo largo de un mismo linaje, paterno o materno, respectivamente, se denomina **haplotipo**. En cuanto al concepto de **haplogrupo**, éste está directamente relacionado con el análisis biogeográfico del individuo, sea por vía paterna o materna, englobando determinados haplotipos con una elevada frecuencia en determinadas regiones geográficas.

Marcadores nucleares no recombinantes: Cromosoma Y

Siendo el tercer cromosoma humano más pequeño (Butler, 2005), el cromosoma Y está dividido en dos partes fundamentales: en el 5% del cromosoma están las regiones pseudoautosómicas (PAR), mientras que en el 95% restante se encuentra la no recombinante. En esta región específica del cromosoma Y, Skaletsky et al (2003) describió un elevado porcentaje de auto-recombinación donde se encuentra el gen SRY (Butler, 2005; Skaletsky, et al., 2003), específico de individuos del sexo masculino.

➤ Polimorfismos presentes en el cromosoma Y

En estudios de linaje u otros peritajes que emplean información del cromosoma Y, es frecuente analizar polimorfismos tanto bi-alélicos, como STRs, localizados en la región no recombinante. Los polimorfismos bi-alélicos más utilizados son los Y-SNPs, que permiten establecer el origen biogeográfico paterno más probable, a través de la determinación de un haplogrupo. Teniendo en cuenta su baja tasa de mutación, estos polimorfismos son más adecuados para estudios de poblaciones más antiguas. Por otro lado, los Y-STR, debido a su tasa de mutación más elevada, presentan una diversidad poblacional superior, siendo más adecuados para estudiar eventos poblacionales recientes y para detectar diferencias poblacionales a una escala microgeográfica (Pinheiro, 2010).

Dentro de los Y-STRs, se destaca un conjunto de marcadores cuya tasa de mutación se sitúa entre $1,19 \times 10^{-2}$ – $7,73 \times 10^{-2}$, denominados *Rapidly Mutating STRs*, o RM-Y-STRs (Ballantyne et al., 2012). Se ha observado que, debido a su elevada tasa de mutación, estos marcadores permiten distinguir entre individuos del mismo linaje paterno. Cuanto más lejano es el parentesco, mayor es la probabilidad de discriminación entre los individuos (Ballantyne et al., 2012, Kayser, 2017), ya que les separan más generaciones y, por lo tanto, es mayor la probabilidad de mutación.

➤ Aplicaciones del estudio del cromosoma Y: la herencia paterna del cromosoma Y

Teniendo en cuenta que los haplotipos de cromosoma Y se comparten entre individuos pertenecientes al mismo linaje paterno, tiene mayor utilidad en los casos donde existe una investigación con un número de individuos involucrados limitado y previamente conocido, como por ejemplo, un accidente de coche con un número de pasajeros determinado. Así, el estudio de Y-STR puede ser adecuado para resolver cuestiones de paternidad con hijos varones

u otros tipos de parentesco paterno, por ejemplo, abuelo paterno – nieto, o también para la búsqueda de parientes por vía paterna desaparecidos. También es pertinente para los casos de identificación masculina de familiares masculinos de grado muy lejano (Kayser, 2017).

Kayser (2017) afirma que en casos donde el presunto padre no está presente para realizar una prueba de filiación, un pariente suyo podría ser utilizado como referencia indirecta para confirmar si pertenece a la familia paterna. Los Y-STR con tasas de mutación bajas (1 mutación cada 1000 generaciones, por cada *locus*) (Goedbloed, et al. 2009, Kayser, 2017) son útiles para incluir o excluir un individuo a un linaje paterno específico. Sin embargo, los RM-Y-STR, caracterizados por sus tasas de mutación superiores (Ballantyne, et al. 2012), no son apropiados para los análisis de paternidad u otros parentescos, siendo más útiles para distinguir individuos dentro del mismo linaje paterno. De acuerdo con Kayser (2017), se detectará un número superior de mutaciones entre parientes más lejanos (por ejemplo, bisabuelo paterno –bisnieto), que entre padre-hijo.

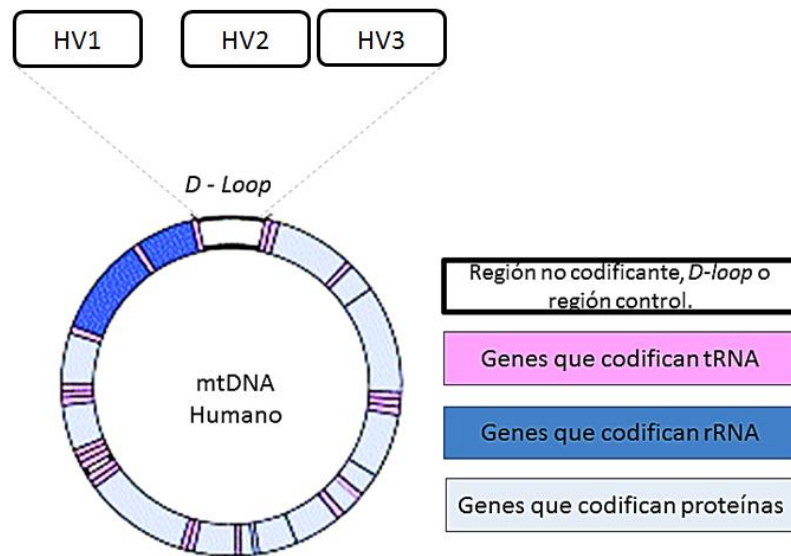
3.1.2 DNA no nuclear: DNA mitocondrial

Fuera del núcleo celular, en el citoplasma, está un orgánulo con un genoma propio y extra-cromosómico: la mitocondria. El DNA mitocondrial (mtDNA) humano es un genoma circular, con aproximadamente 16,5 kb. Este genoma no sufre procesos de recombinación y, dependiendo del tejido, se pueden encontrar varias mitocondrias por célula y, consecuentemente, muchas copias de mtDNA, ya que una mitocondria puede tener cientos de copias del genoma mitocondrial (Budowle, 2000).

En la **figura 6** se representa la estructura de una molécula de mtDNA, diferenciando la molécula en la región codificante y no codificante, también denominada *D-loop*, o región control. Dado que la región *D-loop* es no-codificante, existe una mayor variabilidad y los polimorfismos entre individuos son más abundantes que en otra zona del mismo tamaño en la región codificante (Arroyo-Pardo et al, 2017). Por este motivo, los estudios en genética forense se centran en esta zona, específicamente en tres regiones del *D-loop*: región hipervariable 1 (HV1, HVI, o HVS-I), 2 (HV2, HVII, o HVS-II) y 3 (HV3, HVIII, o HVS-III)

Figura 6. Representación esquemática de la estructura de una molécula de mtDNA, representando las dos regiones más estudiadas en genética forense (HV1, HV2 y HV3).

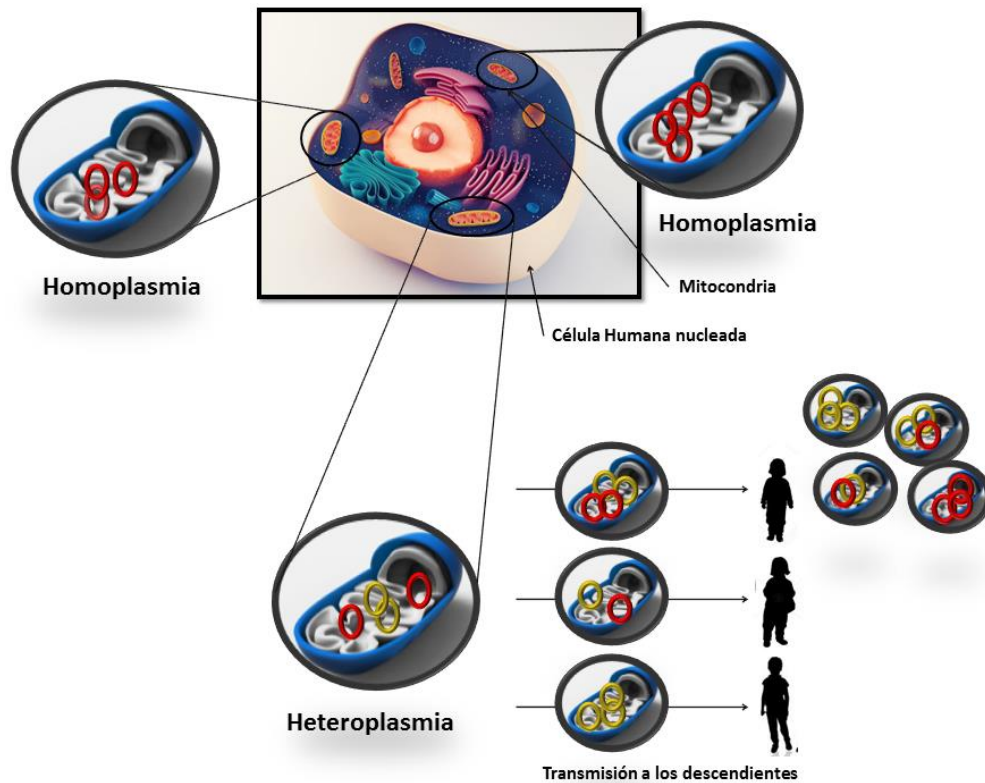
Fuente de la imagen: Hagelberg, et al., 2003



Heteroplasmia

Una **heteroplasmia** ocurre cuando en un determinado individuo, en un tejido, órgano o célula, se identifican distintos genomas mitocondriales (**figura 7**). En contraposición, se denomina **homoplasmia** a la presencia de un único tipo de mtDNA (Fernández, 2005) (**figura 7**). La heteroplasmia en el mtDNA puede deberse a errores en su replicación o como consecuencia del daño causado por radicales libres producto del metabolismo oxidativo. El caso de la heteroplasmia es muy importante cuando afecta a las moléculas de mtDNA del oocito, pudiéndose transmitir a la descendencia. En este caso, los descendientes manifestarán niveles distintos de heteroplasmia debido a la segregación aleatoria de las mitocondrias durante la formación de los gametos (Fernández, 2005). El individuo descendiente podrá presentar inicialmente una mezcla de moléculas originales y mutantes. El polimorfismo mutante se establecerá si la mutación se transmite a los descendientes, adquiriendo la homoplasmia a nivel individual, fijándose en algún momento en la población (Fernández, 2005). Deberá tenerse un cuidado especial a la hora de analizar posibles heteroplasmias, ya que la presencia de dobles picos en la secuencia analizada puede también ser sinónimo de contaminación de la secuencia con mtDNA exógeno.

Figura 7. Representación gráfica de la presencia de heteroplasmia y homoplasmia en una célula humana nucleada. (Esquema de elaboración propia a partir de fotos tomadas de *BIGSTOCK*).



Aplicaciones del estudio del mtDNA: la herencia materna del mtDNA

Para los propósitos de identificación, se considera que el mtDNA humano está estrictamente heredado por vía materna. En la concepción del nuevo individuo, solamente la cabeza del espermatozoide se introduce en el oocito. Las mitocondrias paternas no entran por encontrarse en el cuello del espermatozoide. Así, son las mitocondrias maternas y su respectivo mtDNA las que se transmitirán a toda la descendencia, tanto a hijo(s) como a hija(s) (Budowle, 2000). Teniendo en cuenta su transmisión a lo largo de generaciones sin alteraciones moleculares significativas (marcador de linaje), y por estar asociado a bajas tasas de mutación en la línea germinal femenina, el mtDNA es frecuentemente utilizado en distintas situaciones tanto de índole forense, como arqueológica. Efectivamente, en la investigación de personas desaparecidas, en desastres masivos o en la identificación de individuos encontrados en fosas múltiples, teniendo escenarios cerrados (número de desaparecidos conocido y determinado con anterioridad a la situación en estudio), la utilización del mtDNA puede ser muy útil para

determinar parientes tanto masculinos como femeninos, no siendo necesario que el grado de parentesco sea directo. Efectivamente, el haplotipo mitocondrial es el mismo, tanto si se considera madre-hijo, como primos segundos por vía materna. Por otro lado, la elevada concentración del mtDNA en las células humanas permite que, incluso décadas o siglos después de la muerte del individuo, sea posible analizar y determinar un posible linaje materno. No obstante, sabiendo que todo el linaje materno comparte el mismo haplotipo mitocondrial, el poder de discriminación en aplicaciones forenses es bastante reducido (Budowle, 2000). Es decir, existe una probabilidad relativamente elevada de que dos individuos que no sean parientes cercanos compartan el mismo DNA mitocondrial. Por eso, no es posible a través del análisis del mtDNA determinar el grado de parentesco entre dos individuos de la misma familia materna. Por ejemplo, no se puede distinguir la abuela materna de la nieta, de tía materna o de la sobrina, ya que todos estos individuos comparten el mismo haplotipo mitocondrial.

Por otro lado, el estudio de mtDNA permite también la determinación del origen biogeográfico materno más probable, siendo posible a través del estudio de haplogrupos. Así, un haplogrupo mitocondrial consiste en la agrupación de haplotipos que comparten mutaciones diagnósticas, con un origen común (Fernández, 2005). Así, un haplogrupo reúne un conjunto de secuencias que proceden de una única molécula ancestral, de la que pueden surgir nuevos haplogrupos por mutación (Gamba, 2011). La determinación de haplogrupos, con una posible asignación geográfica, se realiza mediante el estudio de la región *D-loop* mitocondrial, confirmándolo con otro tipo de polimorfismos como los mt-SNPs.

3.2 Estudios genéticos de interés histórico, antropológico y arqueológico

Existe un amplio abanico de preguntas de índole histórica, antropológica y arqueológica que un análisis de DNA puede ayudar a resolver. Son ejemplo de ello el estudio filogenético de plantas, la investigación sobre el origen biogeográfico y los movimientos poblacionales, la determinación del sexo molecular de individuos adultos e infantiles (Mulligan, 2006), o las relaciones familiares entre individuos inhumados juntos o separados.

De acuerdo con Johnson y Paul (2016), los estudios arqueológicos de parentesco reflejan el creciente interés por entender a lo largo de la Historia qué significa el concepto de “*familia*” y si el ser humano ha seguido los mismos rituales y conceptos. Según estos autores, existe un “encanto” con los antiguos “enterramientos familiares”, ya que la imagen de un (pequeño) grupo de individuos, inhumados e interpretados como una “familia”, capta de inmediato la atención de la sociedad actual, como consecuencia de la empatía y el comportamiento similar entre sociedades separadas en el tiempo. Por otro lado, en casos de soldados cuya identificación

no era conocida, dado el tiempo pasado después de sus muertes, o de víctimas de crímenes de guerra y torturas, la aplicación del análisis de DNA adquiere un papel protagonista (Hummel, 2003, Zupanič Pajnič et al., 2016; Friš et al., 2019, Gomes et al., 2019, Obal et al., 2019; Palomo-Díez et al., 2019, Marshall et al., 2020).

A nivel histórico, son numerosos los casos donde la utilidad de la investigación genética ha sido reconocida. Por poner algunos ejemplos, el caso de Abraham Lincoln (McKusick, 1991), el del presunto hijo esclavo de Thomas Jefferson (Foster et al., 1998), el del análisis de los supuestos restos humanos de Jesse James (Stone et al., 2001), el del presunto hijo de Luis XVI de Francia, o el de Luis XVII de Francia (Jehaes et al., 1998). Una de las aportaciones más publicitadas del análisis genético en estado particularmente degradado, han sido las investigaciones en las que se analizaron e identificaron los cadáveres de la familia real rusa Romanov, encontrados en una fosa común (Gill et al., 1994, Gilgenkrantz, 2009).

Por último, es también de sumo interés el estudio de DNA y su aportación a una hipótesis familiar, incluso cuando esta pueda parecer inexistente. Por ejemplo, una mujer fallece con 20 años de edad, dejando un hijo recién nacido. Este individuo fallece 50 años después, siendo enterrado junto a su madre. Desde el punto de vista antropológico, se puede determinar que los enterramientos no han sido simultáneos. Además, se puede saber también que el varón tendría una edad superior a la de la mujer a la hora de su muerte. A nivel social, no habiendo ningún tipo de registro escrito u oral, podría pensarse que los dos no estuviesen relacionados, dada la discrepancia de edades, o que incluso que el hombre fuera el padre de la mujer. El análisis genético sin información *a priori*, por ejemplo, sin acceso a edades o aspectos de degradación morfológicos de los cadáveres, permitiría verificar o al menos proponer todas las anteriores hipótesis de parentesco, incluyendo la de la maternidad. Se necesitaría de esa información para no conducir a equívocos.

3.3 Estudios genéticos de interés forense

De acuerdo con Pinto et al., (2009), prácticamente “*todo lo que la genética forense hace es una evaluación de parentesco*”. Desde la identidad hasta las genealogías muy complejas, lo que se solicita al perito es evaluar el grado de probabilidad de la relación genética entre muestras y/o individuos. En términos generales, en genética forense se determina siempre dicho grado de parentesco entre muestras y/o individuos, quedando el término “familia” prácticamente excluido del léxico genético. De este modo, por definición, dos individuos están emparentados, si entre ellos comparten por lo menos un alelo idéntico por descendencia (alelo *Identical By Descent* o IBD) (Pinto et al., 2009, 2011), siendo que, por ejemplo, en casos de incesto podrán compartir más de uno.

El estudio de parentesco (en inglés *kinship analysis*), entre dos o más individuos, se centra primordialmente en:

- 1) identificar, por lo menos, a uno de ellos (fallecido o no). Por ejemplo, en un accidente de coche donde uno de los individuos no se puede identificar ni por huellas dactilares, ni por registro odontológico;
- 2) determinar una relación de parentesco concreta (por ejemplo, paternidad, maternidad, hermandad, entre otras);
- 3) evaluar los efectos de custodia legal de menores de edad, por ejemplo, en casos de migraciones (ilegales) (Maguire y Woodward, 2008), o posibles adopciones ilegales (Crespillo-Márquez et al., 2016)

Los puntos 1) y 2) son, en general, los más frecuentes en un laboratorio forense; y el punto 2, en un contexto arqueológico y/o histórico.

3.3.1 Determinación de parentescos biológicos para la identificación de individuos.

Este estudio comprende diferentes ámbitos de actuación, teniendo como rasgo común el hecho de utilizar muestras de parientes, legalmente reconocidos, como principio de referencia. Según el Protocolo de Interpol (INTERPOL, 2009), diseñado para investigaciones forenses, las muestras deberán ser recogidas preferencialmente de ascendentes vivos directos, como el padre y la madre del individuo en cuestión. Así, esta identificación puede ser útil en casos de:

- a) cuerpos no identificados, previamente dados como desaparecidos (Álvarez – Cubero et al., 2012; Parsons et al., 2019).
- b) cadáveres o restos cadavéricos no identificados en una escena del crimen;
- c) cadáveres o restos cadavéricos procedentes de fosas comunes (Parsons et al., 2019), como los análisis genéticos de los fallecidos en la Guerra Civil Española (1936-1939) (por ejemplo, Cardoso et al., 2008; Baeta et al., 2015, 2019; Palomo-Díez, et al, 2019; Gomes, et al., 2019), o las identificaciones de los fallecidos en el genocidio de Srebrenica (1995, Bosnia y Herzegovina) (Haines y Toom, 2014);
- d) cadáveres o restos cadavéricos resultantes de atentados terroristas, accidentes civiles o desastres naturales. Este sería el caso de las identificaciones llevadas a cabo en 2001 tras

el atentado en Nueva York, en el World Trade Center (Septiembre 2001, Estados Unidos de América) (Biesecker et al., 2005), o en 2004, en los atentados perpetrados en la estación de tren de Atocha-Renfe (Marzo 2004, España) (Prieto et al., 2007; Phillips et al., 2009). Respecto a los casos de accidentes civiles, podemos citar los accidentes de avión en la isla de Spitsbergen (1996, Noruega) (Olaisen et al., 1997), o del accidente de tren en Santiago de Compostela (2013, España). Finalmente, son ejemplo de estudios de muertos por causas naturales, el terremoto–tsunami de Sumatra-Andamán en el Océano Pacífico (26 diciembre 2004, Océano Pacífico) (Lessig et al., 2006), o el huracán Katrina (2005, Estados Unidos de América) (Donkervoort et al., 2008).

e) identificación de un pariente biológico no cercano, para efectos de cotejo con una muestra asociada a, por ejemplo, un delito o desaparición de una persona. En este caso, la policía solicita una muestra biológica en una población concreta y cerrada, con el objetivo de encontrar semejanzas entre los perfiles genéticos de(l) (los) voluntario(s) y de(l) (los) sospechoso(s). Esta información permite dirigir la investigación, centrándose ahora en familiares de individuos concretos. Sin embargo, como se explica a continuación, este procedimiento no reúne el consenso general, principalmente cuando el acceso a las muestras de los familiares no incluye previamente un consentimiento informado por parte del familiar que concede su muestra para la investigación judicial. Recientemente, la búsqueda del propio origen biogeográfico ha llevado a muchas personas a enviar muestras biológicas (casi siempre de saliva) a distintas empresas on-line de análisis genético para la construcción de su árbol genealógico. A cambio del resultado, el individuo deja su muestra biológica en un banco de datos propio de cada empresa de genealogía. En abril de 2018, la policía de California (Estados Unidos de América) puso finalmente nombre al “asesino de Golden State”, deteniendo a un individuo por 12 asesinatos y 51 violaciones durante las décadas de 1970 y 1980 disciplina (Phillips, 2018; Syndercombe Court, 2018; Thomson et al., 2019; Scudder et al., 2019; Wickenheiser, 2019). . La identificación del individuo fue posible comparando el perfil genético del sospechoso con un perfil de una de las bases de datos de genealogías accesibles en internet. Aunque permitió la detención de un posible delincuente, el método utilizado por la policía estadounidense deja en evidencia la posible exposición de perfiles genéticos ahí depositados a terceras personas, por lo que no queda clara cuál es la política de protección de datos de cada una de las mencionadas empresas. A este tipo de investigación se denomina **genealogía forense** o **genealogía genética investigativa** (García et al., 2017; García, 2020). Este tipo de estudio sirve también para la identificación de cadáveres (Phillips, 2018), así como, encontrar personas desaparecidas, como en el proyecto *DNA Doe Project* (<https://dnadoeproject.org/>).

3.3.2 Determinación de una relación de parentesco concreta

A menudo la determinación de una probabilidad de parentesco pretende diagnosticar si un individuo es o no el padre/madre biológico(s) de otro individuo. La probabilidad de filiación puede tener diversas finalidades, como la búsqueda de la identidad y pertenencia de un individuo (Puig et al., 2019) o la determinación de posibles herencias, o cargos políticos.

4. Análisis genético en muestras degradadas

La degradación del material genético es normalmente un proceso que ocurre de forma lenta si la muestra no se encuentra expuesta a factores de agresión medioambiental (Thompson et al., 2003), tales como las radiaciones ultravioletas, los cambios de temperatura, o las variaciones de pH. Esta degradación puede suceder por numerosos factores intrínsecos o extrínsecos a la propia muestra biológica. Así, aquellas muestras que se encuentren en avanzado estado de descomposición, cuyo material genético presenta escasa concentración (< 100pg de DNA) y/o en estado muy fragmentado, se denominan **muestras críticas** (Caragine et al., 2013; Gomes et al., 2019), denominadas en inglés “*Low copy number*” o “*Low template DNA*” (Caragine et al., 2013; Gill et al., 2020). Una muestra puede ser crítica forense o crítica arqueológica, de acuerdo con el caso en cuestión. Sin embargo, teóricamente, si se pudieran excluir los factores ambientales y físico-químicos externos, una muestra con 2000 años estaría teóricamente más degradada que una muestra actual al haber transcurrido más tiempo. No obstante, no existe una proporcionalidad absolutamente directa entre la antigüedad de la muestra y la respectiva calidad del perfil genético obtenido, ya que dos muestras nunca están expuestas exactamente a los mismos factores internos y externos de degradación.

4.1 Factores de degradación del DNA

En células vivas, la integridad de las moléculas de DNA se mantiene debido a la actuación permanente de mecanismos enzimáticos de reparación (Lindahl, 1993). Posteriormente a la muerte, los orgánulos celulares sufren procesos de degradación, específicamente a través de enzimas catabólicas. Como consecuencia, el DNA se empieza a degradar a través de la actuación de enzimas. Este es el caso, por ejemplo, de los lisosomas. Por otro lado, el material genético queda particularmente expuesto tras la muerte, tanto a la acción de bacterias, como de hongos o insectos (Eglinton y Logan, 1991). Los mecanismos de degradación se van acumulando, hasta que la molécula de DNA pierde su integridad y se

descompone totalmente, con una pérdida irreversible de secuencias de nucleótidos (Caramelli y Lago, 2006).

El daño molecular más frecuente es la reducción del tamaño del fragmento de DNA hasta las 100-500bp, debido tanto a la acción enzimática, como a procesos hidrolíticos no-enzimáticos de destrucción de los enlaces fosfodiéster, entre el azúcar y el fosfato de las moléculas de DNA, generando fragmentos de cadena simple (Shapiro, 1981; Lindahl, 1993). Por otro lado, la hidrólisis de enlaces glucosídicos entre el grupo pentosa y fosfato del DNA puede provocar la eliminación de bases (Caramelli y Lago, 2006). Como factores externos que propician la degradación del material biológico están la temperatura, la humedad, el pH y también los compuestos del suelo donde la muestra esté depositada (Fernández, 2005).

4.2 Problemáticas asociadas al análisis de DNA crítico

Como consecuencia del proceso de degradación, dos muestras biológicas, aunque sean del mismo tipo (dos dientes, dos muestras de sangre o de saliva, etc.) y/o del mismo individuo, deberán ser analizadas según su estado de conservación. Los procesos experimentales deberán estar cuidadosamente adaptados al posible estado de deterioro.

4.2.1 Contaminación

Aparte del daño molecular que el DNA puede sufrir a lo largo del tiempo, desde el fallecimiento del individuo hasta que se estudia la muestra, la contaminación es también uno de los factores que más condiciona e impide un correcto análisis de DNA en estado crítico. De acuerdo con Willerslev y Cooper (2012), una amplificación de DNA en laboratorio puede contener entre 10^{12} - 10^{15} moléculas amplificadas en un volumen de menos de 1mL. El movimiento del personal en el laboratorio con el flujo de aire normal puede llevar a que la apertura de un tubo con DNA amplificado se pueda dispersar como un aerosol microscópico, con miles de copias de DNA (Willerslev y Cooper, 2012). Por este motivo, un laboratorio que trabaja con DNA en estado crítico deberá estar absolutamente aislado y estéril, preferentemente con luces ultra-violeta y de presión positiva incorporados (Willerslev y Cooper, 2012). Sin embargo, si por un lado la contaminación de los laboratorios y del propio material puede comprometer el análisis de DNA crítico, la contaminación de la muestra de forma previa a su análisis en el laboratorio genético es casi siempre un problema irreparable, siendo difícil diferenciar el DNA exógeno y endógeno. Este tipo de contaminación ocurre con mayor frecuencia en el ámbito arqueológico, ya que el material esquelético encontrado es muchas

veces manoseado y/o lavado, durante y después de la excavación, por uno o varios individuos (Willerslev y Cooper, 2012).

4.2.2 Análisis de perfiles parciales

En términos prácticos, a la hora de analizar un perfil genético resultante del análisis de nuDNA, o una secuencia de mtDNA, es importante identificar si se trata de una muestra crítica.

En el caso del nuDNA, los alelos obtenidos tras la electroforesis capilar cuando se estudian marcadores STR o InDels, se presentan como un gráfico característico que recibe el nombre de **electroferograma (figura 8)**. La altura de ese gráfico (medida en Unidades Relativas de Fluorescencia, RFUs) indica el posible grado de degradación de una muestra, o una baja concentración de DNA. Así, en términos generales, una muestra cuyos alelos tienen una altura inferior a 500 RFUs se puede considerar crítica, por lo que su análisis conlleva a precauciones extras, tales como repetir la amplificación del DNA, verificar la presencia de inhibidores de amplificación del material genético, o incluso, optar por el análisis de otra muestra. En la **figura 9** se representa un electroferograma con tres marcadores genéticos (D5S818, D13S317, D7S820). Se puede observar la gradual disminución de la altura de los alelos desde el primero hasta el último marcador, indicando así una degradación de los citados alelos. Cuanto mayor sea el fragmento de DNA, mayor es la probabilidad de que esté dañado, fragmentado o mutado, por lo que la degradación afecta más a los fragmentos de mayor tamaño (Thompson, 2003).

Las muestras degradadas son particularmente difíciles de analizar y genotipar, ya que la destrucción del DNA puede reducir el tamaño del fragmento, conllevando una altura de alelos demasiado baja y no permitiendo ser correctamente distinguido del ruido de fondo (Thompson, 2003; Butler, 2005). Por otro lado, los fragmentos pueden estar tan degradados que no aparezcan en el electroferograma.

El fenómeno de “*allelic dropout*”

“*Allelic dropout*” o “pérdida alélica” se refiere a la no detección de un determinado alelo en un perfil genético (Buckleton et al., 2004). Aunque el donante de la muestra es heterocigoto para un determinado marcador, en el electroferograma solamente se visualiza uno de los dos alelos. La causa casi siempre es la degradación del DNA, por lo que los fragmentos (o alelos) no serán detectados por el umbral de sensibilidad del *software* de detección (Thompson, 2003; Butler, 2005). Normalmente, el fenómeno puede ser detectado si se repite el análisis por lo menos dos o tres veces, o se modifica el procedimiento de detección con protocolos adaptados

para muestras críticas. En este caso, es posible que en una ocasión se detecte un alelo y en el otro análisis se diagnostique el otro. Por otro lado, en un marcador genético autosómico o de cromosoma X, donde no se observe ningún alelo, se puede afirmar que estamos ante la presencia de un fenómeno de *loci dropout*, lo que supone la pérdida total de alelos para ese marcador genético.

Inhibición del DNA

A parte del fenómeno de “*allelic dropout*”, las muestras críticas pueden no reproducir un perfil genético completo o de buena calidad, debido también a posibles inhibidores. Esta situación es bastante frecuente en muestras tanto de origen arqueológico como forense, ya que muchas veces proceden, por ejemplo, de suelos o ambientes muy húmedos (Butler, 2005), ricos en agentes inhibidores.

Los inhibidores pueden: 1) impedir la lisis celular durante la extracción del DNA; 2) interferir y acelerar los procesos de degradación del DNA; y 3) inhibir la actividad de la enzima polimerasa, impidiendo su acción enzimática durante la amplificación del DNA (Butler, 2005). Por ejemplo, agentes químicos coextraídos con el DNA en casos de muestras obtenidas a partir de textiles (casos de muestras biológicas impregnadas en ropa, por ejemplo) o hemoglobina pueden ser muy problemáticos a la hora de la amplificación del material genético (Butler, 2005). En el caso de la sangre, el resultado de una amplificación de DNA con hematina como inhibidor puede significar la pérdida de alelos de mayor tamaño, o la inviabilidad total de la amplificación (Butler, 2005). Otros inhibidores descritos en la literatura son la melanina, presente en piel, pelos y cabello (Eckhart et al., 2000), polisacáridos y sales de bilis en heces (Monteiro et al., 1997), ácidos húmicos en suelo (Tsai y Olson, 1992), urea en orina (Mahony et al., 1998) o tintes químicos presentes en ropas u otros tejidos (Shutler et al., 1999). Por todo esto, es de enorme importancia una detección precoz de posibles casos de inhibición para una extracción adecuada y específica, según la procedencia de la muestra y sus posibles inhibidores.

El problema principal a la hora de trabajar con muestras críticas reside en el hecho de conseguir determinar, no tanto la antigüedad de la muestra como el posible proceso de deterioro por el que ha pasado, conllevando a fenómenos de *allelic dropout*. Así mismo, es importante conocer el ambiente físico y químico donde esa degradación se ha producido.

Figura 8. A: Visión global de un electroferograma completo, considerando un determinado conjunto de marcadores genéticos. **B:** Elementos fundamentales para el análisis de un electroferograma, considerando un solo marcador genético. **C:** Información proporcionada por un electroferograma, cuando para un marcador genético se tiene un individuo hetero u homocigoto. Un individuo puede ser heterocigoto para ciertos marcadores y homocigoto para otros, depende de la información alélica que recibe de los progenitores. Fuente de las imágenes: ThermoFisher Scientific (Foster City, USA)

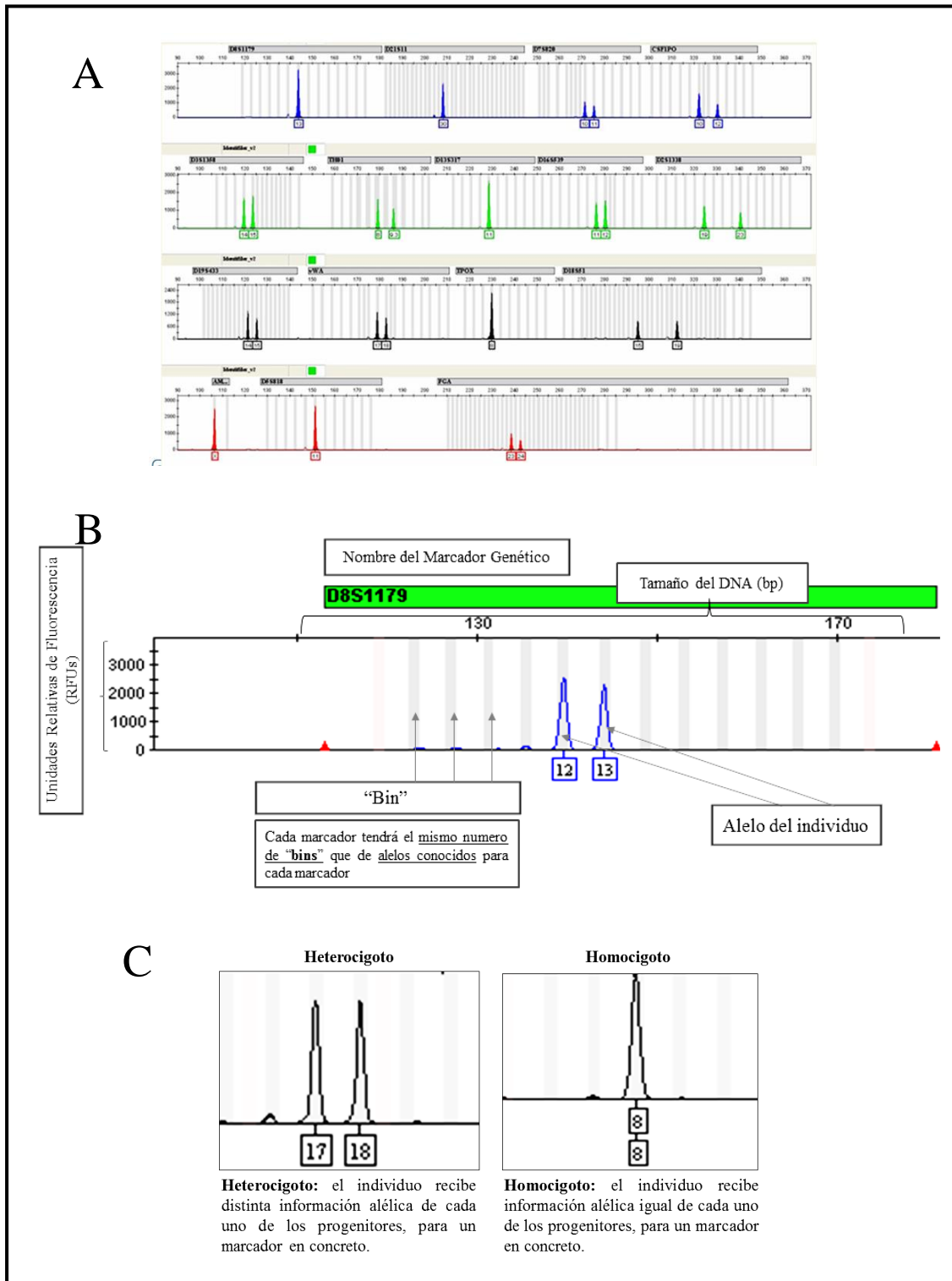
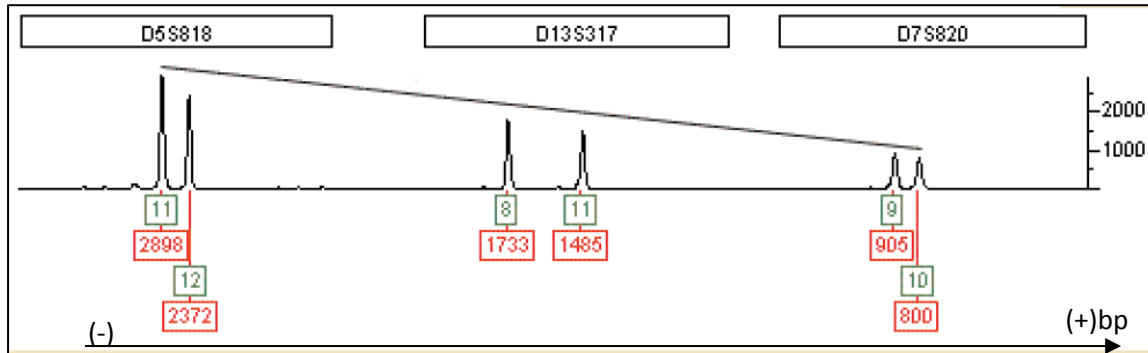


Figura 9. Electroferograma con tres marcadores genéticos (D5S818, D13S317 y D7S820), con los respectivos alelos (números verdes) y la respectiva altura en RFUs (unidades relativas de fluorescencia) (números rojos). Aunque para cada uno de los referidos marcadores, los alelos tienen una altura semejante (en equilibrio heterocigoto -Buckleton et al., 2004), se verifica que cuanto mayor es el tamaño del fragmento, menor es la altura de los alelos. Esto permite identificar una situación de DNA degradado y/o inhibido.



Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **J**ustificación

El análisis de polimorfismos genéticos de DNA, tanto autosómicos, como heterosómicos o mitocondriales, es la única herramienta que permite la investigación y determinación de parentescos biológicos, tanto en el ámbito forense, como arqueológico o histórico.

La optimización de los métodos de análisis, en concreto, la extracción y amplificación de marcadores genéticos de interés, permitirán tanto el estudio de parentescos complejos, incluso cuando las muestras en cuestión se encuentren en un elevado estado de degradación.

Esta tesis busca perfeccionar las metodologías de laboratorio y de análisis de datos, elaborando conclusiones tanto de interés forense, como arqueológico, en las muestras objeto de estudio.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **Hipótesis**

1. Exceptuando casos de epidemias, desastres naturales o conflictos bélicos, dos o más individuos enterrados juntos están relacionados por un parentesco biológico.

2. En casos de avanzado estado de descomposición del individuo, la muestra que mejores resultados genéticos produce es el diente, debido a su composición y protección del DNA conferida por el esmalte.

3. El estado de conservación del material genético no depende del periodo histórico de la muestra biológica estudiada, sino de los procesos de degradación a que esta fue expuesta.

4. La metodología empleada en genética forense puede aportar un elevado grado de información en los estudios arqueológicos y/o históricos.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ Objetivos

El objetivo principal, de carácter general, de la presente tesis doctoral es la determinación de relaciones de parentesco biológico, a través del estudio genético de muestras biológicas degradadas, en los ámbitos arqueológico, antropológico y forense. Dentro de este objetivo principal, se han delineado tres grupos de objetivos específicos, como se describe a continuación.

1. OBJETIVOS METODOLÓGICOS.

Objetivo 1.

Adaptación de una técnica de extracción no destructiva para muestras óseas y dentales.

Objetivo 2.

Evaluación de los resultados genéticos obtenidos de acuerdo con el tipo de muestra biológica analizada.

Objetivo 3.

Adecuación del protocolo de extracción y amplificación para la resolución de casos de inhibición del material genético.

Objetivo 4.

Evaluación de los resultados obtenidos en individuos de distintos períodos de tiempo: “DNA crítico *versus* DNA antiguo”.

Objetivo 5.

Evaluación de la utilidad de marcadores de cromosoma X en la determinación de relaciones de parentesco biológico, donde por lo menos una de las muestras estudiada tiene una concentración reducida de DNA.

2. OBJETIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES FAMILIARES

Objetivo 6.

Evaluación de las hipótesis de parentesco biológico a través del análisis de muestras críticas.

3. OBJETIVO GENÉTICO-POBLACIONAL

Objetivo 7.

Análisis de los linajes obtenidos, comparando sus distribuciones y frecuencias, tanto con respecto a las poblaciones contemporáneas del pasado, como con la población a

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ Resultados

Resultados

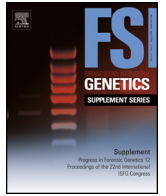


Estudios para el establecimiento de nuevos métodos de
análisis

Estudios para el establecimiento de nuevos métodos de análisis

En la siguiente sección aparecen los estudios efectuados para la investigación de nuevos métodos de análisis genéticos, que responden al grupo de objetivos específicos designados como *Metodológicos*.

- | | | |
|-----------------------------|---|--|
| Artículo
1 | ❖ Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false?
Gomes C y Palomo- Díez S, et al. 2015 | https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.111 |
| Artículo
2 | ❖ “Inhibiting inhibitors”: Preliminary results of a new “DNA extraction amplification” disinhibition technique in critical human samples
Gomes et al. 2017 | https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.066 |
| Artículo
3 | ❖ Spanish allele and haplotype database for 32 X-chromosome Insertion-Deletion polymorphisms.
Gomes et al., 2020 | https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102262 |



Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false?



C. Gomes^{a,*}, S. Palomo-Díez^{a,*}, J. Roig^b, A.M. López-Parra^a, C. Baeza-Richer^a,
A. Esparza-Arroyo^c, J. Gibaja^d, E. Arroyo-Pardo^a

^a Forensic and Population Genetics Group, Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, Spain

^b Archaeologist Arqueología y Patrimonio Arrago sl., Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Spain

^c Department of Prehistory, Ancient history and Archaeology from University of Salamanca, Salamanca, Spain

^d Department of Archaeology and Antropology (IMF-CSIC), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 August 2015

Accepted 18 September 2015

Available online 1 October 2015

Keywords:

Critical samples

Ancient DNA

DNA extraction

Non-destructive analysis

ABSTRACT

One of the most challenging points for ancient DNA studies on human remains is that analysing procedures involve partial or total destruction of the samples, which usually are unique and irreplaceable. This is what prevents museums, anthropologists or archaeologists from giving samples for genetic investigation. So that it is interesting to find an analysing method without destroying them.

In this study, it was carried out the evaluation of a non-destructive extraction DNA protocol on 4 Neolithic individuals, from Can Gambús (Sabadell, Spain) and 4 pre Bell Beaker period individuals, from Los Cercados (Valladolid, Spain).

Along this work, it was discussed the efficiency of the non-destructive protocol, valuing the obtained result, and the evidences state of preservation after the whole procedure.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Archaeological and forensic critical samples are unique pieces. The fact that the DNA analysis of ancient remains supposes the destruction of the sample is the main reason to the rejection by many archaeologists to a genetic analysis. The usual way to preserve morphological information of the processed samples was the photographic register or moulds. However, the original sample was lost. It is crucial to develop a methodology which allows the obtaining of genetic information from critical samples without the destruction of the exemplar. There have been several attempts to reduce the samples damage [1,2]. However the results have not always been satisfactory. Along this work we evaluate the efficiency of a nondestructive extraction protocol, adapting a destructive previous procedure to a nondestructive new technique. It is crucial to take into account two questions: the obtaining of reliable genetic profiles, and the grade of preservation of the samples after the procedure.

2. Material and methods

Sixteen samples were selected from eight individuals, two from each one. The individuals were exhumed from different archaeological sites: four individuals from the Neolithic site of Can Gambús (CG) (Sabadell, Spain), and other four from the Chalcolithic pre-Bell Beaker site of Los Cercados (CER) (Valladolid, Spain).

After the outer layer cleaning, the samples went through different extraction processes—the destructive technique (numbered with 1, e.g., sample 543CG1) or the non-destructive process (numbered with 3: e.g., 543CG3). All of the samples were photographed before the extraction process.

For the destructive process, the samples were pulverized in a freezer mill, and the extraction protocol was followed according to Rohland and Hofreiter [3–5]. To perform the nondestructive procedure, the process was the same, with some modifications. The samples were introduced directly into the extraction buffer, and incubated during 2 days in one hybridization oven (37 °C) with rotational movement. After the 48 h the supernatant was recovered, and the samples photographed. DNA extracts were stored at –20 °C.

This nondestructive procedure has been used previously on museum animal's samples [1]. Nevertheless, this is the first time that it is applied on human samples.

* Corresponding authors at: Forensic and Population Genetics Group, Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain.

E-mail addresses: clopes01@ucm.es (C. Gomes), sarapalomodiez@med.ucm.es (S. Palomo-Díez).

¹ Both the authors contributed equally to this study.

Table 1
mtDNA haplotype obtained for each sample and Real Time PCR results obtained. The samples that end with the number 1 were processed by destructive extraction procedure, and the samples that end with the number 3, by the non-destructive protocol. The third column shows the parameter “quality” given by Mutation Surveyor software; it was calculate the average quality of the total number of sequences obtained. The two last columns show the correlation between the destructive and the non-destructive extraction protocols, such that the relations below 1 point to greater non-destructive extraction protocol efficiency and the relations above 1 are associated with a greater efficiency of the destructive protocol.

MtDNA Results			Real Time PCR		DNA quantity relation destructive/non destructive	
Samples	Haplotype	Average quality of the sequence (0–100)	Short fragment	Long fragment	Short fragment	Long fragment
232CG1	(16105–16399) (50–390) 239C 263G 16278T 16298C 16326G 16362G 16343G	22,1	–	–	–	–
232CG3	(16105–16399) (50–390) 239C 263G 16278T 16298C 16326G 16362G 16343G	46,6	–	–	–	–
252CG1	(16105–16399) (50–390) 150T 239C 263G 315.1C 16126C 16177G 16298C 16362C	38,0	–	–	–	–
252CG3	(16105–16399) (50–390) 150T 239C 263G 315.1C 16126C 16177G 16298C 16362C	25,1	–	–	–	–
543CG1	(16105–16399)(50–390) 152C 263G 16145A 16177G 16221T 16294T 16298C 16362C	41,5	–	–	–	–
543CG3	(16105–16399) (50–390) 152C 263G 16145A 16177G 16221T 16294T 16298C 16362C	40,5	–	–	–	–
1843CG1	(16105–16399) (50–390) 73G 185A 228A 263G 295T 16126C 16362C	51,5	–	–	–	–
1843CG3	(16105–16399) (50–390) 73G 185A 228A 263G 295T 16126C 16362C	41,3	–	–	–	–
1CER1	(16105–16399)(50–390) 73G 150T 263G 295T 315.1C 16126C 16193T 16278T	24,3	476,37	460,29	0,280433746	–
1CER3	(16105–16399) (50–390) 73G 150T 263G 295T 315.1C 16126C 16193T 16278T	30,5	1698,69	0	–	–
2CER1	(16105–16399) (50–390) 73G 152C 263G 315.1C 16224C 16311C 16319A	28,1	26845,92	13644,6	32,13040824	33,19611707
2CER3	(16105–16399) (50–390) 73G 152C 263G 315.1C 16224C 16311C 16319A	24,7	835,53	411,03	–	–
3CER1	(16105–16399) (50–390) 73G 228A 263G 295T 315.1C 16129A 16311C 16319A	28,4	1411,14	303,03	1,324529046	0,560201875
3CER3	(16105–16399) (50–390) 73G 228A 263G 295T 315.1C 16129A 16311C 16126C	21,5	1065,39	540,93	–	–
4CER1	(16105–16399) 16224C 16311C 16319A	22,3	3797,64	1993,5	0,265673828	0,5447927
4CER3	(16105–16399) 16224C 16311C 16319A	29,5	14294,37	3659,19	–	–

The Hypervariable Regions I and II (HVI and HVII) from mitochondrial DNA were amplified. The sequences were analysed by *Mutation Surveyor software*[®], which provides a parameter that measures the sequence's quality, and we have considered it to the results evaluation (Table 1) [6].

To evaluate the quantity of DNA obtained by the two different procedures, DNA was quantified by Real Time PCR on the Bell Beaker Period samples. We amplified two different mtDNA regions between HVI and HVII, (one longer, 129 bp, and other shorter,

Table 2
Results of the comparison between the external aspect of the samples before and after the nondestructive process. The results seem to point out the possibility that such procedure could damage somehow the internal structure of the samples, since some of the samples show differences in the porosity, as well as, the external sample color turns lighter.











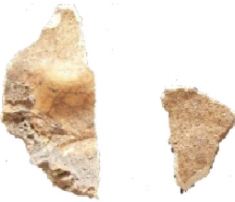





Individual	Previous stage	After DNA extraction
543CG3		
1843CG3		

Table 2 (Continued)

Individual	Previous stage	After DNA extraction
232CG3		
252CG3		
1CER3		
2CER3		
3CER3		
4CER3		

67 bp) [7] and a TaqMan MGB probe. The obtained results are resumed in Table 1.

3. Results

We compared the external aspect of the samples before and after the non-destructive process (Table 2).

Concerning the mtDNA amplification results (Table 1), all of the samples, except in one case, showed consistent results.

Regarding the DNA quantification by Real time PCR, the results (Table 1) indicate that 50% of the cases the quantity of DNA extracted

was higher when implementing the adaptations to the Rohland and Hofreiter protocol to perform the non-destructive technique.

4. Discussion

Although the DNA quantification was carried out only for four individuals, it seems that both procedures have similar efficiency to extract DNA.

The cases where the quantity of DNA were lower when processed with the nondestructive technique could be due to the damaged condition of the sample, and not to the process himself. One of the

critical points of comparing two different techniques in this context is the impossibility to perform both methods in the same sample. To minimize such inconvenient, the sampling process was accomplished selecting samples from the same individual.

In light of these preliminary results, the nondestructive extraction protocol provides as good results as the destructive one. In many cases it is possible to observe that the quality of the sequences obtained is better with the nondestructive extraction protocol.

After the procedure, the aspect of the sample (Table 2) is slightly different than before. The sample's color turns lighter, and shows more porosity than before. Such results seem to indicate that this technique could damage somehow the internal sample's structure.

It is our future goal to develop this nondestructive procedure in a significant number of samples, testing other important parameters, such as the incubating temperature and time.

Conflict of interest

None.

Aknowledgments

This work has been possible by the project HAR2009-10105 funded MINECO of the Spanish Government and the

BES2010-035322FPI grant, for P-D.S., by G/6401400/8000 research project (Santander-Universidad Complutense de Madrid, Spain) for C.G, and by the HAR2011-23149 research project funded by the MICINN of the Spanish Government for J.G.

References

- [1] M. Hofreiter, Nondestructive DNA extraction from museum specimens, *Methods Mol. Biol.* 840 (2012) 93–100.
- [2] E. Molhandesan, S. Prost, M. Hofreiter, Case estudy: using a nondestructive DNA extraction method to generate mtDNA sequences from historical chimpanzee specimens, *Methods Mol. Biol.* 840 (2012) 101–110.
- [3] N. Rohland, M. Hofreiter, Ancient DNA extraction from bones and teeth, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1756–1762.
- [4] N. Rohland, M. Hofreiter, Comparision and optimization of ancient DNA extraction, *Biotechniques* 42 (2007) 343–352.
- [5] N. Rohland, H. Siedel, M. Hofreiter, A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput, *Mol. Ecol. Resour.* 10 (4) (2010) 677–683.
- [6] Mutation Surveyor DNA, Variant analysis software–User manual. Softgenetics. Software power tools for genetic analysis, www.softgenetics.com. Mutation Surveyor-5.0-UG001. Versión 5.0. February 9 (2015).
- [7] G. Scorrano, F. Valenti, et al., Methodological strategies to assess the degree of bone preservation for ancient DNA studies, *Ann. Hum. Biol.* (2014) .



“Inhibiting inhibitors”: Preliminary results of a new “DNA extraction-amplification” disinhibition technique in critical human samples



Cláudia Gomes^{a,*}, Alejandro Alonso^b, Domingo Marquina^b, Marc Guardiola^c,
César López-Matayoshi^{a,d}, Sara Palomo-Díez^a, Bernardo Perea-Peréz^e, Juan F. Gibaja^f,
Eduardo Arroyo-Pardo^a

^a Laboratory of Forensic and Population Genetics, Toxicology and Health Legislation Department, Medicine School, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Microbiology III Department, Faculty of Biological Sciences, Complutense University of Madrid, C/José Antonio Novais 12, 28040 Madrid, Spain

^c Archaeologist, Spain

^d Pharmaceutical Sciences Section, Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Sciences and Philosophy, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru

^e Forensic and Legal Medicine School, Toxicology and Health Legislation Department, Medicine School, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^f Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IMF-CSIC), Archaeology of Social Dynamics, Egipcíacas, 15, 08001 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA inhibition
BSA
MgCl₂
pH
Bronze age

ABSTRACT

The present study focused on the genetic analysis of a presumptive Bronze Age family burial, with at least six skeletons (Plana Castell, Barcelona, Spain). In order to investigate the individuals' biological affiliation, a molecular study was undertaken, but it was impossible to obtain a positive DNA amplification. The excavation data indicated that the skeletons were buried in an old location used as a dumping ground, being very likely the presence of biological and/or chemical contaminants. To overcome this difficulty, we undertook several modifications both in the extraction as in the amplification protocol, like MgCl₂ concentration, or the inclusion of Bovine Serum Albumin (BSA).

Despite their antiquity, the preliminary results indicate that all samples were effectively inhibited, and for the first time we were able to obtain mtDNA results, specifically, for the Hypervariable mitochondrial region 1. It also allowed us to infer that our protocol performance increased considerable, mainly the amplification modifications. In general, the best results were obtained with MgCl₂ 0,6 μL (20 mM) and BSA 2 mg/mL per sample. Our result is quite important in a forensic analysis, mainly in cases where corpse/s is/are buried directly in the soil.

1. Introduction

DNA recovery from a cadaver buried directly in the soil is a difficult process. Once in this environment, DNA must not only face several types of nucleases [1], but also chemical/physical fragmentation [1,2].

In this study we focused on the genetic analysis of a Bronze Age (1885–1607 cal BC) presumptive family burial, from Plana del Castell (Barcelona, Spain), which presents at least six individuals. To investigating their possible kinships, a molecular study was undertaken, but after four amplification attempts, it was impossible to obtain results. The excavation data indicated that the skeletons were buried in an old location used as a dumping ground, being very likely the presence of biological and/or chemical contaminants. Therefore, the main

objective of this investigation was to achieve a methodology capable of solving a possible inhibition problem in critical samples, since a possible DNA degradation cannot be overcome.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

From each of the three most well preserved individuals (1PC, 2PC and 3PC), four complete dental pieces were selected (1PC1-4; 2PC1-4; 3PC1-4), according to authenticity criteria of Pääbo et al. [3].

* Corresponding author.

E-mail address: clopes01@ucm.es (C. Gomes).

Table 1

Preliminary results obtained for the three studied individuals, considering the mtDNA Hypervariable region1. Ind.:Individual.

Method	Ind.	Range	Haplotype	Average quality of the sequence (0–100)
Extraction method A + DNA amplification C	1PC	HV1: 16231–16292; 16303–16352	T16274C T16304C	14
	2PC	HV1: 16105–16228, 16231–16350	C16187T T16362C	30
	3PC	HV1: 16288–16392	C16342T T16362C	7
Extraction method B + DNA amplification C	1PC	HV1: 16230–16355	T16274C T16304C	15
	2PC	HV1: 16230–16355	C16187T T16362C	49
	3PC	HV1: 16288–16392	C16342T T16362C	14

2.2. Extraction processes

2.2.1. Extraction method A

After the external cleaning of the samples (1PC₁₋₂; 2PC₁₋₂; 3PC₁₋₂) with Aluminium oxide, one of the samples was pulverized (1PC₁, 2PC₁ and 3PC₁), and the extraction protocol was followed according to the described by Rohland and Hofreiter [4]. The other samples (1PC₂, 2PC₂ and 3PC₂) were not submitted to the destruction process, being the DNA directly extracted according to Gomes and Palomo-Díez [5].

2.2.2. Extraction method B

After the same cleaning process, the samples were separated to proceed with the two types of extraction: the DNA from samples 1PC₃, 2PC₃ and 3PC₃ was extracted according to Rohland and Hofreiter [4], and samples 1PC₄, 2PC₄ and 3PC₄ according to Gomes and Palomo-Díez [5]. However, in both cases, the incubation time with the “Extraction Buffer”, was extended to 48 h. On the other hand, the pH of all buffers from both extractions was corrected to pH = 8 [6].

2.3. DNA amplifications

Samples extracted by Method A were used to perform the DNA amplification A, B and C, as explained below. The samples extracted by Method B were also used on the DNA amplification C.

In all amplification methods, hypervariable mitochondrial (HV) regions 1 and 2 (295 and 360 base pairs fragment, respectively) were independently amplified at least twice [7].

Sequences were analyzed by Mutation Surveyor® software V 4.0.9, which provides a parameter that measures the sequence’s quality [9].

The different amplification methods were performed as follows:

DNA amplification A – samples were amplified according to Gamba et al., [7], without protocol changes.

DNA amplification B – DNA amplification was performed according to Gamba et al., [7], and 1 µL of a human DNA positive control was added to each tube, in order to test the presence of DNA amplification inhibitors. This analysis was performed twice.

DNA amplification C – According to Alonso and Marquina [8], the amplification was performed by adding 2,65 µL BSA 2 mg/mL, and 0,6 µL MgCl₂ 20 mM to the standard protocol mentioned before.

3. Results

Results for the HV1 of extraction methods A and B are shown in Table 1. It was not possible to obtain HV2 results.

4. Discussion

Our obtained results confirmed the hypothesis of a DNA inhibition. When performing the standard procedure, no results was observed, as well as, when mixing fresh DNA with the samples extracts, indicating the presence of inhibitors. Also DNA degradation was confirmed, since, until now, it was not possible to obtain results from mtDNA HV2 region.

Mitochondrial sequences were obtained for the first time when conjugating BSA with MgCl₂. When dealing with possible inhibited DNA, the addition of MgCl₂ enhances the amplification reaction, when

in a correct concentration [8]. On the other hand, BSA is known to reduce the PCR inhibition when dealing with samples contaminated with phenolic compounds [10]. Indeed, BSA improves the performance of most DNA polymerase-buffer systems, due to its inhibitor-relieving properties [11].

With Extraction method B, it was possible to observe a better sequences’ quality, due to the increase of time samples were in contact with the “Extraction buffer”. This buffer has a major component, EDTA 0,5 M, which promotes the Magnesium and Calcium release from bones [12], helping the DNA liberation from cells. On the other hand, the pH adjustment to 8 could had also been an important factor, since a correct acidity or alkalinity range will favour a stronger junction of the contaminant to a certain buffer structures, allowing its removal during the process [13].

Therefore, the best strategy to deal with inhibited DNA was the improvement of both procedures: the extraction and amplification methods. The stabilization of the pH (pH = 8), associated with a prolonged exposure time of the samples to the extraction buffer, during the DNA extraction, and the implementation of BSA 2 mg/mL and MgCl₂ to the standard amplification procedure, seem to have been crucial for obtaining results.

Our results have very important repercussions, both in cases of archaeological burials, as well as in forensic casework, since in both areas the cadaveric remains could be found deposited directly in the soil.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgment

This work was supported by G/6401400/8000 research project (Santander-Universidad Complutense de Madrid, Spain) for C.Gomes.

References

- [1] A.L. Emmons, The Preservation and Persistence of Human DNA in Soil During Cadaver Decomposition. Master’s Thesis, University of Tennessee, 2015.
- [2] K.M. Nielsen, P.J. Johnsen, D. Bensasson, D. Daffonchio, Release and persistence of extracellular DNA in the environment, *Environ. Biosafety Res.* 6 (1–2) (2007) 37–53.
- [3] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Després, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient ADN, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 645–679.
- [4] N. Rohland, M. Hofreiter, Ancient DNA extraction from bones and teeth, *Nat. Protoc.* 2 (7) (2007) 1756–1762.
- [5] C. Gomes, S. Palomo-Díez, J. Roig, A.M. López-Parra, C. Baeza-Richer, A. Esparza-Arroyo, J. Gibaja, E. Arroyo-Pardo, Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 5 (2015) e279–e282.
- [6] M. Fabbri, M. Venturi, S. Boni, S. Benedetti, R. Pollicino, R.M. Gaudio, F.M. Avato, DNA extraction from human bones: revision of the protocol proposed by Hochmeister et al, *Minerva Med. Leg.* 133 (1) (2013) 1–4.
- [7] C. Gamba, E. Fernández, A. Oliver, M. Tirado, C. Baeza, A.M. López-Parra, E. Arroyo-Pardo, Population genetics and DNA preservation in ancient human remains from Eastern Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 1 (1) (2008) 462–464.
- [8] A. Alonso, D. Marquina, Estudio ecofuncional de la microbiota asociada a suelos de interés vitivinícola. eprintid: 43985. Master’s Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 2016.

- [9] Mutation Surveyor DNA, Variant Analysis Software–User manual. Softgenetics. Software Power Tools for Genetic Analysis, www.softgenetics.com. Mutation Surveyor-5.0-UG001. Versión 5.0. 2015.
- [10] S. Garland, A. Baker, A.D. Phillott, L.F. Skerratt, BSA reduces inhibition in a TaqMan assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*? *Dis. Aquat. Organ.* 92 (2–3) (2010) 113–116.
- [11] M. Sidstedt, L. Jansson, E. Nilsson, L. Noppa, M. Forsman, P. Rådström, J. Hedman, Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* 487 (2015) 30–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.002> Epub 2015 Jul 10.
- [12] D. Harris, *Quantitative Chemical Analysis (Loose-Leaf)*, 8th edition, Macmillan Higher Education, 1429293276, 2010 11th Chapter.
- [13] K. Saeki, T. Kunito, M. Sakai, Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols, *Biol. Fertil. Soils* 46 (5) (2010) 531–535.



Forensic Population Genetics - Short Communication

Spanish allele and haplotype database for 32 X-chromosome Insertion-Deletion polymorphisms

Cláudia Gomes^{a,b,c,*}, José David Quintero-Brito^d, Jesús Martínez-Gómez^d, Rui Pereira^{e,f}, Carlos Baeza-Richer^{a,b,c}, Mercedes Aler Gay^g, Laura Díez-Juárez^d, Sara Palomo-Díez^{a,b,c}, Ana María López-Parra^{a,b,c}, Elena Labajo-González^h, Victor José Esteban-Ramos^d, Bernardo Perea-Pérez^h, Eduardo Arroyo-Pardo^{a,b,c}

^a Laboratory of Forensic and Population Genetics, Legal Medicine, Psychiatry and Pathology Department, Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Pza. Ramón y Cajal s/n 28040 Madrid, Spain

^b Legal Medicine, Psychiatry and Pathology Department, Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid, Spain

^c Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

^d Laboratory of the Biology Department, Criminalistics Service, Civil Guard, Madrid, Spain

^e Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (i3S), Porto, Portugal

^f Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

^g Sección de Genética y Criminalística, Servicio de Laboratorio, Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Valencia, Spain

^h Legal Medicine School, Complutense University of Madrid, Pza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

X-InDels

Allele frequencies

Haplotype frequencies

Spanish population

ABSTRACT

X-chromosome markers have been proved to be decisive both complementing and solving kinship analysis, particularly when autosomal markers are not able to produce adequate likelihood ratios between different hypothesis. On the other hand, Pereira et al., (2012) have demonstrated that 32 Insertion/Deletion (InDel) markers located on the X-Chromosome have a very important power of discrimination in human populations, being a novel tool in the forensic and population fields. So, the aim of the present work was testing the forensic and population genetic efficiency of the 32 X-InDel polymorphisms in the Spanish population, and subsequently build an allele/haplotype frequencies database.

To accomplish this objective, a total of 555 samples comprising male individuals from 13 Spanish regions were analysed for the above mentioned 32 X-InDels in two independent laboratories. A pairwise F_{ST} analysis was performed in order to understand if the studied Spanish sub-populations present significant differences among them, detecting possible population substructure. Also, linkage disequilibrium analyses were computed to investigate the presence of association between markers in the Spanish population.

After Bonferroni correction, the absence of significant differences among the studied regions supports a global Spanish population database. Concerning LD, besides previously reported linked markers MID356-MID357 and MID3690-MID3719-MID2089, we also detected significant association between MID3703-MID3774, even after Bonferroni correction.

Finally, after computing allele and haplotype frequencies, forensic efficiency parameters were calculated ($PD_{\text{males}} = 99.999976\%$; $PD_{\text{females}} = 99.9999999998\%$). Mean exclusion chance values for duos were 0.999 and trios 0.9999. These results reinforce the suitability of the 32 X-InDels marker set both in identification and kinship studies.

1. Introduction

X-chromosome markers have been evolving as an advantageous tool in certain forensic routine problems, mainly in genealogical questions.

Indeed, X-markers complement autosomal marker information due to their higher mean exclusion chance (MEC) [1], but also solving certain kinship problems, unachievable with autosomal markers [2,3].

One of the key features of X-markers, which make them completely

* Corresponding author at: Laboratory of Forensic and Population Genetics, Legal Medicine, Psychiatry and Pathology Department, Medicine School, Complutense University of Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: clopes01@ucm.es (C. Gomes).

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102262>

Received 18 June 2019; Received in revised form 27 January 2020; Accepted 8 February 2020

Available online 13 February 2020

1872-4973/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

different from the autosomal markers, has to do with the fact that all markers are located on the same chromosome [1]. Being a population-dependent parameter, the study of *linkage disequilibrium* (LD) is crucial when using markers located on this chromosome, being an important indicator of the diversity inside a certain population. Furthermore, the detection of LD conditions the use of haplotype or allele frequencies when performing a global database, both in forensics and in population investigations [1].

In general, Short Tandem Repeat (STR) markers are the standard tool in routine casework [4–8], both for autosomal as for X-chromosomal analyses. However, a number of published works [9–15] are increasingly demonstrating the potential of Insertion/Deletion polymorphisms (InDels), almost unexplored until the past decade in the forensic field. In fact, InDels incorporate useful characteristics of both Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and STRs, such as extensive occurrence throughout the genome and low mutation rate, as well as amenability to simple analysis in short amplicons through well-established PCR and capillary electrophoresis typing techniques [16,17]. Furthermore, InDels located on the X-chromosome (X-InDels) reflect higher efficiency than those on the autosomes in many deficiency paternity cases [16,18].

So, the aim of the present work was testing the overall forensic and population genetic efficiency of the 32 X-InDel polymorphisms described in [18] in the Spanish population. After an accurate statistical analysis, we were able to set up suitable allele and/or haplotype frequencies database for future reference.

2. Materials and methods

2.1. DNA samples

The present study received a favourable report from the CEIC Hospital Clínico San Carlos (15th November 2017, CEIC 17/424-E).

A total of 509 unrelated Spanish men from thirteen Spanish regions (Castile la Mancha (N = 28), Valencia (N = 50), Andalusia (N = 48), Extremadura (N = 19), Catalonia (N = 62), Cantabria (N = 17), Basque Country (N = 5), Aragon (N = 10), Castile and León (N = 74), Galicia (N = 13), Madrid (N = 157), Murcia (N = 19), Canary Islands (N = 7)) were analysed, 329 obtained from volunteer donors, and 180 provided by the Banco Nacional de ADN Carlos III (BNADN Ref. 12/0031). Each volunteer signed an informed consent, giving his permission to the analysis and publishing of anonymized genetic data obtained from his biological sample.

Samples were requested only from male volunteers in order to determine directly the X-chromosome phase through their X-chromosome haplotype.

It was also included 46 samples from Majorca, previously published on [22], so the final database counts with 555 unrelated Spanish men.

2.2. DNA extraction and X-InDel genotyping

DNA extraction and X-InDel markers (MID2612, MID3712, MID357, MID356, MID3703, MID3774, MID3692, MID3716, MID3690, MID3719, MID2089, MID2692, MID3701, MID198, MID1736, MID3730, MID1511, MID3740, MID3732, MID3727, MID3754, MID3722, MID1361, MID243, MID2637, MID111, MID3736, MID3753, MID1839, MID3760, MID329, and MID2652) [18] analysis were performed in two different laboratories: Laboratory of Forensic and Population Genetics (Medicine School, University Complutense, Madrid, Spain) and in the Laboratory of the Department of Biology of the Spanish Guardia Civil (Criminalistic Service, Jefatura Policia Judicial, Madrid, Spain) following the same protocol. DNA from saliva and blood samples was extracted with Prep-n-Go™ (ThermoFisher™ Scientific, Foster City, USA) according to the user's manual, and Gomes et al. [19]. X-InDel amplification was performed according to Pereira et al. [18]. Capillary electrophoresis and detection were achieved in a 3730

Genetic Analyzer or a 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher™ Scientific, Foster City, USA) depending on the laboratory. Electropherogram analysis and allele assignment were performed with GeneMapper v 4.0.

2.3. Data and statistical analysis

Allele and haplotype frequencies were assessed by direct counting. F_{ST} genetic distances and LD analyses were computed with Arlequin software v3.5 [20]. Forensic efficiency parameters (PD in males and females and MEC for duos and trios) were calculated according to Desmarais et al. [21], considering the global population, and, each marker.

3. Results and discussion

Genetic haplotypes for 32 X-InDels from 555 male individuals are presented in Supplementary Table S1, except for MID3753 marker showing unsatisfactory results in 81 individuals.

In order to detect possible population substructure, pairwise F_{ST} genetic distances were computed between the studied Spanish regions (Supplementary Table S2). Genetic distances were overall low and statistically non-significant considering initially a significance value of $p = 0.01$, with a single exception for Castilla la Mancha and Cataluña ($F_{ST} = 0.02078$, $p = 0.00475$). However, after Bonferroni correction for multiple analyses, no significant differentiation was detected, thus allowing to consider a global Spanish population database for this set of markers.

We then proceeded to compare our Spanish population sample with previously reported data for the same marker set (Supplementary Table S3). As expected, population samples from different continental origins show high and significant genetic distances (this study, [18]). Although to less extent due to higher geographic or cultural affinity, some Jewish groups or Chuerta Crypto-Jews still harbour perceivable heterogeneity with the studied X-InDels [22]. On the contrary, pairwise F_{ST} revealed no significant differentiation between our Spanish data and those reported from Portugal [18] ($F_{ST} \leq 0.00018$, $p \geq 0.35836$). Such results appear to support that a single Iberian database could be considered for the 32 X-InDels, similarly to the results obtained in a more comprehensive Iberian survey with InDels located on the autosomes [23].

Due to the complexity of studying markers located on the X-chromosome, LD analysis was performed trying to identify possible non-random association between different *loci* (Supplementary Table S4). Beyond the already mentioned linked markers in [18] (MID356-MID357 and MID3690-MID3719-MID2089), we also found signals of LD between another pair of markers, MID3703-MID3774, even after Bonferroni correction for multiple testing ($p \leq 1,008E-04$). Considering MID3703-MID3774, although LD is a population specific issue, both markers map at a distance of only ~ 97 kb (cf. Table 1 in [18]), which is even smaller than the haplotype blocks earlier described, and could justify their non-independent segregation in the Spanish population. Considering these results, MID3703-MID3774, MID356-MID357 and MID3690-MID3719-MID2089 must be treated as three haplotype blocks when assessing forensic evidence in the Spanish population.

Therefore, allele and haplotype frequencies (for the above mentioned linked markers) were computed, and are presented on Supplementary Table S5, considering the 555 Spanish male individuals. Supplementary Table S6 further details allele and haplotype frequencies computed for each Spanish community included in the study.

Finally, the calculated PD_{male} and PD_{female} values in the Spanish population were 99.999976 % and 99.999999998 % respectively, similar to what was observed for the five populations studied in [18], only marginally higher than the value determined for the Portuguese population [18]. The combined MEC values were 0.999 for duos, and 0.99999 for trios, also similar to those values studied in [18]. These results corroborate a strong forensic efficiency, confirming its utility in forensic human identification and kinship studies. On the other hand,

due to the small amplicon strategy, these 32 X-InDels could be also useful when dealing with extremely degraded and/or very ancient samples.

CRedit authorship contribution statement

Cláudia Gomes: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. **José David Quintero-Brito:** Data curation, Investigation, Methodology. **Jesús Martínez-Gómez:** Data curation, Investigation, Methodology, Supervision. **Rui Pereira:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Software, Supervision, Writing - review & editing. **Carlos Baeza-Richer:** Writing - review & editing. **Mercedes Aler Gay:** Writing - review & editing. **Laura Díez-Juárez:** Writing - review & editing. **Sara Palomo-Díez:** Writing - review & editing. **Ana María López-Parra:** Writing - review & editing. **Elena Labajo-González:** Funding acquisition, Project administration. **Victor José Esteban-Ramos:** Funding acquisition, Resources. **Bernardo Perea-Pérez:** Funding acquisition, Project administration. **Eduardo Arroyo-Pardo:** Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to M. J. Prata, and S. Pisa Bravo for their bioinformatics crucial help, and N. Pinto for her decisive help on statistical computations. On the other hand, the authors would like to thank to the Spanish National DNA Bank for the Spanish sample collection (Ref: AN-18/0017). Finally, this work would not have been possible without the extraordinary collaboration from all of the volunteers, who generously donated their biological sample.

This work was supported by G/6401400/8000 research project (Banco Santander-Universidad Complutense de Madrid, Spain) for C.G, and by PR41/17-21018 research project SANTANDER-UCM 2017 (PR41/17). This work was also partially funded by MINECO research grant HAR2015-67323-C2-2-P.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102262>.

References

- [1] R. Szibor, X-chromosomal markers: past, present and future, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1 (2) (2007) 93–99.
- [2] C. Gomes, M. Magalhaes, C. Alves, A. Amorim, N. Pinto, L. Gusmao, 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.* 126 (6) (2012) 917–921.
- [3] C.M.M. Gomes, A. Amorim, C. Alves, N. Pinto, L. Gusmao, How useful is your X in discerning pedigrees? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 3 (2011) e161–e162.
- [4] C. Phillips, K.B. Gettings, J.L. King, D. Ballard, M. Bodner, L. Borsuk, et al., "The devil's in the detail": release of an expanded, enhanced and dynamically revised forensic STR sequence guide, *Forensic Sci. Int. Genet.* 34 (2018) 162–169.
- [5] A. Vidaki, M. Kayser, Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics, *Forensic Sci. Int. Genet.* 37 (2018) 180–195.
- [6] M. Kayser, P. de Knijff, Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology (vol 12, pg 179, 2011), *Nat. Rev. Genet.* 13 (10) (2012) 754–.
- [7] B. Berger, C. Berger, J. Heinrich, H. Niederstatter, W. Hecht, A. Hellmann, et al., Dog breed affiliation with a forensically validated canine STR set, *Forensic Sci Int-Gen.* 37 (2018) 126–134.
- [8] S.H. Kim, J.Y. Lee, J.J. Kim, Investigation on STR profiling of maternal DNA from a degraded placenta with an abandoned newborn male baby, *Leg. Med. (Tokyo)* 37 (2019) 37–40.
- [9] S. Cardoso, R. Sevillano, D. Gamarra, A. Santurtun, B. Martinez-Jarreta, M.M. de Pancorbo, Population genetic data of 38 insertion-deletion markers in six populations of the northern fringe of the Iberian Peninsula, *Forensic Sci. Int.-Gen.* 27 (2017) 175–179.
- [10] A. Carvalho, M.F. Pinheiro, Population data of 30 insertion/deletion polymorphisms from a sample taken in the North of Portugal, *Int. J. Legal Med.* 127 (1) (2013) 65–67.
- [11] T.D.B.F. Palha, E.M.R. Rodrigues, G.C. Cavalcante, A. Marrero, I.R. de Souza, C.J.S. Uehara, et al., Population genetic analysis of insertion-deletion polymorphisms in a Brazilian population using the investigator DIPplex kit, *Forensic Sci Int-Gen.* 19 (2015) 10–14.
- [12] M. Nunotani, T. Shiozaki, N. Sato, S. Kamei, K. Takatsu, T. Hayashi, et al., Analysis of 30 insertion-deletion polymorphisms in the Japanese population using the Investigator DIPplex (R) kit, *Legal Med-Tokyo* 17 (6) (2015) 467–470.
- [13] R.L. Ma, C.M. Shen, Y.Y. Wei, X.Y. Jin, Y.X. Guo, Y.L. Mu, et al., Genetic differentiation and forensic efficiency evaluation for Chinese Salar ethnic minority based on a 5-dye multiplex insertion and deletion panel, *Gene* 660 (2018) 41–50.
- [14] L. Li, Y. Ye, F. Song, Z. Wang, Y. Hou, Genetic structure and forensic parameters of 30 InDels for human identification purposes in 10 Tibetan populations of China, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2019).
- [15] L. Chen, W. Du, W. Wu, A. Yu, X. Pan, P. Feng, et al., Developmental validation of a novel six-dye typing system with 47 A-InDels and 2 Y-InDels, *Forensic Sci. Int. Genet.* 40 (2019) 64–73.
- [16] G.Y. Fan, Y. Ye, H.B. Luo, Y.P. Hou, Screening of Multi-InDel markers on X-chromosome for forensic purpose, *Forens Sci Int-Gen S.* 5 (2015) E42–E44.
- [17] P.M. Schneider, Beyond STRs: the role of diallelic markers in forensic genetics, *Transfus. Med. Hemother.* 39 (3) (2012) 176–180.
- [18] R. Pereira, V. Pereira, I. Gomes, C. Tomas, N. Morling, A. Amorim, et al., A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR, *Int. J. Legal Med.* 126 (1) (2012) 97–105.
- [19] C. Gomes, J. Martinez-Gomez, L. Diez-Juarez, S. Diaz-Sanchez, S. Palomo-Diez, E. Arroyo-Pardo, et al., Prep-n-Go (TM) : a new and fast extraction method for forensic blood samples, *Forensic Sci. Int.-Gen. Suppl. Ser.* 6 (2017) E265–E266.
- [20] L. Excoffier, H.E. Lischer, Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Mol. Ecol. Resour.* 10 (3) (2010) 564–567.
- [21] D. Desmarais, Y.X. Zhong, R. Chakraborty, C. Perreault, L. Busque, Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA), *J. Forensic Sci.* 43 (5) (1998) 1046–1049.
- [22] J.F. Ferragut, K. Bentayebi, R. Pereira, J.A. Castro, A. Amorim, C. Ramon, et al., Genetic portrait of Jewish populations based on three sets of X-chromosome markers: indels, Alu insertions and STRs, *Forensic Sci. Int. Genet.* 31 (2017) e5–e11.
- [23] R. Pereira, C. Alves, M. Aler, A. Amorim, C. Arevalo, E. Betancor, et al., A GHEP-ISFG collaborative study on the genetic variation of 38 autosomal indels for human identification in different continental populations, *Forensic Sci. Int. Genet.* 32 (2018) 18–25.

Resultados



Estudios para el establecimiento de relaciones familiares y genético-poblacionales.

Estudios para el establecimiento de relaciones familiares y genético-poblacionales.

A continuación, se indican los estudios realizados para investigar tanto posibles relaciones de parentesco biológico, como el origen biogeográfico de los individuos considerados.

Período Histórico en Europa	Estudio realizado
Neolítico (Aprox. 5600 - 3200 a.C.)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Can Gambús-1 (Barcelona, España) – parcialmente publicado, artículo 4. ❖ El Llord (Lleida, España) – no publicado. ❖ La Feixa del Moro (Juberri, Principado de Andorra) – publicado, artículo 5.
Edad del Cobre* (Aprox. 3300 - 1200 a.C.) Edad del Bronce* (Aprox. 3300 - 700 a.C.)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Minferri (Lleida, España) – no publicado. ❖ Plana del Castell (Barcelona, España) – publicado, artículo 2.
Alta Edad Media (476 – 1000)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Galligants (Girona, España) – no publicado. ❖ Can Gambús-1 (Barcelona, España) – no publicado.
Baja Edad Media (s. XI- XV)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Comunidad Mudéjar de Uceda (Guadalajara, España) – publicado, artículos 6 y 7
Edad Contemporánea (1789 -)	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Guerra Civil Española (Almería, España) ❖ Guerra Civil Española (Tarragona, España)

*Por motivos estadísticos, los periodos comprendidos entre la Edad del Cobre y la del Bronce se tratarán como un solo periodo (Edades del Cobre-Bronce).

Resultados y análisis publicados

En la siguiente sección se indican los artículos publicados que responden a los dos grupos de Objetivos Específicos: establecimiento de relaciones familiares y genético-poblacionales.

Artículo 4	❖ Biological kinship analysis in extremely critical samples: The case of a Spanish Neolithic necropolis. Gomes et al., 2015	https://doi.org/10.10 16/j.fsigss.2017.09.1 54
Artículo 5	❖ Paleogenetic evidence of a Pyrenean Neolithic Family: kinship, physical appearance and biogeography multidisciplinary analysis Gomes et al., 2020	<i>In press</i>
Artículo 6	❖ A maternity case with human remains from a XIII–XIV century burial at Uceda, Guadalajara, Central Spain. Gomes et al., 2015	https://doi.org/10.10 16/j.fsigss.2015.09.0 05
Artículo 7	❖ Study of medieval critical samples—a genetic approach to the study of the Mudejar Community. Gomes et al., 2015	https://doi.org/10.10 16/j.fsigss.2015.09.0 78
Artículo 8	❖ An unusual kinship case from the Spanish Civil War (1936–1939): Ancient versus degraded sample’s investigation. Gomes et al., 2019	https://doi.org/10.10 16/j.fsigss.2019.10.1 40
Artículo 9	❖ X-InDels efficacy evaluation in a critical samples paternity case: A Spanish Civil War case from the memorial of the Camposines (Tarragona, Spain) Gomes et al., 2019	https://doi.org/10.10 16/j.fsigss.2019.10.0 64



Biological kinship analysis in extremely critical samples: The case of a Spanish Neolithic necropolis

Cláudia Gomes^{a,*}, Juan F. Gibaja^b, Jordi Roig I. Buxó^c, Carlos Baeza-Richer^a, César López – Matayoshi^{a,d}, Ana María López-Parra^a, Sara Palomo-Díez^a, M. Eulàlia Subirà^e, Eduardo Arroyo-Pardo^a

^a *Laboratory of Forensic and Population Genetics, Toxicology and Health Legislation Department, Medicine School, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n 28040 Madrid, Spain*

^b *Department of Archaeology and Anthropology (IMF-CSIC), Barcelona, Spain*

^c *Archaeologist Arqueología y Patrimonio Arrago s.l., Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Spain*

^d *Pharmaceutical Sciences Section, Department of Cellular and Molecular Sciences, Faculty of Sciences and Philosophy, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru*

^e *Unitat d'Antropologia Biològica a la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

ARTICLE INFO

Keywords:

Critical DNA
Kinship analysis
Neolithic burial
mtDNA

ABSTRACT

It is common in archeology and some forensic cases to make assumptions about the relationship between persons buried in the same grave, or in distinct burials but in the same cemetery. However, there is no objective criterion to make such suppositions.

This study aims to investigate the biological relationship among six Neolithic individuals (4200–3400 cal BC) from the Can Gambús-1 necropolis (Barcelona, Spain) as well as, their possible mitochondrial ancestry. From at least 47 tombs, six skeletons were selected, from six individual graves, selecting from each one three integral teeth, without cavities or caries.

To carry out this study, the samples were analyzed by two distinct extraction methods, one destructive and other non-destructive, and to determine a presumptive (biological) kinship between the buried individuals, small length nuclear DNA markers were considered, as well as a mitochondrial DNA analysis, in order to determine their maternal lineage.

The samples were extremely degraded, requiring several attempts to achieve sequences with a standard quality, without double peaks or other artefacts. Despite the degraded state of the samples, it has been possible to analyze the mitochondrial information and to determine that the studied individuals had a European ancestry, and were not maternally related, since they did not share the same mitochondrial haplotype.

1. Introduction

Archaeology and Forensic are fields with much in common when dealing with the multiple burials. Both areas interpret this burial context in a similar way, since there is a tendency to assume that, if there are (at least) two persons buried in the same grave, they were probably related by a biological kinship. There are very few studies that concern kinship determination in extremely critical samples. Indeed, due to the advanced stage of decomposition, the study of these remains is accomplished by the Anthropology area, being impossible to determine biological relationships [1]. In archaeology, the funeral practices in ancient societies have not been widely known, mainly taking into account the possibility of a biological bond between individuals, as a

criterion for the burial pattern.

Therefore, the aim of the present study was to investigate possible kinship in very critical samples, which belong to six Neolithic individuals (4200–3400 cal BC) [2] from the Can Gambús-1 necropolis (Barcelona, Spain), as well as, their possible ancestry. This Neolithic site has a total of 47 graves, 43 of them are individual and 4 are multiple [2].

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Three teeth were collected from each of the six available

* Corresponding author.

E-mail address: clopes01@ucm.es (C. Gomes).

Table 1
MtDNA haplogroups and biogeographical assignment(s) for the 6 analysed individuals.

Individual	Haplotype	Haplogroup
232	(120–16400) T 239C A263G T16298C A16326G T 16362C	H
252	(120–16400) C150T A263G T239C T 16126C T16298C T16362C	H
543	(120–16400) T152C A263G 16145A T16298C T16362C	H
1417	(16105–16400) T16362C	H
1534	(120–16400) G185A G228A A263G C295T –315.1C T16126C	J1c
1843	(58–340) (16105–16400) A73G G185A G 228A A263G 295T T16126C T16362C	J1c

individuals, according to the authenticity criteria [3], trying to avoid cavities or caries.

2.2. Pretreatment and DNA extraction

The external layer of the samples was excised with a Sand-blasted (DentalFarm), and irradiated with UV for 30 min on each side of the tooth. One of the samples from each individual was pulverized in a freezer mill filled with liquid Nitrogen, and then, the extraction protocol was followed according to the described by Rohland and Hofreiter [4]. The other sample was not submitted to the destruction process, being the DNA directly extracted according to Gomes and Palomo-Díez et al. [5].

2.3. PCR amplification (and sequencing)

The AmpFLSTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit was used to perform the amplifications of the nuclear DNA, according to the user's manual [6], extending the number of cycle up to 40 cycles.

Both hypervariable regions (HV) 1 and 2 (295 base pairs (bp) and 360 bp fragments) of the mtDNA were analysed, by at least two independent amplifications [3,7]. The estimation of each haplogroup was performed consulting the phylogenetic tree *PhyloTree*, using HaploGrep [8], and accessing directly to the phylogenetic tree *PhyloTree* [9].

3. Results

Results for the six analyzed individuals, considering both hypervariable regions of the mtDNA are shown on Table 1.

4. Discussion

In general, results indicate that the genetic material has serious damages, being impossible to obtain nuclear information. Such absence of nuclear results complicates the study, since it is not possible to define close kinships (such as father/motherhood).

Despite the critical preservation of the samples, it was possible to define six mitochondrial lineages, meaning that, these six individuals do not share any maternal kinship.

Considering the Iberian Peninsula, this was a pioneer study in the determination of kinship relations in a Neolithic community, relating distance/proximity of the buried individuals between each other's. Our results seem to point that, in this Neolithic community, they buried their members not by biological bonds but by other social relation(s), not measurable by molecular techniques. Such practice was also pointed by Juras et al. [1], were all of the five Polish Neolithic individual, despite being buried together, revealed no biological kinship between them.

The biogeographical origin of the individuals was also analysed, being possible to determine that four of the six individuals belong to the European macro-haplogroup H, and two to the J1c lineage. H haplogroup is today one of the most frequent in Europe, and according to Roostalu et al. [10], such frequency is also observed in extant living population in the North of the Iberian Peninsula. Concerning other ancestry studies on Neolithic populations [1,11,12], our obtained results are also in accordance with Hervella et al. [12,13], where 45% of the individuals belong to the H lineage, and only 4% were J1c. This last haplogroup is a previously proposed marker for the spread of Neolithic farmers from Near East, although, according to Pala et al. [13], this mitochondrial lineage was already present in Europe from the Near East preceding the Neolithic period.

These results seem to indicate that individuals buried together do not have to share a biological heritage. From the forensic point of view, the analysis of these samples also demonstrated that it is possible to obtain reliable results from very critical samples, being able to determine their ancestry and possible maternal kinships.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgments

This work was supported by G/6401400/8000 research project (Santander-Universidad Complutense de Madrid, Spain) for C. Gomes. This work has been partially funded by HAR2015-67323-C2-2-P.

References

- [1] A. Juras, M. Chyleński, M. Krenz-Niedbala, H. Malmström, E. Ehler, L. Pospieszny, S. Łukasik, J. Bednarczyk, J. Piontek, M. Jakobsson, M. Dabert, Investigating kinship of Neolithic post-LBK human remains from Krusza Zamkowa, Poland using ancient DNA, *Forensic Sci. Int. Genet.* 26 (2017) 30–39.
- [2] J. Roig, J.M. Coll, J.F. Gibaja, P. Chambon, V. Villar, J. Ruiz, X. Terradas, E. Subirà, La necrópolis de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona): Nuevos conocimientos sobre las prácticas funerarias durante el Neolítico medio en el Noreste de la Península Ibérica, *Trabajos de Prehistoria* 67 (2010) 59–84.
- [3] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, V. Jaenicke-Despres, J. Hebler, N. Rohland, M. Kuch, J. Krause, L. Vigilant, M. Hofreiter, Genetic analyses from ancient DNA, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 645–679.
- [4] N. Rohland, H. Siedel, M. Hofreiter, A rapid column—based ancient DNA extraction method for increased sample throughput, *Mol. Eco. Resour.* 10 (2009) 677–683.
- [5] C. Gomes, S. Palomo-Díez, J. Roig, A.M. López-Parra, C. Baeza-Richer, A. Esparza-Arroyo, J. Gibaja, E. Arroyo-Pardo, Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false? *Forensic Sci. Int. Genet. Sup. Ser.* 5 (2015) e279–e282.
- [6] Applied Biosystems Life Technologies, AmpFLSTR® NGM Select™ PCR Amplification Kit. User Guide, Thermo Fisher Scientific Inc., 2015.
- [7] C. Gamba, E. Fernández, A. Oliver, M. Tirado, C. Baeza, A.M. López-Parra, E. Arroyo-Pardo, Population genetics and DNA preservation in ancient human remains from Eastern Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Sup. Ser.* 1 (1) (2008) 462–464.
- [8] A. Kloss-Brandstatter, D. Pacher, S. Schonherr, H. Weissensteiner, R. Binna, G. Specht, et al., HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups, *Hum. Mutat.* 32 (1) (2011) 25–32.
- [9] M. van Oven, *PhyloTree build 17: growing the human mitochondrial DNA tree*, *Forensic Sci. Int. Genet. Sup. Ser.* 5 (2015) e392–e394.
- [10] U. Roostalu, I. Kutuev, E.L. Loogvali, E. Metspalu, K. Tambets, M. Reidla, et al., Origin and expansion of haplogroup H, the dominant human mitochondrial DNA lineage in West Eurasia: the Near Eastern and Caucasian perspective, *Mol. Biol. Evol.* 24 (2) (2007) 436–448.
- [11] M. Hervella, N. Izagirre, S. Alonso, R. Fregel, A. Alonso, V.M. Cabrera, C. de la Rúa, 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) (2012) e34417.
- [12] M. Hervella, N. Izagirre, S. Alonso, et al., Early Neolithic funerary diversity and mitochondrial variability of two Iberian sites, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 8 (2016) 97.
- [13] M. Pala, A. Olivieri, A. Achilli, M. Accetturo, E. Metspalu, et al., Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia, *Am. J. Hum. Genet.* 90 (5) (2012) 915–924.

JASC19-398R2 is accepted for publication

Journal of Archaeological Science <em@editorialmanager.com>
Responder a: Journal of Archaeological Science <jas@elsevier.com>
Para: Cláudia Gomes <clopes01@ucm.es>

12 de agosto de 2020 às 07:12

Ms. Ref. No.: JASC19-398R2

Title: Paleogenetic evidence of a Pyrenean Neolithic Family: kinship, physical appearance and biogeography multidisciplinary analysis

Journal: Journal of Archaeological Science

Dear Miss Gomes,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication in the Journal of Archaeological Science. Your manuscript will now proceed to production.

If your institution is planning to issue a press release, please notify me so our production team can work with you to co-ordinate timing it with the date when the article is made public. Please feel free to promote your article and use the sharelinks provided. Do let us know if it receives any media coverage so we can support its promotion, and if you are on twitter, please remember to tag us @ElsevierArchaeo.

When you receive the proofs, please check them thoroughly to make sure that everything is satisfactory, and liaise with the production team as required. This includes checking the size, resolution and readability of tables, figures and captions. As soon as you receive the alert that your paper is published online, you should also double-check that there are no errors in the published version. We would like our production standards to be as high as possible, but often the authors are best placed to help us achieve this.

Thank you for submitting your work to Journal of Archaeological Science. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Marcos Martín-Torres, PhD
Editor
Journal of Archaeological Science

Comments from the editors and reviewers:

Please make sure the letter from the English proofreading services is not included in the published supplementary material!
Thanks.

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our Customer Support site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/yjasc/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

1 **Paleogenetic evidence of a Pyrenean Neolithic Family: kinship, physical**
2 **appearance and biogeography multidisciplinary analysis**

3
4
5
6 Cláudia Gomes^{1,2,*}, Gerard Remolins³, Ana Maria López-Parra^{1,2}, Juan F. Gibaja⁴, Maria
7 Fondevila^{5,6}, Flavio De Angelis⁷, Virginia Veltre⁷, M. Eulàlia Subirà⁸, Carlos Baeza-Richer^{1,2},
8 Diana Guerrero¹, Sara Palomo-Díez^{1,2}, Cristina Martínez-Labarga⁷, Elena Labajo-González⁹,
9 Maria Victoria Lareu⁵, Bernardo Perea-Pérez⁹, Eduardo Arroyo-Pardo^{1,2}

10
11
12
13 ¹Laboratory of Forensic and Population Genetics, Legal Medicine, Psychiatry and Pathology
14 Department, Medicine School, Complutense University of Madrid (UCM). Madrid, Spain

15 ²Grupo de Ciencias Forenses: Genética y Toxicología forenses. Instituto de Investigación
16 Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain.

17 ³ReGiraRocs S.L.U, Recerca, Conservació i Difusó del Patrimoni Cultural i Natural dels Pirineus,
18 Principat d'Andorra

19 ⁴Grupo de Arqueología de las Dinámicas Sociales (IMF-CSIC), Barcelona, Spain

20 ⁵Institute of Forensic Sciences (INCIFOR), Forensic Genetics Service, Santiago de Compostela
21 University. Santiago de Compostela - A Coruña – Spain

22 ⁶Human Identification area, Genome4care SL, Santiago de Compostela, Spain.

23 ⁷Center of Molecular Anthropology for Ancient DNA Studies, Department of Biology, University
24 of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy

25 ⁸Unitat d'Antropologia Biològica a la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

26 ⁹Medicine School, Complutense University of Madrid. Madrid, Spain

27
28
29
30 ***Corresponding author:**

31 Cláudia Gomes

32 Laboratory of Forensic and Population Genetics, Laboratory of Forensic and Population
33 Genetics, Legal Medicine, Psychiatry and Pathology Department, Medicine School,
34 Complutense University of Madrid (UCM). Madrid, Spain

35 Grupo de Ciencias Forenses: Genética y Toxicología forenses. Instituto de Investigación
36 Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

37 E-Mail: clopes01@ucm.es (CG)

44 **Highlights**

45

- 46 • Potential biological family unit buried together
- 47 • Molecular determination of the gender of the Neolithic infant by High Throughput
48 Sequencing.
- 49 • External phenotype of Pyrenean Neolithic individuals determined for the first time

50

51 **Abstract**

52

53 One of the most important Neolithic necropolises in the north-east of the Iberian Peninsula is
54 La Feixa del Moro (3975-3790 cal. BC), located at 1335 mamsl in the Pyrenees (Juberri, Sant
55 Julia de Lòria, Andorra). Within the scarcity of multiple simultaneous Neolithic burials, the
56 main importance of La Feixa del Moro lies in the fact that it is one of the very few cases to
57 suggest a biological family burial, comprising two adults and a newborn baby.

58 Accordingly, the purpose of the present work was the multidisciplinary interpretation of the
59 necropolis in the Neolithic context of the Pyrenees, on a potential route between the Iberian
60 Peninsula and Europe. Therefore, kinship and biogeographic analyses were performed, as well
61 as external visible characteristics phenotyping.

62 Our results suggest the possibility of a traditional nuclear family, pointing to a very probable
63 relation between the newborn and both adults. First, two mitochondrial haplotypes and two
64 lineages were determined: H1, for the presumable mother and newborn, and U5, for the
65 presumed father. Second, regarding their physical appearance, they all had brown eyes, the
66 adult female and the neonate had dark brown hair, while the adult male's hair was dark red-
67 brown. Finally, it was possible to confirm the sex of two of the individuals, as the newborn
68 baby gender was also confirmed by the High Throughput Sequencing analysis.

69 The multidisciplinary analysis of the La Feixa del Moro burial place envisions a very probable
70 familial burial. Not only does the genetic evidence point to biological kinship, but also the
71 archaeological record indicates a habitational area surrounding the burial site. The similar
72 artefacts and the care shown during the funerary ritual suggest a probable biological Neolithic
73 family.

74

75 **Keywords**

76

77 Neolithic, Pyrenees, Kinship, Physical appearance, HTS

78

79

80

81

82 **Introduction**

83

84 Human beings are thought to have been organized into family groups since the beginning of
85 their history in society [1]. If kinship relationships are a practically universal human experience,
86 the concepts of “family” and “family bond” are closely dependent on space and time [2]. While
87 the concept of *kinship* refers to biological bonds between individuals who share identical
88 genetic information, *family* may also refer to a possible biological relation, but also to a social
89 and affective coexistence between individuals. Thereby, the concept of family can affect where
90 and with whom an individual will be buried, and vice-versa [3], informing us about the kind of
91 relationship between an individual and a community, or other individuals, buried in the same
92 necropolis, or even in the same grave.

93 In this way, the analysis of necropolises and funerary practices in the context of family
94 behaviour can provide unique information about biological and social aspects [4,5].
95 Additionally, kinship investigation among and between different burials improves knowledge
96 of other elements of collective societies, such as family *status*, dimensions of inequality, or
97 even possible marriage patterns [4]. Such studies are even more informative in the case of past
98 societies, owing to the lack of graphic records of their social and collective organization, mainly
99 in the Neolithic, when collective burials, simultaneous or not, are rarely observed.

100

101 ***La Feixa del Moro* archaeological site**

102 Some Early Neolithic sites in the hinterland are indicative of routes across the Pyrenees and/or
103 along major rivers, such as the Ebro. One of the most important Neolithic burials in the
104 northeast of the Iberian Peninsula is La Feixa del Moro (Juberri, Sant Julia de Lòria, Andorra)
105 (Fig.1.), due to its singular location and archaeological records [6-8].

106 La Feixa del Moro necropolis (3975-3790 cal. BC) is located on the southern slopes of the
107 Pyrenees, at 1335m altitude and 455m above the valley floor, on the left bank of the Gran
108 Valira river, belonging to the population of Juberri (Sant Julia de Lòria, Andorra). Its geographic
109 location in the Principality of Andorra, in the high Pyrenean mountains, as well as the
110 magnitude of the discovery, with several habitat areas next to three burials, some of them
111 with rich buried materials (Supporting Information 1 (S.) Table), have made this necropolis a
112 point of reference for research on the process and implantation of Neolithic societies in the
113 Western Mediterranean.

114 The funerary context consisted of three tombs in cists (Figs.2, 3 and 4.), a type of burial
115 structure common in interior areas of the Iberian Peninsula [9]. Each cist and the respective
116 objects found in each one of them, buried with the individuals in the case of Cists 2 and 3, are

117 described in S1 Table. Taking into account that Cist 1 had been previously plundered, the
118 archaeological work carried out was only able to recover the archaeological material, without
119 any signs of buried human remains. Cist 2 contained the skeletal remains of an individual
120 (Fig.5.), possibly 163-167 cm in height, who died at the age of 20-23 years [10]. Finally, four
121 metres southeast from Cist 1, another intact grave was located, Cist 3, which, like the previous
122 ones, was inside a pit excavated in the subsoil. In this case, the burial held two inhumations
123 (Fig.6.): a newborn individual and a female adult, 150-156 cm in height [10]. The neonatal
124 individual was reclining on the left shoulder of the adult, in the dorsal decubitus position. The
125 left scapula-humeral articulation of the adult was not altered, and was in contact with the
126 neonate. This demonstrated that it was a simultaneous burial [8].

127 The present multidisciplinary study aims to interpret this necropolis in terms of the
128 demographic and population genetic Neolithic context of the Pyrenees, to support
129 archaeological hypotheses concerning a possible family structure. For this, the archaeological
130 records (S.1 Table) and previous anthropological investigations [7-8] have been considered
131 within a genetic approach. Namely, a set of different markers were used (autosomal Short
132 Tandem Repeats (STRs), X-Insertion/Deletion (InDels), and mitochondrial DNA (mtDNA)
133 typing), to reveal possible close kinships patterns between the individuals, and to confirm their
134 molecular sex. High Troughoutput Sequencing (HTS) analysis has also been performed.
135 Furthermore, considering the particular geography and localization of La Feixa del Moro, their
136 biogeographical origin was determined by analysing both nuclear information (with ancestry
137 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)) and mtDNA. Finally, external visible characteristics
138 phenotyping (EVCs) was also performed to explore the individuals' genetic characteristics in
139 greater depth.

140

141 **Materials and Methods**

142

143 **2.1 Ethics Statement**

144 Authorisation for the genetic study of the three individuals at La Feixa del Moro burial place,
145 and the consequent destruction of at least one tooth/bone sample per individual was
146 requested from the *Deposito de Patrimoni Cultural de Andorra* (Principality of Andorra).
147 Genetic analysis of the researchers was carried out with previous informed consent.

148

149 **2.2 Archaeological samples**

150 Biological samples were selected by the archaeological team at the *Patrimoni Cultural de*
151 *Andorra* (Principality of Andorra) depot. For the considered individuals, the selected samples

152 were as follows: a) Individual 1 (masculine adult from Cist 2), two small fragments were cut
153 from the right femur and the left tibia, using an electric radial saw; b) for Individual 2 (female
154 adult from Cist 3), a small fragment from the right tibia, and a molar were collected manually;
155 c) Individual 3 (neonate from Cist 3), two complete samples (clavicle and rib). All samples were
156 sent to the genetic laboratory in separate and sterilized small plastic bags, and subsequently
157 within paper envelopes.

158

159 **2.3 Genetic Analysis**

160 Both the DNA extraction and amplification were performed at the Forensic and Population
161 Genetics Laboratory (Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, Spain),
162 specialized in critical DNA analysis – *Lab1*. EVCs analysis was carried out at a second Forensic
163 Genetic Laboratory, also specialized in critical DNA: Forensic Sciences Institute (INCIFOR),
164 (Forensic Genetics Service at Santiago de Compostela University, Santiago de Compostela, A
165 Coruña, Spain) - *Lab2*. Finally, the library preparation protocols for the High Throughput
166 Sequencing (HTS) analysis were performed in a dedicated ancient DNA (aDNA) laboratory, at
167 the Centre of Molecular Anthropology for Ancient DNA studies at the University of Rome Tor
168 Vergata, Italy.

169

170 **2.3.1 Pre-treatment – cleaning of the samples**

171 The samples' external layer was removed with powdered aluminium oxide pressurized by a
172 sand-blaster machine (Dentalfarm™), and then irradiated with UV for 30 minutes, on each side
173 of the sample.

174

175 **2.3.2 DNA extraction**

176 DNA extraction was performed by Extraction Method B, following Gomes et al. (2017a) [11]. In
177 accordance with this method, the samples selected for each individual were analysed in
178 separate processes. Sample 1 was pulverized, and the DNA from Sample 2 was extracted
179 without the physical destruction of the piece.

180

181 **2.3.3 Kinship analysis and molecular sex determination**

182

183 **a) Nuclear Information**

184 To establish possible kinships, and to try to determine the individuals' molecular sex, two types
185 of nuclear information were amplified: autosomal and X-chromosome polymorphisms.
186 VeriFiler™ Express PCR Amplification Kit–(ThermoFisher SCIENTIFIC) was used to amplify

187 autosomal STRs information, according to its respective user's manual, with 40 cycles, and
188 subsequently analysed in an ABI 3500 Genetic Analyzer (ThermoFisher SCIENTIFIC).
189 Additionally, to study X-chromosomal information, 32 X-InDels were also amplified, performing
190 the analysis according to Pereira et al. (2012) [12], with 35 cycles, and then analysed in an ABI
191 3130 Genetic Analyzer (ThermoFisher SCIENTIFIC).

192 Both autosomal and X-InDels allele information were analysed with GeneMapper™ Software 5
193 (ThermoFisher SCIENTIFIC), determining autosomal and X-haplotypes genetic profiles. Close
194 biological relationship likelihood ratios (LR) were computed with Familias3 v3.2 [13] software
195 package, using the frequencies for modern Spanish populations in Garcia et al. (2012) [14], due
196 to the absence of an ancient allelic frequencies database. Considering the obtained genetic
197 profiles, the allelic and *loci* dropout, as well as the observed allele heights (in RFUs), all
198 computations were performed with different allelic dropout values ([0-0.5], with 0.05
199 intervals). The tested hypotheses for the studied individuals were computed as follows: a)
200 Individuals 1 and 3, fatherhood and paternal half-siblings, *versus* unrelated; b) Individuals 1
201 and 2, fatherhood and paternal half-sibling, *versus* unrelated; c) Individuals 2 and 3,
202 motherhood and maternal half-siblings, *versus* unrelated; d) Individuals 1, 2 and 3, parenthood
203 (fatherhood and motherhood), *versus* unrelated.

204

205 **b) Mitochondrial DNA analysis**

206 At the same time, mtDNA analysis was also carried out to determine a possible biological
207 relationship on the maternal side. Thus, hypervariable mitochondrial regions (HV) 1 and 2 (295
208 and 360 base pairs fragment, respectively) were independently amplified at least three times
209 [15,16] in a final volume of 25uL. A positive and two negative controls were always included in
210 each analysis. Each mtDNA amplification was performed according to Method C in Gomes et
211 al. (2017a) [11]. Then, purification was carried out with ExoSAP-IT PCR product Cleanup
212 reagent (ThermoFisher SCIENTIFIC), followed by a Sanger Sequencing reaction accomplished
213 by the Macrogen's sequencing service. The obtained sequences were analysed, defining their
214 respective haplotypes, by running Mutation Surveyor® (Softgenetics) software. Mutations
215 were scored relative to the revised Cambridge reference mtDNA sequence [17].

216

217 **2.3.4 Biogeographic analysis**

218 To study the individuals' most probable origin, both types of information were taken into
219 account, nuclear and mtDNA.

220

221

222 **a) Nuclear polymorphisms**

223 To predict the most probable biogeographic origin with nuclear information, the SNPforID 34-
224 Plex forensic ancestry test was used, analysing 34 SNPs and performing the study according to
225 Philips et al. (2012) and Fondevila et al. (2013) [18-19]. After the analysis in an ABI 3500
226 Genetic Analyzer (ThermoFisher SCIENTIFIC), biogeographic SNPs allele information was
227 analysed using GeneMapper™ Software 5 (ThermoFisher SCIENTIFIC). Finally, statistical
228 parameters and the most probable biogeographical region were obtained with the software
229 *The Snipper* app. suite v.2.5 [18], taking into account the dataset for three major populations:
230 Europe, Africa, and East Asia.

231

232 **b) Mitochondrial DNA analysis**

233 To analyse the maternal origin and determine the most probable haplogroup(s), both HV1 and
234 HV2 regions were analysed, proceeding according to the previously described method (2.3.2
235 Mitochondrial DNA analysis)

236

237 **Whole Genome Sequencing – HTS library preparation**

238 The Illumina double-stranded library was built starting from 20 µl of each DNA, according to
239 Meyer and Kircher (2010) [20]. Then, the amplification products from the library were pooled
240 and purified with Agencourt AMPureXP beads (Beckman Coulter, Inc), and the concentration
241 and size profiles of the purified library were detected by Bioanalyzer 2100 through High
242 Sensitivity DNA chip (Agilent). On the other hand, equimolar concentration pools were
243 submitted to whole-genome HTS (High Throughput Sequencing) on an Illumina HiSeq2500
244 (Illumina, Inc) at MacroGen® (Seoul, South Korea). Finally, raw data obtained from HTS were
245 submitted to the PALEOMIX v1.2.14 bam pipeline [21], and GRCh38 - hg38 was set as a
246 reference genome. Contamination and post-mortem damage estimations have been
247 performed by mapDamage 2.0 [22], available as a part of this automated process. This pipeline
248 cleans the raw data according to Q=20, allowing for the adapter-trimming and the removal of
249 unmapped and MapDamage-filtered reads.

250

251 **c) Population genetics analyses**

252 After haplotype determination, the most probable haplogroup(s) were determined by
253 searching on the HaploGrep 2 online application [23, 24], on EmPOP mtDNA database v4/R11
254 [25, 26], on mtDNAMANAGER [27], and on Phylotree phylogenetic tree [23-24]. Concerning the
255 HaploGrep 2 online application, results are presented according to the percentage of
256 individuals that belong to that haplogroup and share the same haplotype; regarding EmPOP

257 and mtDNAmanager, the relative frequencies are presented considering the number of
258 individuals that share the indicated haplotype on that specific day of the search.

259 Given the isolated location of the La Feixa del Moro burial place, two different analyses were
260 performed to evaluate the presence of a genetic structure, comparing with other European
261 and Near East sequences previously published for the Early Neolithic period. Namely, the
262 analysed sequences were from Spain (N=25), France (N=4), Germany (N=17), United Kingdom
263 (N=25), Iran (N=4), and from the Anatolia region (N=14). The supplementary information about
264 the analysed samples is given in S.11. To evaluate the existence of a genetic structure, an
265 AMOVA and fixation index F_{ST} were performed with Arlequin v.3.5 [28], visualizing the F_{ST}
266 results with an MDS analysis, accomplished with SPSS v.22 (IBM). Haplotype inference was also
267 computed with Arlequin v.3.5, specifically to estimate the haplotypes' frequency and to search
268 for shared haplotypes.

269

270 **2.4 External Visible Characteristics phenotyping**

271 For an external phenotypic prediction, 35 SNPs were analysed in Lab 2 to calculate the most
272 probable hair, skin and eye colour pigmentation [29]. For each external visible characteristic
273 (EVC), the hypotheses considered were: a) *iris pigmentation* (brown, intermediate and blue);
274 b) *hair pigmentation*: (fair versus dark, and for the colour pigmentation: red, blond, brown and
275 black; and c) *skin pigmentation* (white, intermediate and black).

276 Statistical analysis was performed with the online *The Snipper* app suite v2.5 software [30],
277 while being aware of two main difficulties: the absence of an ancient DNA Neolithic database,
278 as well as the absence of a specific present-day Andorran database.

279

280 **2.5 Authenticity criteria**

281 Distinct authenticity criteria were followed, considering the laboratories' infrastructures,
282 methodology and interpretation of the results, as explained in S2. *Genetic material and*
283 *methods - Authenticity criteria and Laboratories dedicated to critical samples sections.*

284 Also, before the genetic analysis, two biochemical essays of macromolecular preservation
285 were performed by the archaeological team, as recommended by Pääbo et al. (2004) [31].
286 Namely, stable isotope analysis ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) was able to determine the collagen content and
287 the individuals' diet, while radiocarbon determinations were also performed. Both studies
288 were carried out and published by Remolins et al. (2016a,b) [7-8].

289

290

291

292 **Results and Discussion**

293

294 Samples 1 and 2 from each individual were processed in different analyses, as explained in the
295 “DNA extraction” section of the supporting information, including their blanks and positive
296 controls. Regarding all DNA amplifications (mtDNA and nuclear markers), all the samples from
297 that PCR reaction were discarded when positive controls did not produce results, and only the
298 samples whose positive results agreed with the positive control expected profile were
299 analysed. No sign of DNA amplification was observed when analysing extraction blanks from
300 each DNA extraction, so both extractions were accepted. Similarly, each amplification
301 presented in S.3 Table was considered valid since both of each amplification blank were clean.

302

303 Regarding the antiquity of each sample, associated with probable DNA damage, each
304 polymorphism in mtDNA was accepted only when it was observed at least twice, obtained by
305 independent amplifications. Also, the degraded stage of the samples was observed since the
306 best amplified mitochondrial fragments were the smallest (S.3 Table). In contrast, results from
307 X-InDels (S.6 Table) for Individual 2 were not accepted since it was not possible to obtain each
308 result at least twice. However, it indicates non-contamination during extraction, since it was
309 impossible to obtain any large X-InDel fragment.

310 In general, the results for Individuals 1 and 3 were better than those obtained for individual 2
311 (S.3, 4, 6, 7, 9, 10 Tables). Surprisingly, although archaeological information pointed to a
312 simultaneous burial, when comparing the results for Individuals 2 and 3, considering both
313 mtDNA and nuDNA, it is Individual 3 that produces the best results, as it was possible to
314 achieve nuDNA, autosomal and X-InDels, and HTS results (S.18). It might be thought that
315 because Individual 3 was a neonate, the samples would produce worse results due to their
316 probable fragility, unlike the expectations for Individual 2, whose samples were visually better
317 preserved. As evidenced by Gomes et al. (2015) [56], it is not the age of the individual at the
318 time of death, but the subsequent sample preservation that directly affects whether or not
319 results are obtained.

320

321 **Biogeographic analysis**

322 Regarding the prediction of the samples’ origin with nuclear markers (S.7 and S.8 Tables),
323 results for Individual 1 allow his classification as European. Indeed, this sample seems to be
324 similar to what would be expected from a modern randomly-selected European individual [32].
325 On the other hand, Individual 2 shows a higher rate of DNA degradation, with results for only
326 seven SNPs (S7 Table), so we consider this result inconclusive. Finally, Individual 3 shows a low
327 LR between the two most likely hypotheses for his origin, Europe and Africa, although Europe

328 is the most likely one (S8 Table). We cannot make certain assumptions about the origin of this
329 sample with only these results.

330

331 Observing our mtDNA results (S3 Table), two maternal lineages were determined: H1e2c +
332 204C and U5b. Both results are coincident with preceding published data from the same
333 historical period. Concerning specifically U5b, this lineage is described by Szécsényi-Nagy et al.
334 (2017) [33] as the “typical Iberian hunter-gatherer mtDNA haplogroup”. Similarly, Sanchez-
335 Quinto et al. (2012) [34], and Fu et al. (2016) [35] have found U5b in hunter-gatherers’
336 samples, specifically in North Iberia in large proportions. These studies let us envisage that
337 Individual 1 could have been a descendent of a presumable autochthonous maternal lineage of
338 hunter-gatherers, possibly present in the region for many millennia before him. However, the
339 H haplogroup has two distinctive features: a remarkably extensive geographic distribution and
340 a very high frequency in most of its range in West Eurasian regions [36,37]. Besides its
341 probable origin in the Middle East, due to its high frequency and wide distribution, this
342 haplogroup most likely participated in all subsequent gene flow waves during the Neolithic
343 diffusion in western Eurasia, together with the spread of agriculture from the Near East [36].
344 Also, according to Szécsényi-Nagy et al. (2017) [33], H haplogroup frequencies were higher in
345 the Iberian Early Neolithic than in Central Europe in the same period.

346 On the other hand, our AMOVA results indicate diversity could be appreciated both between
347 and within populations with a very similar percentage (S.12 Table). Observing the F_{ST} results,
348 taking into account the obtained significant p -values, La Feixa del Moro exhibits considerable
349 genetic differences with two German populations (AlemSur, $F_{ST}=0.62094$, $p=0.00500 \pm 0.0007$;
350 AlemCENT $F_{ST}=0.44167$, $p=0.00676 \pm 0.0007$) and with two populations from the Anatolia
351 region (AnatYENI $F_{ST}=0.44582$, $p=0.01088 \pm 0.0009$; AnatMENT $F_{ST}=0.54123$, $p=0.01755 \pm$
352 0.0012), possibly explained by the geographic distance, much more pronounced in the case of
353 the Anatolian regions. These results are also interesting (S.12-14 Tables, Spanish populations
354 compared with Iranian populations and Anatolia region), since it allows us to suppose
355 considerable genetic distance between these Early Neolithic populations in the Iberian
356 Peninsula and the Near East populations, from where the first waves of Neolithic colonization
357 are supposed to have emerged. Indeed, analysing the information provided by the shared
358 haplotype study (S.16 Table), Individual 1 from La Feixa del Moro shares the same haplotype
359 with several other individuals from the modern territories of Spain, France and the United
360 Kingdom, precisely those territories that surround the area of the Pyrenees, also supported by
361 the MDS analysis (S.15 Table). Once again, such information confirms that, although the
362 individuals lived in La Feixa del Moro region or spent most of their lives there, the genetic

363 information seems to indicate that there was no genetic isolation. Similar results have been
364 obtained with Y-chromosome in modern samples of neighboring regions (López-Parra et al.,
365 2009). In this sense, the presence of these mitochondrial lineages, U5 and H1, in our studied
366 individuals reinforces the idea that already in the Neolithic period, the Pyrenees were not seen
367 as a barrier but as a means of communication between the Iberian Peninsula and the rest of
368 Europe by land. This idea is also suggested by archaeological records, such as the presence of
369 tools and ornaments: the calaite beads extracted from the Prehistoric Mines at Gavà (Baix
370 Llobregat, Catalonia, Spain), the flint blades, from the south of France, and the polished stone
371 axes, presumably from the Alps [6-8]

372

373 **Kinship analysis and molecular sex determination**

374 In the La Feixa del Moro burials, the genetic analysis allowed us to preview some possible
375 biological kinship hypothesis, based on both mtDNA and nuclear DNA (nuDNA).

376 Analysing mtDNA information, it was possible to define two different haplotypes (S.3 Table),
377 one for Individual 1, and another for Individuals 2 and 3. Also, any kinship on the maternal side
378 between Individual 1 and the other two could be discarded.

379 Observing nuDNA results (S.4 Table), although the number of obtained markers was very low,
380 it was possible to test different hypothesis between all of them (S.5 Table), bearing in mind
381 maternal kinships previously discarded by the mitochondrial results. So, the most probable
382 kinship between Individuals 1 and 3 was “fatherhood”, followed by paternal half-siblings (S5
383 Table). Considering the X-InDels information, except for two markers, the individuals never
384 share the same information for the obtained markers (S.6 Table). This situation is compatible
385 with paternal brothers, as well as with a hypothetical paternity, since regarding the paternal
386 lineage only the Y chromosome is transmitted.

387 Regarding the hypotheses for Individuals 1 and 2 (S.5 Table), our results discard a biological
388 kinship between them.

389 On the other hand, observing the results for Individuals 2 and 3, from the mtDNA point of
390 view, both individuals should be related on the maternal side, since they share the same
391 haplotype. Considering nuclear information (S.4, 5 Tables), the most probable relationship was
392 mother-son, followed by maternal half-siblings. If Individuals 2 and 3 were siblings, it must be
393 on the maternal side, since they share the same mtDNA. Taking into account archaeological
394 records, it is harder to explain a simultaneous burial for individuals 2 and 3 if they were siblings
395 than if they were mother-son. In this case, X-Indels information (S.6 Table) would have been
396 crucial to differentiate between the two kinship hypotheses (siblings *versus* motherhood).

397 It is also possible to discard a possible incestuous relationship between these individuals, since
398 individual 1 has different mtDNA.

399 When testing the kinship hypothesis, “father-mother-son” was more probable than “all
400 unrelated” (S.5 Table). Regarding the archaeological context, Individual 1 was buried in a
401 separate cist, with specific ornaments. If they were effectively connected by biological ties, a
402 different burial place could indicate for example a distinct social *status*, or that it was not a
403 cultural pattern to inhumate together individuals related on the paternal side, or persons who
404 died in different times. In the case of Individuals 2 and 3, the first kinship their relative
405 positions suggested was maternity, also complemented by the simultaneous burial
406 information.

407

408 Regarding molecular sex determination, the genetic analysis indicates Individual 1 was male.
409 Although it was not possible to obtain the amelogenin marker, it was possible to obtain at
410 least twice the Y-Indel, only present in male individuals, confirming a previous anthropological
411 determination. On the other hand, it was also possible to define the foetus molecular sex, also
412 male, by both the Y-Indel and the HTS result. For both individuals, a situation of heterozygous
413 alleles for X-Indels was never found, corroborating the male results. From the point of view of
414 the archaeological record, the presence of polished axes surrounding the baby could now be
415 justified by the determined molecular sex. Indeed, this is an archaeological tool associated
416 mainly with men, possibly indicating that different roles for men and women could be already
417 defined from childhood, at least in Iberian Neolithic society [7,8,39].

418 However, it was not possible to confirm the anthropological result for Individual 2, since the
419 absence of the Y-Indel in all analyses is not a confirmation of a female determination because
420 of the highly degraded state of Individual 2 samples.

421

422 **External Visible Characteristics (EVCs) Analysis**

423 In the case of Individual 2, even with very limited SNP results (S.9 Table), the strength of the
424 calculation seems similar to values obtained for complete profiles. The obtained values for
425 Individuals 2 and 3 (S.10 Table) give enough confidence to assume dark brown hair. For
426 Individual 1, the result is not so clear and the dark brown-red result should be accepted with
427 reservations. It was not possible to obtain results for skin pigmentation since no results were
428 obtained for key SNPs. For eye colour prediction (S.9 Table), positive results were achieved for
429 the three individuals, since the most informative SNP (rs12913832) were genotyped. Since for
430 all individuals the profile is almost complete, we can be sure that the samples' eye colour

431 would be brown or similar, as LR results are similar to a contemporaneous fresh sample (S.9,
432 10 Tables).

433 The ability to predict EVCs from ancient samples reveals new perspectives for research on old
434 populations, as this could allow studies to directly address archaeological and evolutionary
435 questions associated with both temporal and geographic origins of the genetic variants
436 underlying phenotypes [40]. In this sense, our results are particularly significant, since they
437 inform about a Neolithic population in a place that could be thought to be of difficult access
438 and perhaps even isolated. However, the obtained results demonstrate a very common
439 phenotype, even in modern populations. These results can be interpreted as further evidence
440 that points in the direction of the non-isolation of these populations already in Neolithic times.
441 Nonetheless, we have assumed that for these phenotypical traits, the association between
442 gene, alleles and the consequent phenotype should be similar to the situation in modern
443 populations. Furthermore, we are aware of the importance of studying a more significant
444 number of individuals from prehistoric societies to understand possible patterns of genetic
445 bottlenecks or founder effect linked to external phenotype characteristics. That would allow us
446 to characterise ancient populations with greater precision, and also to understand the origins
447 of modern populations.

448

449 the archaeological evidence indicates that, at this time (3975-3790 cal. BC), La Feixa del Moro
450 region was not only a place of passage between Europe and the Iberian Peninsula, but it was
451 already inhabited [7-8]. According to Remolins et al. (2016 a,b), Llovera (1984), and Vives
452 (1987), several contemporary structures were located and widely studied, among which there
453 are several silos for storing grain [41], habitat structures [42], axe workshops [43], and other
454 social structures have been found in the local, confirming a stable and repeated settlement
455 over time. Indeed, the results for the individuals' diet [7-8] reveal a considerable percentage of
456 cereal consumption, and they were no longer completely dependent on cattle. While it is not
457 yet clear if these cereals were grown locally, were acquired by exchange, or a mixture of both,
458 their presence reinforces the idea of a settlement, since food storage suggests on-site
459 habitation. Stratigraphically, many of these structures intersect, evidencing the strong human
460 pressure during the middle Neolithic period of that space. The presence of the postcardial
461 deposits [44] of Camp de Colomer and Carrer Llinàs 28 is also significant, where a multitude of
462 food storage, habitat and processing structures have also been documented [45], a few meters
463 from the Feixa del Moro. On the other hand, the paleoclimatic data [46, 47] for that period in
464 the Pyrenees does not reveal a climate generally much colder than today. In fact, from the
465 ancient Neolithic, it is detected, through pollen indicators, a progressive deforestation of the

466 high mountain areas of the Valleys of Andorra linked to increasingly intense pastoral activities
467 [48]. This recurring human presence in the territory during the Neolithic period has also been
468 confirmed with the discovery of archaeological evidence at the head of the valleys [49]. In this
469 sense, these three individuals would certainly belong to that Neolithic community, and the
470 possibility that they were just passing by at any given time can be discarded. This idea is also
471 supported by archaeological evidence which demonstrates care during the burial and possible
472 funeral ceremony, given the objects found in both cists [7-8] (S.1Table).

473 In this way, our kinship results associated with archaeological evidence of domestic sites
474 reinforce the hypothesis of a possible familial burial. It is not very common to find biological
475 bonds between individuals buried together in Neolithic necropolises. Indeed, although Meyer
476 et al. (2018) [50] were able to identify biological patterns at two Neolithic burial places in
477 Saxony-Anhalt (Germany), Gomes et al. (2017b) [51], in their study of the Neolithic Can
478 Gamburg archaeological site (Catalonia, Spain), found no biological relationships between close
479 buried individuals, similar to Juras et al. (2017) [52], when studying individuals buried together
480 in the Krusza Zamkowa (Poland) archaeological site.

481 In large communities, like modern populations, individuals could randomly share equal genetic
482 information, with no close kinship between them. In the case of La Feixa del Moro, due to the
483 harsh environment, associated with high altitude, it is supposed that Neolithic communities
484 would not be too numerous. Therefore, the presence of genetically similar individuals
485 reinforces the idea of kinship between them, and so in this context, a nuclear family.

486

487 **Conclusions**

488 Despite the small number of the studied individuals, and the absence so far of other evidence
489 of human remains at La Feixa del Moro, the record seems to indicate that small groups of
490 biologically-related individuals settled in the Pyrenees. Specifically, in the case of the La Feixa
491 del Moro necropolis, the idea of the presence of a family goes beyond the “kinship” concept,
492 since not only the genetic results, but also the anthropological studies, the archaeological
493 record associated with each individual and the funeral rite point to a family nucleus.

494 At the same time, the individuals’ molecular origin seems to be an indicator of possible
495 population movement between the south of France and the Iberian Peninsula, also supported
496 by archaeological records. Our results indicate that already in the Neolithic period the
497 Pyrenees were not seen as a barrier but as a means of communication between the Iberian
498 Peninsula and the rest of Europe by land.

499

500

501 **Conflict of Interest**

502 None.

503

504 **Acknowledgements**

505 The authors would like to express their gratitude to the archaeological and anthropological
506 working teams that performed previously studies, proposing crucial hypotheses. Also, to thank
507 Xavier Llovera, director of the excavation of Feixa del Moro, his total willingness to study and
508 review the information of the necropolis.

509 Moreover, we also would like to thank three important institutions, which without their
510 support this study would have not been possible. First, the *Patrimoni Cultural de Andorra*
511 (Principality of Andorra) for allowing us to study these Neolithic individuals; then, *INCIFOR -*
512 *Forensic Genetics Service* for their hospitality, generosity to use their facilities, equipment, as
513 all necessary reagents, and for their constant support; and to *Centro di Antropologia*
514 *molecolare per lo studio del DNA antico* (Prof. Olga Rickards) , Department of Biology, University
515 of Rome Tor Vergata, for allowing the MPS analysis.

516 This work was supported by the research project (Santander-Universidad Complutense de
517 Madrid, Spain, <https://www.bancosantander.es/es/universidades>) [G/6401400/8000] for C.G;
518 by the [HAR2015-67323-C2-2-P] project, funded by the Ministerio de Ciencia, Innovación y
519 Universidades of the Spanish Government (<http://www.ciencia.gob.es/portal/site/MICINN/>)
520 and the BES2010-035322, and by [PR41/17-21018] project, funded by Banco Santander-
521 Universidad Complutense de Madrid, Spain
522 (<https://www.bancosantander.es/es/universidades>). The funders had no role in study design,
523 data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

524

525 **References**

- 526 1. Maynes M, Waltner A. *The Family: A World History*. New Oxford World History. 2012. 1st edition.
527 2. Johnson KM, Paul KS. Bioarchaeology and Kinship: Integrating Theory, Social Relatedness, and
528 Biology in Ancient Family Research. *J Archaeol Res*. 2016; 24(1):75-123.
529 3. Harper N, Tung T. Burial Treatment Based on Kinship? The Hellenistic–Roman and Venetian-Period
530 Tombs in the Malloura Valley. *Crossroads and Boundaries" The Archaeology of Past and*
531 *Present in the Malloura Valley, Cyprus*. 2012. Chapter: 19. *American Schools of Oriental*
532 *Research*.
533 4. Baca M, Doan K, Sobczyk M, Stankovic A, Węgleński P. Ancient DNA reveals kinship burial patterns
534 of a pre-Columbian Andean community. *BMC Genet*. 2012; 13: 30.
535 5. Deguilloux M, Pemonge M, Mendisco F, Thibon D, Cartron I, Castex D. Ancient DNA and kinship
536 analysis of human remains deposited in Merovingian necropolis sarcophagi (Jau Dignac et
537 Loirac, France, 7th-8th century AD). *J. Archaeol. Sci.*. 2014; 41: 399-405.
538 6. Llovera X. *Carta arqueològica del Principat d'Andorra*. Tesis de licenciatura. 1984. Universidad
539 Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

- 540 7. Remolins G, Gibaja J, Allières F, Fontanals M, Martin P, Masclans A. The Neolithic of La Feixa del
541 Moro (Juberri, Andorra): new data on the first farming communities in the Pyrenees. a:
542 Comptes Rendus Palevol. 2016a. 15 (5): 537 - 554.
- 543 8. Remolins G, Gibaja J, Allières F, Duboscq S, Fontanals M, Martin P, et al. La nécropole néolithique de
544 la Feixa del Moro (Juberri, Andorre): examen et nouvelles données. Bulletin de la Société
545 Préhistorique Française. 2016b; 13(2): 265 - 289.
- 546 9. Castany J. Els megàlits neolítics del "Solsonià". Tesis doctoral, Universitat de Lleida. 2008; Lleida,
547 Spain.
- 548 10. Vives, E. La Feixa del Moro a Juberri. Antropologia de les restes neolítiques. Butlletí del Comitè
549 Andorrà de Ciències Històriques. 1987; 2: 9-14.
- 550 11. Gomes C, Alonso A, Marquina D, Guardiola M, López-Matayoshi C, Palomo-Díez S, et al. Inhibiting
551 inhibitors: "Inhibiting inhibitors": Preliminary results of a new "DNA extraction-amplification"
552 disinhibition technique in critical human samples Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 2017a; 6:
553 e197-e199.
- 554 12. Pereira R, Pereira V, Gomes I, Tomas C, Morling N, Amorim A et al. A method for the analysis of 32
555 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. Int J Legal Med. 2012;
556 126(1):97-105.
- 557 13. Kling D, Tillmar A, Egeland T. Familias 3-Extensions and new functionality. Forensic Sci Int Genet.
558 2014; 13:121-127.
- 559 14. Garcia O, Alonso J, Cano JA, Garcia R, Luque G, Martín P, Yuso I, Maulini S, Parra D, Yurrebaso I.
560 Population genetic data and concordance study for the kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX
561 17 System and Investigator ESSplex in Spain. Forensic Sci Int Genet. 2012; 6: e78-9.
- 562 15. Gamba C, Fernández E, Tirado M, Deguilloux M, Pemonge M, Utrilla P, et al. Ancient DNA from an
563 Early Neolithic Iberian population supports a pioneer colonization by first farmers. Mol. Ecol.
564 2011; 21 (1): 45-56.
- 565 16. Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, Pokorak E, Prinz M, Salas A,
566 Schneider PM, Parsons TJ. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics:
567 revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. Forensic Sci Int Genet. 2014;
568 13, 134-142.
- 569 17. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and
570 revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet.
571 1999; 23(2):147.
- 572 18. Phillips C, Fondevila M, Lareau M. A 34-plex Autosomal SNP Single Base Extension Assay for
573 Ancestry Investigations. In: Alonso A. (eds) DNA Electrophoresis Protocols for Forensic
574 Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). 2012. vol 830. Humana
575 Press.
- 576 19. Fondevila M, Phillips C, Santos C, Freire A, Vallone P, Butler J, et al. Revision of the SNPforID 34-
577 plex forensic ancestry test: Assay enhancements, standard reference sample genotypes and
578 extended population studies. Forensic Sci Int Genet. 2013; 7(1): 63-74
- 579 20. Meyer M, Kircher M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture
580 and sequencing. Cold Spring Harb Protoc. 2010;2010(6):pdb.prot5448.
- 581 21. Schubert M, Ermini L, Sarkissian CD, Jónsson H, Ginolhac A, Schaefer R, Martin MD, Fernández R,
582 Kircher M, McCue M, Willerslev E, and Orlando L. "Characterization of ancient and modern
583 genomes by SNP detection and phylogenomic and metagenomic analysis using PALEOMIX".
584 Nat Protoc. 2014;9(5):1056-82.
- 585 22. Ginolhac A, Rasmussen M, Gilbert MT, Willerslev E, Orlando L. mapDamage: testing for damage
586 patterns in ancient DNA sequences. Bioinformatics. 2011;27(15):2153-2155.
- 587 23. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial
588 DNA variation. Hum Mutat. 2009; 30(2):E386-E394.

- 589 24. van Oven M. PhyloTree Build 17: Growing the human mitochondrial DNA tree. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2015; 5: 9-11.
- 590
- 591 25. Huber N, Parson W, Dür A. Next generation database search algorithm for forensic mitogenome
- 592 analyses. *Forensic Sci Int Genet.* 2018; 37:204-214.
- 593 26. Parson W, Arne Dür. EMPOP-"A forensic mtDNA database", *Forensic Sci Int Genet.* 2007; 1(2):88-
- 594 92.
- 595 27. Lee H, Song I, Ha E, Cho S, Yang W, Kyoung-Jin. mtDNAManager: A Web-based tool for the
- 596 management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences. *BMC*
- 597 *Bioinformatics.* 2008; 9:483.
- 598 28. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population
- 599 genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564-7.
- 600 29. Ruiz Y, Phillips C, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, Casares de Cal M, Cruz R, et al.. Further
- 601 development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7:28-40.
- 602 30. Phillips C, Salas A, Sanchez J, Fondevila M, Gomez-Tato A, Alvarez-Dios J, et al. Inferring ancestral
- 603 origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int*
- 604 *Genet.* 2007; 1(3-4): 273-280.
- 605 31. Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Després V, Hebler J, Rohland N. Genetic analyses from ancient
- 606 DNA. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004; 38, 645-679.
- 607 32. Phillips C, Prieto L, Fondevila M, Salas A, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, et al. Ancestry Analysis in
- 608 the 11-M Madrid Bomb Attack Investigation. *PLoS ONE.* 2009 4(8): e6583.
- 609 33. Szecsenyi-Nagy A, Roth C, Brandt G, Rihueté-Herrada C, Tejedor-Rodríguez C, Held P, et al. The
- 610 maternal genetic make-up of the Iberian Peninsula between the Neolithic and the Early
- 611 Bronze Age. *Nature Sci Rep.* 2017; 7:15644.
- 612 34. Sanchez-Quinto, F. Schroeder H, Ramirez O, Ávila-Arcos M, Pybus M, et al. Genomic affinities of
- 613 two 7,000-year-old Iberian hunter-gatherers. *Curr. Biol.* 2012; 22, 1494-9.
- 614 35. Fu Q, Posth C, Hajdinjak M, Petr M, Mallick S, Fernandes D, et al. The genetic history of Ice Age
- 615 Europe. *Nature.* 2016; 534 (7606).
- 616 36. Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, et al. The molecular dissection of
- 617 mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source
- 618 for the European gene pool. *Am J Hum Genet.* 2004; 75(5):910-8.
- 619 37. Barral-Arca R, Pischedda S, Gómez-Carballa A, Pastoriza A, Mosquera-Miguel A, et al. Meta-Analysis
- 620 of Mitochondrial DNA Variation in the Iberian Peninsula. *PLOS ONE.* 2016; 11(7): e0159735.
- 621 38. López-Parra A. *Genética y Geografía: Estudio de cinco poblaciones de los Pirineos en el contexto de*
- 622 *la Península Ibérica para marcadores del cromosoma Y.* PhD Thesis. 2008. Universidad:
- 623 *Complutense de Madrid*
- 624 39. Masclans, A.; Remolins, G.. La gestió de les eines de pedra polida a la zona arqueològica de Juberrí
- 625 (St. Julià de Lòria, Andorra). In G. Remolins and J.F. Gibaja (Eds.): *Les Valls d'Andorra durant el*
- 626 *Neolític: un encreuament de camins al centre dels Pirineus.* Monografies del MAC. 2018; 2:
- 627 271-290.
- 628 40. Fortes G, Speller C, Hofreiter M, King T. Phenotypes from ancient DNA: Approaches, insights and
- 629 prospects. *BioEssays,* 2013; 35(8), 690-695.
- 630 41. Prats, G. Hábitat y estructuras domésticas en Feixa del Moro: cabañas, silos y hogares. In:
- 631 Remolins, G., Gibaja, J. F., (Ed.) *Les Valls d'Andorra durant el neolític: un encreuament de*
- 632 *camins al centre dels Pirineus.* Monografies del MAC 2, Museu d'Arqueologia de Catalunya,
- 633 Barcelona. p. 143- 158
- 634 42. Garcia, E. Estudi del material en terra documentat al jaciment de Feixa del Moro (Juberrí, Andorra).
- 635 Proposta de restitució de la planta de l'assentament. In: Remolins, G., Gibaja, J. F., (Ed.) *Les*
- 636 *Valls d'Andorra durant el neolític: un encreuament de camins al centre dels Pirineus.*
- 637 *Monografies del MAC 2, Museu d'Arqueologia de Catalunya, Barcelona.* p. 159- 184
- 638 43. Figuls, A; Vaquer, J., Welle, O., Grandia, F., Taller manufacturer d'indústria lítica polida
- 639 metamòrfica a Juberrí destinada a l'abastiment i a l'intercanvi dins dels canals de distribució

- 640 nord-sud. In: Remolins, G., Gibaja, J. F., (Ed.) Les Valls d'Andorra durant el neolític: un
641 encreuament de camins al centre dels Pirineus. Monografies del MAC 2, Museu d'Arqueologia
642 de Catalunya, Barcelona. p. 291 - 326
- 643 44. Oms, F. X., Mazzuco, N., Santos, F. J., Guilaine, J., Subirà, M. E., Gibaja, J. F., Les dades
644 radiocarbòniques i la seva anàlisi durant el neolític a les Valls d'Andorra. In: Remolins, G.,
645 Gibaja, J. F., (Ed.) Les Valls d'Andorra durant el neolític: un encreuament de camins al centre
646 dels Pirineus. Monografies del MAC 2, Museu d'Arqueologia de Catalunya, Barcelona. p. 91-
647 100
- 648 45. Fortó, A., Vidal, A., Pujol, F., Maese, X., Els jaciments de Camp del Colomer i Carrer Llinàs 28. In:
649 Remolins, G., Gibaja, J. F., (Ed.) Les Valls d'Andorra durant el neolític: un encreuament de
650 camins al centre dels Pirineus. Monografies del MAC 2, Museu d'Arqueologia de Catalunya,
651 Barcelona. p. 131- 142
- 652 46. Turu, V., Paleoclima y Geomorfología de los Valles de Andorra. In: Remolins, G., Gibaja, J. F., (Ed.)
653 Les Valls d'Andorra durant el neolític: un encreuament de camins al centre dels Pirineus.
654 Monografies del MAC 2, Museu d'Arqueologia de Catalunya, Barcelona. p. 103- 112
- 655 47. Burjachs, F., Yll, E., Paleoambiente paleobotánico. In: Remolins, G., Gibaja, J. F., (Ed.) Les Valls
656 d'Andorra durant el neolític: un encreuament de camins al centre dels Pirineus. Monografies
657 del MAC 2, Museu d'Arqueologia de Catalunya, Barcelona. p. 113 – 120
- 658 48. Ejarque, A., Génesis y configuración microregional de un paisaje cultural pirenaico de alta montaña
659 durante el Holoceno: estudio polínico y de otros indicadores paleoambientales en el valle del
660 Madriu-Perafita-Claror (Andorra).. PhD Thesis. 2009.Universitat Rovira i Virgili.
- 661 49. Orengo, H., Arqueología de un paisaje cultural pirenaico de alta montaña. Dinámicas de ocupación
662 del valle del Madriu-Perafita-Claror (Andorra). 2010. PhD Thesis. Universitat Rovira i Virgili
- 663 50. Meyer C, Knipper C, Nicklisch N, Múnster A, Kürbis O, Dresely V, et al. Early Neolithic executions
664 indicated by clustered cranial trauma in the mass grave of Halberstadt. *Nat Commun.* 2018; 9:
665 2472.
- 666 51. Gomes C, Gibaja J, Roig J, Baeza-Richer C, López-Matayoshi C, López-Parra A, et al. Biological
667 kinship analysis in extremely critical samples: The case of a Spanish Neolithic necropolis.
668 *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2017b; 6: e421-e422.
- 669 52. Juras A, Chyleński M, Krenz-Niedba M, Malmström H, Ehler E, Pospieszny L, et al. Investigating
670 kinship of Neolithic post-LBK human remains from Krusza Zamkowa, Poland using ancient
671 DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2017; 26: 30-39
- 672 53. Béraud-Colomb E, Roubin R, Martin J, et al. Reply to Cooper. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):1002-
673 1003.
- 674 54. Fernández E. Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca
675 mediterránea. PhD Thesis. 2005. Universitat de Barcelona.
- 676 55. Pinto N, Gusmão L, Amorim A. X-chromosome markers in kinship testing: A generalisation of the
677 IBD approach identifying situations where their contribution is crucial. *Forensic Sci Int Genet.*
678 2011; 5(1): 27-32.
- 679 56. González-Fortes G, Tassi F, Trucchi E, Henneberger K, Paijmans J, Díez-del-Molino D, et al. A
680 western route of prehistoric human migration from Africa into the Iberian Peninsula.
681 *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2019; 286(1895), 20182288.
- 682 57. Olalde I, Brace S, Allentoft M, Armit I, Kristiansen K, Booth T, et al. The Beaker phenomenon and
683 the genomic transformation of northwest Europe. *Nature.* 2018; 555(7695), 190–196.
- 684 58. Haak W, Lazaridis I, Patterson N, Rohland N, Mallick S, Llamas B, et al. Massive migration from the
685 steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature.* 2015; 522(7555), 207–
686 211.
- 687 59. Lipson M, Szécsényi-Nagy A, Mallick S, Pósa A, Stégmár B, Keerl V, et al. Parallel
688 palaeogenomic transects reveal complex genetic history of early European farmers.
689 *Nature.* 2017; 551(7680), 368–372.

- 690 60. Broushaki F, Thomas M, Link V, López S, van Dorp L, Kirsanow K, et al. Early Neolithic genomes
691 from the eastern Fertile Crescent. *Science*. 2016; 353(6298), 499–503.
- 692 61. Mathieson I, Lazaridis I, Rohland N, Mallick S, Patterson N, Roodenberg S, et al. Genome-wide
693 patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature*. 2015; 528(7583), 499–503.
- 694 62. Hofmanová Z, Kreutzer S, Hellenthal G, Sell C, Diekmann Y, Díez-del-Molino, et al. Early farmers
695 from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans. *Proceedings of the National
696 Academy of Sciences*. 2016; 113(25), 6886–6891.

Supporting Information

S.1 Table. Cist descriptions as well as the objects found buried with individuals in their respective cist, according to Remolins et al. (2016a, b).

Cist	Cist Description	Objects Found
1	As it had been plundered previously, the archaeological study was only able to retrieve six fragments of undiagnostic pottery, a calaite bead and three flint blades, with no evidence of human remains.	<ul style="list-style-type: none"> - 6 potsherds (without identification codes) - 4 flint blades (without identification codes) - 1 variscite bead (without identification code) - 2 axes (without identification codes) - 6 axes (without identification codes)
2 (Fig.7)	A second tomb was found five metres to the north-west of Cist 1. This cist contained the skeletal remains of one individual who was probably male, 163-167cm tall, with an age at death of 20-23 years. The body, in dorsal decubitus position, had the arms extended along the body with hyperflexed elbows and the hands on the shoulders. The legs were separated, with hyperflexed hips and knees, and with the feet near the buttocks. This was not the primary position but was caused by the decomposition of the body inside a confined space, possibly a shroud. The grave goods included 4 flint blades, 77 variscite beads, 5 polished stone axes, a wild boar tusk, 37 bone awls and some potsherds (possibly not connected with the grave goods but coming from the sediment that filled the cist). The 14C AMS date for human osseous remains was 5025±45 BP, which calibrated to two sigmas with the IntCal13 curve indicated the burial took place in the early fourth millennium (3946-3711 cal BC).	<ul style="list-style-type: none"> - 3 flint blades (FM-2-57, FM-2-103, one missing) - 56 variscite beads (FM-2-1/50, FM-2-A/I) - approx. 21 variscite beads (without identification codes) - 5 axes (FM-2-51/55) - 1 wild boar tusk (FM-2-99) - 34 bone awls (FM-2-100/102, FM-2-104/132, FM-2-110/111, FM-2-113/120, FM-2-122/125, FM-2-127/129, FM-2-131/132, without identification codes) - 46 potsherds (FM-2-56, FM-2-391/394, FM-2-400) - 1 flint blade (FM-2-53) - 5 bone awls (FM-2-109, FM-2-112, FM-2-121, FM-2-126, FM-2-130) - 9 potsherds (FM-2-392)
3 (Fig.8)	Another intact burial, <i>Cist 3</i> , was found four metres south-east of Cist 1. Like the others, it was constructed with stone slabs inside a pit dug into the ground. In this case, the cist held two individuals, a neonate and an adult who was probably female, 150-156cm tall. The body of the adult was in dorsal decubitus position, with the head moved towards the right. The right arm was extended along the body with the elbow flexed 90° and the hand on the abdomen. The left arm was slightly separated from the body, with the elbow flexed 65° and the hand also on the abdomen. Although the position of the legs is unknown, the feet were together near the buttocks. The neonate lay over the left shoulder of the adult in dorsal decubitus position. The adult's left scapula-humerus articulation was not altered as it remained in connection. Numerous grave goods accompanied the deceased: a small polished stone axe, two flint blades, 14 variscite beads, 16 bone awls, 2 spatulas, 2 beads made from ribs and a wild boar tusk. The radiocarbon date obtained for the adult individual was 5095±45 BP, which calibrated to two sigmas with the IntCal13 curve also situates this burial in the early fourth millennium (3975-3790 cal BC).	<ul style="list-style-type: none"> - 1 flint blade (FM-2-216) - 14 variscite beads (FM-2-205/215, FM-2-220/222) - 1 axe (FM-2-217) - 1 bone needle (FM-2-N) - 6 bone awls (FM-2-31, FM-2-33/34, FM-2-36/38) - 2 bone spatulas (FM-2-30, without identification code) - 2 beads made from ribs (FM-2-14, FM-2-297) - 1 wild boar tusk (FM-2-296) - 1 flint blade (FM-2-204) - 10 bone awls (FM-2-32, FM-2-35, FM-2-39/44, FM-2-218/219) - 2 potsherds (coord. number 28, 29)

Fig.7. Cist 2, which contained the skeletal remains of the adult male, 163-167cm tall, with an age at death of 20-23 years, and some of the material found buried with the individual. (Author: Remolins G)

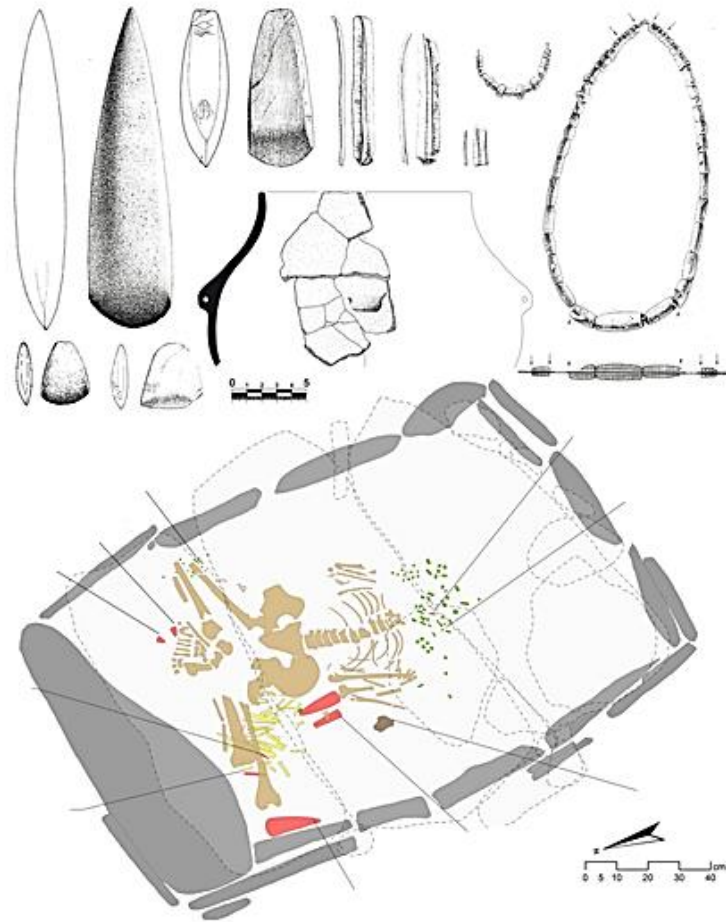
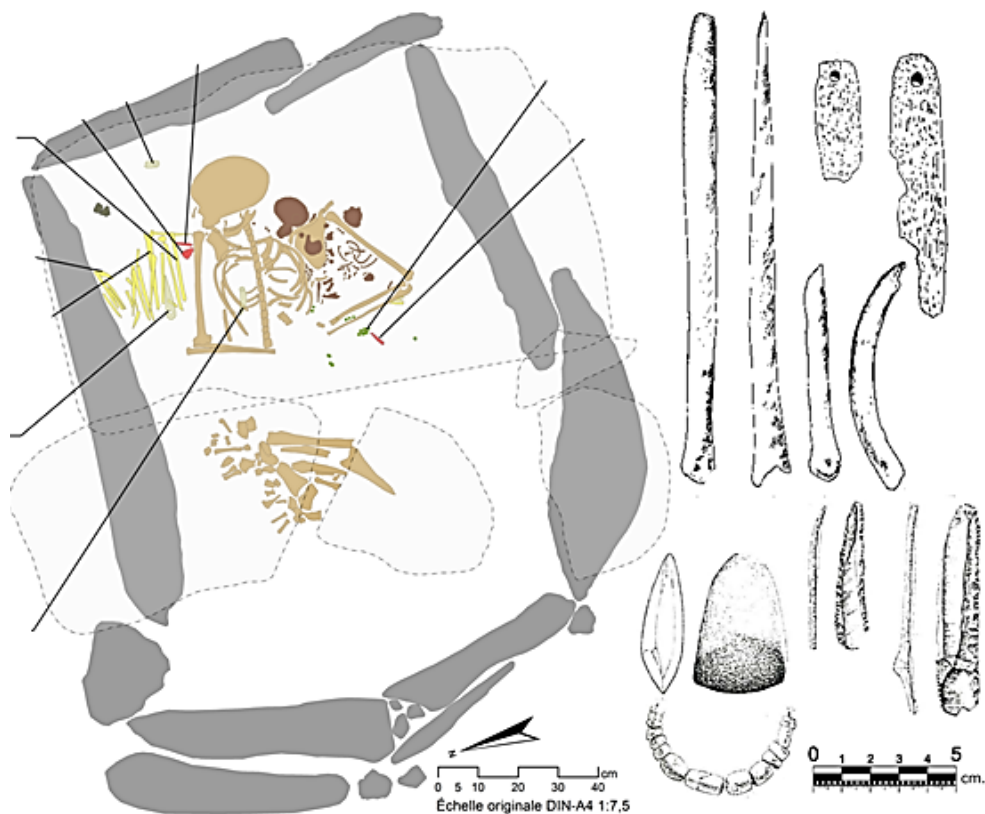


Fig.8. Cist 3, which held two individuals, a neonate and an adult who was probably female, 150-156cm tall, and some of the material found buried with both individuals. (Author: Remolins G)



S.2. Genetic material and methods

Authenticity criteria

Concerning infrastructures, as explained in the next section, “*Laboratories dedicated to critical samples*”, physical separation of all laboratories and their disposition followed Beráud-Colomb et al., (1997) [53] and Fernández, 2005 [54] recommendations.

In the same way, methodological procedures observed several recommendations, as explained as follows. First, according to Fernández, 2005 [54] a) “elimination of the external layer of each sample, previously to DNA extraction”, b) “aliquot PCR reagents and periodic PCR with these reagents”, and, according to Pääbo et al., 2004 [31] and Fernández, 2005 [54] indications, c) “blank controls” both during extraction and amplifications were also performed and amplified. Equally, following the guidelines of Parson et al., 2014 [16], d) both negative and positive controls were carried out through the entire laboratory process, e) all sequences were read with software, never manually, f) final haplotype for each individual was reported taking into account the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS, NC001807), including the interpretation range (excluding primer sequence information), g) both alignment and notation of mtDNA sequences were performed taking into consideration the mitochondrial phylogeny, and h) one of the three tools used for haplogroups searching was EmPOP. Finally, and also according to the same authors, i) determined haplotypes were subjected to analytical EmPOP tools that indicate phylogenetic checks for data quality control, like “Phylogenetic alignment” quality and “Cost”, which indicates the quality of the haplogroup prevision.

Results interpretation was also performed taking into account several recommendations. According to Pääbo et al., 2004, [31] and Fernández, 2005 [54], a) “amplifications repeated from the same extract”, but also, different samples from the same individual, b) the “inverse correlation between amplification efficiency and the length of amplification and, c) “reproducibility” of all results. According to Pääbo et al., 2004, d) “biochemical essays of macromolecular preservation” and e) “exclusion of nuclear insertions of mtDNA” were also taken into consideration, and finally, following the guidelines of Parson et al., 2014 [16], consensus sequences were based on redundant sequence information, using forward and reverse sequencing reactions, giving a mitochondrial polymorphism when it was obtained at least twice.

Laboratories dedicated to critical samples

For critical human DNA, our department has two exclusive areas, physically separated from other laboratories and offices. Both areas are periodically cleaned by the researchers themselves, with pure bleach, detergent and UV light during at least 12 hours, not allowing anyone outside the investigation to enter these sections.

The first area, called “Extraction Lab”, is divided into three separate rooms (A1, A2, and A3). All of them with two UV fluorescent lights in each room, externally operable. In A1, the investigator completely changes his/her outfit, putting on an impermeable suit, not allowing perspiration, covering from the head to the feet, head cap, glasses, two surgical masks, shoe cover, and two pairs of gloves. Also in A1 is located the freezer, at -24C, where samples are stored before the analysis, each one inside a labelled paper bag, inside a proper paper box specific for each case. A2

is a specific room where critical samples are pre-treated, also equipped with a vertical laminar flow safety cabinet and all equipment needed for sample cleaning and grinding. Finally, the A3 area is a room with exclusive reagents and equipment for DNA extraction, with sterile disposable material, and a biological safety vertical laminar flow cabinet. All cabinets from all areas are equipped with temporised UV light.

The second area, called "PCR lab", is divided into two independent rooms (A4 and A5). The first room, A4, has the same function as A1 for the "extraction lab", the difference is that in this place there are two independent freezers, one for storing DNA extracts, and the other for reagents for DNA amplification. The A5 room is where mixes for PCRs are performed in a biological safety vertical laminar flow cabinet, with access to only one researcher at each time.

Apart from these two areas dedicated to critical DNA, PCRs amplification and posterior analyses are performed in a forensic general laboratory, also with restricted personal access.

S.3 Table. Mitochondrial haplotypes determined for HV1 and HV2 regions, for the three studied individuals. In grey are represented DNA amplifications that were unable to obtain results, indicating the theoretical amplified ranges.

Individual	Sample	Range	Result	Individual	Sample	Range	Result	Individual	Sample	Range	Result
1	1	16105-16230	---	2	1	16105-16200	CRS	3	1	16110-16198	CRS
	1	16105-16230	---		1	16105-16200	CRS		1	16105-16230	---
	1	16105-16220	CRS		1	16105-16230	---		1	16105-16230	CRS
	2	16105-16220	CRS		2	16105-16230	---		2	16105-16200	CRS
	2	16105-16230	CRS		2	16105-16199	CRS		2	16105-16225	CRS
	1	16160-16280	---		2	16105-16230	---		2	16105-16230	---
	1	16150-16270	CRS		1	16145-16280	CRS		1	16145-16280	---
	1	16160-16280	---		1	16145-16280	---		1	16145-16280	---
	2	16160-16280	CRS		1	16145-16280	---		1	16145-16280	---
	2	16165-16280	CRS		2	16160-16280	CRS		2	16159-16280	CRS
	1	16275-16400	---		2	16165-16280	CRS		2	16145-16280	CRS
	1	16275-16400	---		2	16145-16280	---		2	16145-16280	---
	1	16275-16400	---		1	16270-16400	---		1	16270-16400	---
	2	16275-16400	CRS		1	16275-16400	CRS		1	16275-16400	CRS
	2	16335-16400	CRS		1	16270-16400	---		1	16270-16400	CRS
	2	16275-16400	CRS		1	16275-16398	CRS		1	16275-16398	---
	1	16235-16360	---		2	16270-16400	---		2	16270-16400	---
	1	16235-16360	---		2	16281-16398	CRS		2	16281-16398	CRS
	1	16235-16360	---		2	16271-16398	CRS		2	16271-16398	---
	2	16235-16360	16270T		2	16270-16398	CRS		2	16270-16398	---
2	16232-16350	16270T	1	16235-16360	---	1	16235-16360	---			
2	16232-16360	16270T	1	16235-16360	---	1	16240-16360	CRS			
1	55-129	---	1	16235-16360	---	1	16235-16350	CRS			
1	55-120	---	1	16235-16360	---	1	16235-16360	---			
2	55-129	---	2	16235-16360	---	2	16232-16340	CRS			
2	72-129	---	2	16232-16350	---	2	16232-16350	CRS			
2	55-129	---	2	16232-16360	CRS	2	16232-16355	CRS			
1	120-375	---	2	16235-16360	---	2	16232-16352	CRS			
1	120-375	---	1	55-129	73G	1	55-129	---			
1	120-375	263G 309.1C	1	55-120	73G	1	55-120	---			

2	270-390	263G 309.1C
2	120-310	263G 309.1C
2	160-375	263G 309.1C
1	8-80	---
1	8-80	---
2	8-80	---
2	8-80	---
2	8-80	---
1	80-340	263G 309.1C
1	80-340	-
2	80-340	---
2	83-349	263G 309.1C
2	80-343	---
2	80-349	263G 309.1C

2	55-129	---
2	72-129	73G
2	55-129	73G
1	120-375	---
1	220-316	263G 315.1C
1	145-317	150T 204C
2	155-370	204C 263G
2	120-375	---
2	219-316	263G 315.1C
1	8-80	73G
1	8-80	73G
2	8-80	73G
2	8-80	---
2	8-80	73G
1	82-316	204C 263G
1	82-316	204C 263G
1	80-340	---
2	83-349	---
2	80-343	---
2	82-340	204C 263G

2	55-128	73G
2	55-129	73G
1	120-375	---
1	220-316	263G 315.1C
1	145-317	---
2	207-390	263G 315.1C
2	120-375	204C 263G
2	219-316	204C 263G
1	8-80	73G
1	8-80	---
2	8-80	---
2	8-80	73G
1	82-316	---
1	82-316	---
1	80-340	---
2	83-349	---
2	80-343	204C 263G
2	82-350	---

Individual 1 consensus profile: (16105-16400; 8-390) 16270T 73G 263G

Individual 2 consensus profile: (16105-16400; 8-390) 73G 263G 204C 315.1C

Individual 3 consensus profile: (16105-16400; 8-390) 73G 263G 204C 315.1C

Individual 1 haplogroup **U5b** frequency on AmtDB, considering the Neolithic period, in Europe: 26 /337 (searched on 14th May 2020)

Individual 2 and 3 haplogroup **H1** frequency on AmtDB, considering the Neolithic period, in Europe: 18/337 (searched on 14th May 2020)

S.4 Table. Autosomal genetic profiles obtained for the three studied individuals. Although all alleles were confirmed at least twice, an allelic dropout event cannot be excluded in homozygotic cases, taking into account the degradation state and the antiquity of the samples. In the following table only markers with replicated results for at least one of the individuals are presented; and (---) was the symbol used to represent the lack of results for other individual(s).

Individuals	Y-INDEL	D2S441	D19S433	TH01	D22S1045	D10S1248	D2S1338
1	2	13	11	9-9.3	12	12-15	16
2	---	10.1	---	---	---	13-15	---
3	2	10.1	---	9.3	12	13-15	---

S.5 Table. Likelihood ratios computed for close kinship hypotheses, considering the three Neolithic individuals' autosomal results. Results were obtained with Familias3 (Kling et al., 2014) software, v 3.1.9.6. For all considered kinships, the maximum LR value was obtained for a 0.05 allelic dropout value, and the minimum LR for a 0.5 allelic dropout value. *Relationships like paternal/maternal half-siblings and paternal/maternal uncle/aunt-nephew are indistinguishable when using autosomal markers (Pinto et al., 2011), for this reason, LRs were computed for only one of the indistinguishable kinships.

Individuals	Biological kinship Hypothesis	Allelic dropout	Likelihood ratio
1 and 3	Hypothesis 1: Fatherhood	[0.05-0.5]	LR = [78.664 - 89.599]
	H1: Fatherhood	[0.05-0.5]	LR = [84.216 – 102.440]
	*H1: Paternal half-siblings	[0.05-0.5]	LR = [35.512 - 40.347]
1 and 2	H1: Fatherhood	[0.05-0.5]	LR = [0.813-0.904]
	*H1: Paternal half-siblings	[0.05-0.5]	LR = [0.924-0.965]
2 and 3	H1: Motherhood	[0.05-0.5]	LR = [145.799-154.719]
	*H1: Maternal half-siblings	[0.05-0.5]	LR = [55.205 - 58.537]
1, 2 and 3	H1: Individuals 1 and 2 are parents of ind.3 H2: They are unrelated	[0.05-0.5]	LR = [12278.703 – 15849.625]

S.6 Table. Genetic Profiles obtained for the studied 32 X-InDels for the three studied individuals. The analyses were performed according to Pereira et al., (2012) [12], and the results reproduced at least twice. It was not possible to obtain replicated results for Individual 2. Only markers with results for at least one of the individuals are represented, and (---) is the symbol used to indicate the lack of results for other individual(s).

Ind.	3736	3730	1361	329	3716	2637	198	3703	3722	3732	3760	3701	1839	3754	2652	1511	2692	357	356	243	3727	3753
1	1	1	---	2	1	1	1	---	2	2	1	2	1	2	2	1	1	---	2	2	2	---
2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3	---	---	2	---	---	---	---	2	1	2	---	1	---	---	---	---	---	2	---	1	2	2

S.7 Table. Results for the 34 autosomal SNPs analysis for the ancestry determination. "--" - without results

Markers	F11	A8	S4	SGM2	A7	A13	M42	S8	F31	665	549	510	F8	F16	A10	160	982
Individual 1	AA	GG	CT	AA	--	--	--	--	--	CC	CT	AA	TT	--	GG	AA	AA
Individual 2	AA	--	--	AA	--	--	--	--	--	--	--	--	CC	--	AG	--	--
Individual 3	AA	--	CC	AA	--	--	--	--	--	--	CC	--	--	--	AG	AA	AA
Markers	F24	E1	F5	F14	778	181	760	NB9	NB1	F7	A9	M17	F2	E8	M63	788	A12
Individual 1	CC	--	CT	GG	TT	CT	AA	--	AC	CC	AG	--	CC	--	--	--	--
Individual 2	--	--	--	--	--	--	--	--	GG	CC	AA	--	--	--	--	--	--
Individual 3	CC	--	CC	--	TT	CC	--	--	AG	CC	AG	TT	--	--	--	--	--

S8 Table. Likelihood ratio results for ancestry, based on the 34 autosomal SNPs results for the three Neolithic individuals. The snipper software does not indicate LR values superior to 10^9 .

Individual	Hypothesis 1	Hypothesis 2	Likelihood Ratio
1	Europe	East-Asia	7 580 578
		Africa	$> 10^9$
2	Africa	Europe	54.72
		East-Asia	104
3	Europe	East-Asia	10.05
		Africa	8.23

S.9 Table. Results for the 35 autosomal SNPs for the EVC determination, meaning “Eye pigmentation”, “Hair pigmentation” “Skin pigmentation”. “--”- without result.

Eye pigmentation				Hair pigmentation				Skin pigmentation			
SNP	Ind1	Ind2	Ind3	SNP	Ind1	Ind2	Ind3	SNP	Ind1	Ind2	Ind3
rs12896399	AC	CC	CC	rs7495174	TT	TT	TT	rs13289	CG	--	CG
rs11636232	CC	--	--	AG64	AG	AG	--	rs10777129	--	--	--
rs16891982	GG	GG	GG	rs4778138	--	--	--	rs1426654	--	--	--
rs1667394	CT	CC	CC	rs1805009	--	GG	GG	rs1408799	--	AA	--
rs12913832	AA	AA	AA	rs35264875	--	--	--	rs6058017	--	--	--
rs12203592	--	--	--	rs1805006	CC	--	--	rs3829241	--	--	--
rs4778241	TT	TT	GN	rs12931267	CG	--	GG	rs6119471	CC	--	--
rs7183877	--	AA	AA	rs28777	AA	--	AC	rs1448484	GG	--	--
rs1393350	--	GG	GG	rs1805007	--	--	--	rs2402130	AA	--	GG
rs4778232	--	GG	--								
rs8024968	--	AG	--								
rs1800407	--	--	--								
rs1129038	--	--	--								

S.10 Table. Likelihood ratio results for external visible characteristics (EVCs), based on the 35 autosomal SNPs results for the three individuals. The snipper software does not indicate LR values superior to 10^9 . Concerning hair pigmentation, none of the samples gave results for the two most informative SNPs (rs1129038 and rs11547464).

EVC	Individual	Hypothesis 1	Hypothesis 2	LR
Eye colour	1	Brown	Intermediate	118
		Brown	Blue	$>10^9$
	2	Brown	Intermediate	236
		Brown	Blue	$>10^9$
	3	Brown	Intermediate	173
		Brown	Blue	$>10^9$
Hair colour	1	Red	Brown	2.23
		Red	Black	76.50
	2	Brown	Red	2.61
		Brown	Black	3.30
	3	Red	Brown	4.37
		Red	Black	4.69
	1	Dark	Fair	37.73
	2	Dark	Fair	135
	3	Dark	Fair	448

S.11. Early Neolithic populations studied for the population statistical analysis, and the respective studies from where information was analysed. From each publication, only individuals that belong to the Early Neolithic period were analysed.

1. "EspVAL": N=1 ([Gonzalez-Fortes et al. 2019](#))
2. "EspEIROS": N=2 ([Gonzalez-Fortes et al. 2019](#))
3. "EspCANGAMB": N=17 (Partially published on [Gomes et al., 2017b](#); unpublished data from the PhD Thesis of the corresponding author)
4. "EspLLORD": N=3 (unpublished data from the PhD Thesis of the corresponding author)
5. "EspFEIXA": N=3 (present study)
6. "FranSUR": N=4 ([Olalde et al. 2018](#))
7. "AlemSUR": N=9 ([Haak et al. 2015](#))
8. "AlemCENT": N=10 ([Haak et al. 2015](#); [Lipson et al. 2017](#))
9. "UK_SCOTL1": N=1 ([Olalde et al. 2018](#))
10. "UK_SCOTL2": N=2 ([Olalde et al. 2018](#))
11. "UK_SCOTL3": N=3 ([Olalde et al. 2018](#))
12. "UK_SCOTL4": N=7 ([Olalde et al. 2018](#))
13. "UK_SCOTL5": N=14 ([Olalde et al. 2018](#))
14. "UK_ENGL": N=6 ([Olalde et al. 2018](#))
15. "IranW": N=1 ([Broushaki et al. 2016](#))
16. "IranAH": N=3 ([Broushaki et al. 2016](#))
17. "AnatYENI": N=7 ([Mathieson et al. 2015](#))
18. "AnatMENT": N=5 ([Mathieson et al. 2015](#))
19. "AnatBAR": N=2 ([Hofmanova et al. 2016](#))

S12 Table. Analysis of molecular variance (AMOVA), comparing La Feixa del Moro necropolis with 18 other sites from the Early Neolithic period. We considered 10,100 permutations and the Tajima and Nei distance method.

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	18	173.871	1.71919 Va	47.10 %
Within populations	70	135.146	1.93066 Vb	52.90 %
Total	88	309.018	3.64985	---
Fixation Index			0.47103	

S.13 Table. Analysis of the fixation index F_{ST} , comparing La Feixa del Moro necropolis with mitochondrial sequences from 18 other sites from the Early Neolithic period. We considered 10,100 permutations and the Tajima and Nei distance method.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	0.00000																			
2	1.00000	0.00000																		1. "EspVAL" (Spain)
3	0.03909	0.48170	0.00000																	2. "EspEIROS" (Spain)
4	0.19875	0.33333	0.31400	0.00000																3. "EspCANGAMB" (Spain)
5	0.60124	0.82010	0.12403	0.44437	0.00000															4. "EspLLORD" (Spain)
6	0.00001	0.12141	0.26632	0.00001	0.26359	0.00000														5. " EspFEIXA " (Spain)
7	0.54784	0.61758	0.65725	0.53486	0.62094	0.52637	0.00000													6. "FranSUR" (France)
8	0.30647	0.43042	0.58964	0.44298	0.44167	0.45318	0.03804	0.00000												7. "AlemSUR" (Germany)
9	1.00000	1.00000	0.49630	0.50296	0.82010	0.25926	0.64534	0.41591	0.00000											8. "AlemCENT" (Germany)
10	1.00000	1.00000	0.00001	0.00001	0.00000	0.00001	0.47687	0.20932	1.00000	0.00000										9. "UK_SCOTL1" (United Kingdom)
11	0.24986	0.57455	0.27617	0.41835	0.07428	0.21407	0.61841	0.44876	0.57455	0.00001	0.00000									10. "UK_SCOTL2" (United Kingdom)
12	0.00001	0.00001	0.06682	0.02241	0.00001	0.02036	0.52683	0.41950	0.00001	0.00001	0.07922	0.00000								11. "UK_SCOTL3" (United Kingdom)
13	0.00001	0.15388	0.08713	0.00799	0.02775	0.00726	0.52840	0.46022	0.15376	0.00001	0.11279	0.00001	0.00000							12. "UK_SCOTL4" (United Kingdom)
14	0.00001	0.18028	0.19944	0.16904	0.02908	0.15952	0.58690	0.45332	0.09744	0.00001	0.14749	0.00001	0.00001	0.00000						13. "UK_SCOTL5" (United Kingdom)
15	1.00000	1.00000	0.86197	0.82771	0.95641	0.77190	0.81964	0.71224	1.00000	1.00000	0.87721	0.66836	0.74367	0.77930	0.00000					14. "UK_ENGL" (United Kingdom)
16	0.70453	0.74063	0.84282	0.77500	0.82752	0.75592	0.81147	0.73502	0.74063	0.68278	0.79259	0.70027	0.74542	0.76466	0.00001	0.00000				15. "IranW" (Iran)
17	0.28777	0.43268	0.59177	0.47759	0.44582	0.48769	0.15822	0.00001	0.41557	0.18512	0.46077	0.39474	0.45367	0.43484	0.71675	0.74040	0.00000			16. "IranAH" (Iran)
18	0.40820	0.51692	0.63832	0.56152	0.54123	0.55355	0.19668	0.00001	0.49360	0.31311	0.53789	0.44194	0.49312	0.47431	0.78113	0.77894	0.00001	0.00000		17. "AnatYENI" (Anatolian region)
19	0.00001	0.19918	0.21102	0.20995	0.01093	0.12485	0.58073	0.36975	0.10811	0.00001	0.07412	0.00001	0.00001	0.00001	0.75748	0.73247	0.33996	0.40073	0.00000	18. "AnatMENT" (Anatolian region)
																				19. "AnatBAR" (Anatolia region)

S.14 Table. Significance values of p , associated with the analysis of F_{ST} in the deposits of the Neolithic period, for a value of $p = 0.05$ and 10,100 permutations.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*								
2	0.99990 ± 0.0000	*							
3	0.55661 ± 0.0050	0.05578 ± 0.0022	*						
4	0.49995 ± 0.0046	0.49603 ± 0.0049	0.01157 ± 0.0011	*					
5	0.24556 ± 0.0043	0.25194 ± 0.0038	0.10705 ± 0.0033	0.19851 ± 0.0036	*				
6	0.60778 ± 0.0047	0.19322 ± 0.0042	0.00314 ± 0.0006	0.77492 ± 0.0041	0.08891 ± 0.0028	*			
7	0.09999 ± 0.0028	0.10205 ± 0.0027	0.00000 ± 0.0000	0.00461 ± 0.0008	0.00500 ± 0.0007	0.00137 ± 0.0003	*		
8	0.11381 ± 0.0034	0.11352 ± 0.0029	0.00000 ± 0.0000	0.00618 ± 0.0008	0.00676 ± 0.0007	0.00186 ± 0.0004	0.22566 ± 0.0039	*	
9	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	*
10	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000
11	0.25233 ± 0.0040	0.24154 ± 0.0040	0.01578 ± 0.0013	0.20704 ± 0.0040	0.59661 ± 0.0047	0.05833 ± 0.0020	0.00471 ± 0.0007	0.00667 ± 0.0007	0.25370 ± 0.0044
12	0.99990 ± 0.0000	0.50191 ± 0.0044	0.10175 ± 0.0032	0.35859 ± 0.0046	0.61219 ± 0.0047	0.31350 ± 0.0043	0.00029 ± 0.0002	0.00078 ± 0.0003	0.66964 ± 0.0044
13	0.90726 ± 0.0033	0.27488 ± 0.0044	0.00814 ± 0.0008	0.42466 ± 0.0049	0.36222 ± 0.0045	0.38496 ± 0.0049	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	0.27488 ± 0.0044
14	0.67307 ± 0.0049	0.33654 ± 0.0046	0.00441 ± 0.0007	0.16587 ± 0.0040	0.38232 ± 0.0054	0.08274 ± 0.0027	0.00059 ± 0.0002	0.00098 ± 0.0003	0.50495 ± 0.0053
15	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000	0.99990 ± 0.0000
16	0.24811 ± 0.0041	0.24605 ± 0.0042	0.00108 ± 0.0003	0.09685 ± 0.0029	0.09970 ± 0.0031	0.02862 ± 0.0019	0.00520 ± 0.0007	0.00569 ± 0.0008	0.24831 ± 0.0042
17	0.25399 ± 0.0044	0.12381 ± 0.0031	0.00000 ± 0.0000	0.00961 ± 0.0008	0.01088 ± 0.0009	0.00265 ± 0.0005	0.02039 ± 0.0014	0.65396 ± 0.0045	0.12558 ± 0.0036
18	0.17096 ± 0.0034	0.17253 ± 0.0037	0.00020 ± 0.0001	0.01676 ± 0.0011	0.01755 ± 0.0012	0.00774 ± 0.0010	0.03853 ± 0.0020	0.79267 ± 0.0046	0.16724 ± 0.0033
19	0.99990 ± 0.0000	0.33565 ± 0.0044	0.05950 ± 0.0024	0.30134 ± 0.0047	0.49672 ± 0.0040	0.20086 ± 0.0043	0.01716 ± 0.0013	0.04402 ± 0.0019	0.66043 ± 0.0043

* (Continues on next page)

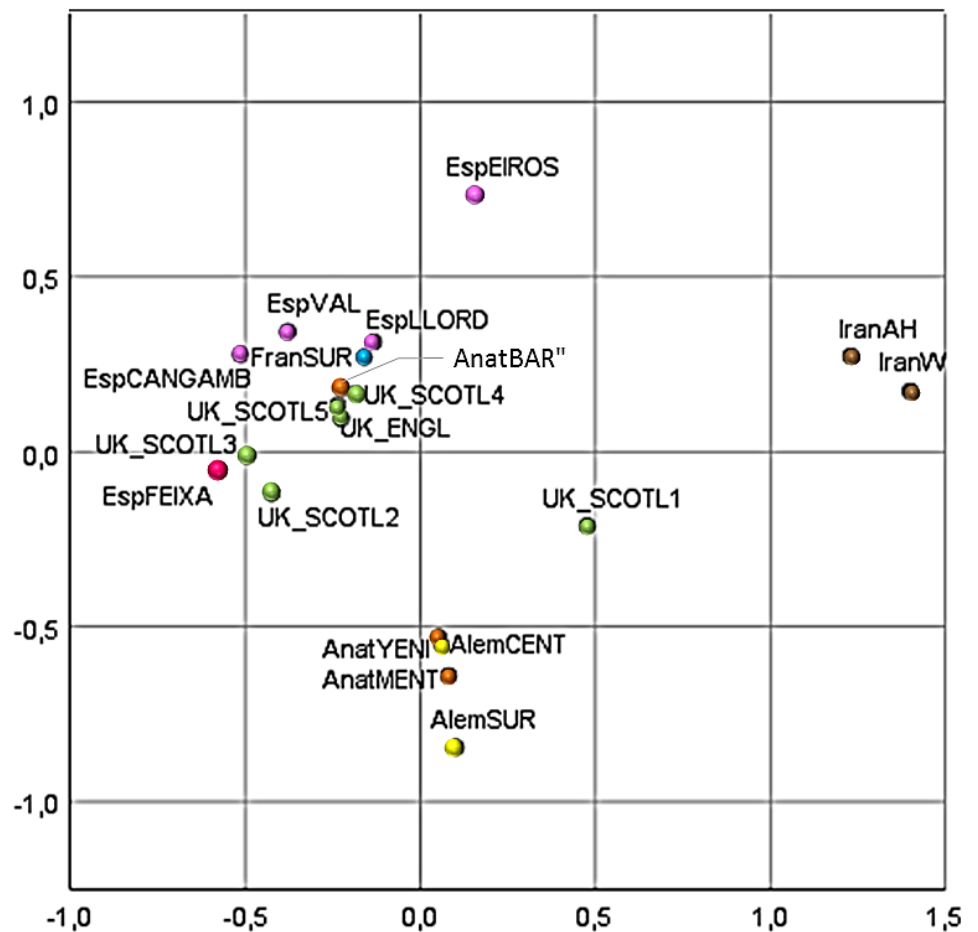
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
10	*									
11	0.99990 ±0.0000	*								
12	0.99990 ±0.0000	0.27438 ±0.0042	*							
13	0.99990 ±0.0000	0.07842 ±0.0027	0.90570 ±0.0029	*						
14	0.83404 ±0.0042	0.12656 ±0.0031	0.78992 ±0.0036	0.66846 ±0.0044	*					
15	0.99990 ±0.0000	0.99990 ±0.0000	0.99990 ±0.0000	0.99990 ±0.0000	0.99990 ±0.0000	*				
16	0.24213 ±0.0043	0.09725 ±0.0029	0.01745 ±0.0013	0.00206 ±0.0004	0.01725 ±0.0013	0.99990 ±0.0000	*			
17	0.37555 ±0.0048	0.00696 ±0.0008	0.00137 ±0.0003	0.00010 ±0.0001	0.00118 ±0.0003	0.12675 ±0.0031	0.00921 ±0.0010	*		
18	0.32242 ±0.0049	0.01568 ±0.0012	0.00814 ±0.0009	0.00049 ±0.0002	0.00755 ±0.0008	0.16920 ±0.0033	0.01941 ±0.0014	0.98069 ±0.0013	*	
19	0.99990 ±0.0000	0.29732 ±0.0052	0.99990 ±0.0000	0.81796 ±0.0042	0.99990 ±0.0000	0.33114 ±0.0051	0.09950 ±0.0029	0.02549 ±0.0014	0.05333 ±0.0021	*

1. "EspVAL" (Spain)
2. "EspEIROS" (Spain)
3. "EspCANGAMB" (Spain)
4. "EspLLORD" (Spain)
5. "**EspFEIXA**" (Spain)
6. "FranSUR" (France)
7. "AlemSUR" (Germany)
8. "AlemCENT" (Germany)
9. "UK_SCOTL1" (United Kingdom)
10. "UK_SCOTL2" (United Kingdom)
11. "UK_SCOTL3" (United Kingdom)
12. "UK_SCOTL4" (United Kingdom)
13. "UK_SCOTL5" (United Kingdom)
14. "UK_ENGL" (United Kingdom)
15. "IranW" (Iran)
16. "IranAH" (Iran)
17. "AnatYENI" (Anatolian region)
18. "AnatMENT" (Anatolian region)
19. "AnatBAR" (Anatolia region)

S.15 Table. Multidimensional Scaling analysis (MDS) based on the obtained F_{ST} genetic matrix (**S.13 Table**), performed with PROXSCAL method, considering La Feixa del Moro necropolis and the 18 other sites from the Early Neolithic period, indicated in Table S.11.

Parameter	Value
Stress	0.10994
Dispersion Accounted For	0.89006
Tucker's congruence coefficient	0.94343

- "EspVAL" (Spain)
- "EspEIROS" (Spain)
- "EspCANGAMB" (Spain)
- "EspLLORD" (Spain)
- "EspFEIXA" (Spain)
- "FranSUR" (France)
- "AlemSUR" (Germany)
- "AlemCENT" (Germany)
- "UK_SCOTL1" (United Kingdom)
- "UK_SCOTL2" (United Kingdom)
- "UK_SCOTL3" (United Kingdom)
- "UK_SCOTL4" (United Kingdom)
- "UK_SCOTL5" (United Kingdom)
- "UK_ENGL" (United Kingdom)
- "IranW" (Iran)
- "IranAH" (Iran)
- "AnatYENI" (Anatolian region)
- "AnatMENT" (Anatolian region)
- "AnatBAR" (Anatolia region)



S.16 Table. Mitochondrial haplotypes shared among the considered populations, namely, La Feixa del Moro necropolis and the 18 other sites from the Early Neolithic period, indicated on S.11 Table.

Populations	EspFEIXA (present study)	EspCANGAMB (Spain)	FranSUR (France)	UK_SCOTL2 (United Kingdom)
EspFEIXA (Spain) Present study	2A = 3A	1A = 569 1A = 1534 1A = 256 1A = 583 1A = 246 1A = 1858	1A = 14303	1A = 12796

S.17 Table. Mitochondrial haplotype frequency estimation for the individuals from La Feixa del Moro necropolis.

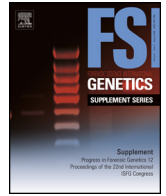
Individuals	Frequency	s.d	Haplotype
1	0.333	0.333	TTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAATACTTGACCACCTGTAGT ACATAAAAACCCAATCCACATCAAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGC AATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCACTA GGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCG TACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATA GGGGTCCCTTACCACCATC
2 and 3	0.667	0.333	TTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAATACTTGACCACCTGTAGT ACATAAAAACCCAATCCACATCAAAACCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGC AATCAACCTTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCACTA GGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCG TACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATA GGGGTCCCTTACCACCATC

S.18 Sex Determination for Individual 3, obtained by Illumina HiSeq2500 (Illumina®), Q=20

Nseqs	NchrY+NchrX	NchrY	R_y	SE	95%	CI Assignment
29523	1102	74	0.0672	0.0075	0.0524-0.0819	consistent with XY but not XX

References

- Béraud-Colomb E, Roubin R, Martin J, et al. Reply to Cooper. *Am J Hum Genet.* 1997;60(4):1002-1003.
- Fernández E. Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea. PhD Thesis. 2005. [Universitat de Barcelona](#).
- Pinto N, Gusmão L, Amorim A. X-chromosome markers in kinship testing: A generalisation of the IBD approach identifying situations where their contribution is crucial. *Forensic Sci Int Genet.* 2011; 5(1): 27-32.
- González-Fortes G, Tassi F, Trucchi E, Henneberger K, Paijmans J, Díez-del-Molino D, et al. A western route of prehistoric human migration from Africa into the Iberian Peninsula. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2019; 286(1895), 20182288.
- Olalde I, Brace S, Allentoft M, Armit I, Kristiansen K, Booth T, et al. The Beaker phenomenon and the genomic transformation of northwest Europe. *Nature.* 2018; 555(7695), 190–196.
- Haak W, Lazaridis I, Patterson N, Rohland N, Mallick S, Llamas B, et al. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature.* 2015; 522(7555), 207–211.
- Lipson M, Szécsényi-Nagy A, Mallick S, Pósa A, Stégmár B, Keerl V, et al. Parallel palaeogenomic transects reveal complex genetic history of early European farmers. *Nature.* 2017; 551(7680), 368–372.
- Broushaki F, Thomas M, Link V, López S, van Dorp L, Kirsanow K, et al. Early Neolithic genomes from the eastern Fertile Crescent. *Science.* 2016; 353(6298), 499–503.
- Mathieson I, Lazaridis I, Rohland N, Mallick S, Patterson N, Roodenberg S, et al. Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature.* 2015; 528(7583), 499–503.
- Hofmanová Z, Kreutzer S, Hellenthal G, Sell C, Diekmann Y, Díez-del-Molino, et al. Early farmers from across Europe directly descended from Neolithic Aegeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2016; 113(25), 6886–6891.



A maternity case with human remains from a XIII–XIV century burial at Uceda, Guadalajara, Central Spain



C. Gomes^{a,*}, S. Palomo-Díez^a, E. Dorado-Fernandéz^b, E. Ruiz-Mediavilla^c,
C. Magaña-Loarte^b, I. Ramírez-González^d, A.M. López-Parra^a, C. Baeza-Richer^a, J. Gibaja^e,
E. Arroyo-Pardo^a

^a Laboratory of Forensic and Population Genetics, Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, Spain

^b Laboratory of Forensic Anthropology, Forensic Anatomical Institute, Madrid, Spain

^c School of Legal Medicine, Department of Toxicology and Legal Medicine from Complutense University, Madrid, Spain

^d Archaeologist, G3A, Universidad Europea, Spain

^e Department of Archaeology and Anthropology (IMF-CSIC), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2015

Accepted 7 September 2015

Available online 10 September 2015

Keywords:

Critical DNA

Critical samples

Kinship analysis

Fetus

Sex determination

ABSTRACT

In a High Medieval age cemetery, dated from the XIII–XIV century (Uceda, Guadalajara, Central Spain), two bodies were found, buried in a curious position. One of the bodies, an adult, had close to its abdominal area a small number of little bones. It was not clear if it could have been a pregnant woman or, otherwise, two separated burials, at different times.

Anthropological experts confirmed that the second individual should be a fetus, being absolutely impossible to determine the sex. Furthermore, the adult was appointed as a woman.

Concerning the condition of the samples, the adult one was preserved, obeying to the authenticity criteria to select evidences for a critical DNA analysis. But the samples belonging to the second individual were very delicate and fragile, complicating the sampling work.

A genetic study will be carried out to find if there is any biological bond between the individuals, as well as, their biological sex. The analysis procedure had to be somewhat modified due to the sensitivity of the second individual samples.

So far, our preliminary results reveal that, if both individuals are not linked by maternal kinship, they must be, at least, relatives by maternal side, since they share the same maternal lineage.

Conclusions reached in the present study can help in mass disasters cases. In such situations, it is crucial to determine kinships between samples, despite their advanced state of degradation, which makes the improvement of this procedure a crucial point in forensic genetics.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

A maternity test, namely a genetic profile determination, can be the only possibility to disclose the identity of human remains due to its external degradation or inconclusive identity, such as an organ. Effectively, this kind of analysis is mandatory in complex forensic cases, such as terrorist attacks, postwar territories, natural disaster situations, missing people, and cases of refugees or other immigration circumstances.

In this work we analyzed two individuals that have been found in the same grave in a medieval cemetery of Uceda, (Guadalajara, Central Spain), in an uncommon position. Indeed, one of the bodies, an adult, had close to its abdominal area a small number of little bones. The anthropologists identified the adult body as a woman, and due to the proximity with the small bones there is the possibility that she had been buried pregnant. However, it always exists the possibility of them being unrelated, with the same or different sex, since it was not possible to determine the sex of the fetus by anthropological methods.

Regarding the samples condition, the adult skeleton seems to be just somewhat debilitated. Nonetheless, the fetus samples were very fragile, complicating the sampling process.

Accordingly to such evidences, it was our purpose to verify the maternity hypothesis, employing specific genetic markers

* Corresponding author at: Laboratory of Forensic and Population Genetics, Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, Spain, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.
E-mail address: clopes01@ucm.es (C. Gomes).

indicated for critical samples, which includes the determination of belonging to the same maternal lineage.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Two teeth were collected from the adult, according to the authenticity criteria, and two different samples were collected from the fetus: a vertebra and a (possible) tibia.

2.2. Extraction

The external layer of the teeth samples was excised with a Sand-blaster, and irradiated for 30 min on each side of the sample. The fetus samples were carefully cleaned with the Sand-blaster and also irradiated, but during a small period (15 min each side) since these samples seemed to be extremely damaged. Then, the samples were pulverized in a freezer mill filled with liquid Nitrogen. Then, the extraction protocol was followed according to the described by Rohland et al. [1]. However, the fetus samples were sent in contact with the buffer extraction 24 h, instead of the usual 12 h, in order to increment the possibility to recover the maximum genetic material possible. DNA extracts were stored at -20°C until the amplification took place.

2.3. PCR amplification and sequencing

In order to discard/admit a possible maternal relation, the two hypervariable regions (HV1—a 295 base pairs (bp) fragment, and HV2—a 360 bp fragment) of the mitochondrial DNA were analysed, by at least two independent amplifications [2].

On the other hand, to establish the molecular sex, as well as a maternity kinship, the AmpFLSTR[®] NGM SElect[™] PCR Amplification Kit was used to perform the amplifications of the nuclear genetic material, according to the user's manual [3]. Nonetheless, since we were dealing with critical samples, the number of PCR cycles was extended to 40 cycles.

2.4. Authenticity criteria

In order to obtain replicated and reliable results, sampling, cleaning, extraction and amplification processes had into account international recognized authenticity criteria procedures. Such measures includes, among others [4], exclusive critical DNA laboratory, being the pre-PCR and pos-PCR spaces physically separated; use of negative controls during all the analysis; from the beginning until the end, one single operator, as well as, the achievement of at least two replicated sequences from the same sample, and from different samples of the same individual.

3. Results

Concerning mtDNA, the results obtained seems to indicate a good quality of the genetic material, which required only two amplifications per sample. The haplotypes obtained for the adult and fetus are exactly the same (Table 1), and replicated results were always obtained, both with the forward and reverse sequence.

On the other hand, contrary to what was observed for the mitochondrial DNA, the nuclear information seems to have suffered extensive damage. In fact, the autosomal results are very limited, since it was not possible to obtain any information from the first three amplifications, and from 16 markers, only from 5 it was possible to get information (Table 1). According to our preliminary information, the genotype obtained for the fetus was XY, meaning a male biological sex.

All results were compared with the investigators' profiles and in both cases there are no sign of contamination (Table 1).

4. Discussion

From the mitochondrial point of view, all of the obtained sequences were positively replicated, indicating always the same haplotype, which seems to point out a possible maternal relation. However, from the genetic point of view, all of the maternal relationships such as mother – son, maternal grandmother-grandchild, maternal aunt – nephew or siblings are impossible to exclude, due to the way of mitochondrial transmission.

Regarding autosomal information, such results indicated the degraded and the damaged degree of the samples. It was quite difficult to obtain an autosomal profile, and only with the fourth amplification attempt it was possible to achieve some alleles from the second sample from both individuals. From the first sample it was not possible to amplify any kind of nuclear information. On the other hand, although only 5 from 16 markers were amplified, in 3 from these 5 there is a possible coincidence between 1 of the 2 alleles between the fetus and adults alleles. This information seems to support the maternity theory. However, such results must be taken into account with precaution, for two main reasons: it was not possible until now to replicate autosomal results and, for both individuals, the dropout rate is very high. Effectively, only for three markers (Amelogenin, D21S11 and D22S1045) it was viable to amplify two alleles in the fetus, and in the adult only in one marker (D21S11).

Finally, although it was not possible to amplify all of the genetic information from the 4 samples, it was an important achievement the recovery of some information from the fetus, since the samples were in a serious damaged condition. In fact, it is quite important a future replication of such results, mainly for the Amelogenin marker, since it seems to be the only way to determine the sex of a

Table 1

Mitochondrial and STRs NGM[®] kit results for four samples, belonging to two individuals (31-I-UC, an adult and 31-II-UC, a fetus). The mtDNA results seem to indicate that both individuals belong to the same maternal lineage, since they share the same mitochondrial haplotype. Concerning to STRs results, both individuals share one allele for each amplified marker, except for vWA marker, where there is no result for the adult individual.

Individual	Sample	Mitochondrial DNA results Haplotype	Autosomal STRs				
			vWA	Amel.	D8S1179	D21S11	D22S1045
31-I-UC	31-I-UC-1	73G 152C 263G 285T 295T 16126C 16145A 16172C 16222T 16261T	–	–	–	–	–
	31-I-UC-2	73G 152C 263G 285T 295T 16126C 16145A 16172C 16222T 16261T	–	X	19	34.2 / 35	11
31-II-UC	31-II-UC-1	73G 152C 263G 285T 295T 16126C 16145A 16172C 16222T 16261T	–	–	–	–	–
	31-II-UC-2	73G 152C 263G 285T 295T 16126C 16145A 16172C 16222T 16261T	13	XY	19	33.2/34/ 34.2	11/17
Investigator 1		152C 236C 263G 16304C	18/19	XX	10/13	29/30	19/19
Investigator 2		263G 309.1C 315.C 16257T	14/15	XX	9/11	30/30	17/18

Amel.: Amelogenin marker.

fetus, as well as, the only way to obtain reliable information for such degraded biological samples.

Conflict of interest

None.

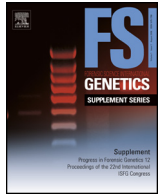
Acknowledgments

This work was supported by G/6401400/8000 research project (Banco Santander-Universidad Complutense de Madrid, Spain) for C.G; by the HAR2011-23149 research project funded by the MICINN of the Spanish Government for J.G., and by the HAR2009-10105 project, funded by the MINECO of the Spanish Government and the BES2010-035322FPI grant for P-D.S, and by the direction of the

archaeological Project by Ildefonso Ramírez González, authorized by the Consejería de Educación, Ciencia y Cultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Exp. 10.1808).

References

- [1] N. Rohland, H. Siedel, M. Hofreiter, A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput, *Mol. Ecol. Resour.* 10 (2009) 677–683.
- [2] C. Gamba, E. Fernández, A. Oliver, et al., Population genetics and DNA preservation in ancient human remains from Eastern Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 1* (2008) 462–464.
- [3] Applied Biosystems Life Technologies, AmpFLSTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit. User Guide, Thermo Fisher Scientific Inc. (2015).
- [4] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre, et al., Genetic analyses from ancient DNA, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 645–679.



Study of medieval critical samples—a genetic approach to the study of the Mudejar Community



C. Gomes^{a,*}, C. Magaña-Loarte^b, E. Dorado-Fernández^b, E. Ruiz-Mediavilla^c,
I. Ramírez-González^d, S. Palomo-Díez^a, A.M. López-Parra^a, C. Baeza-Richer^a, J. Gibaja^e,
E. Arroyo-Pardo^a

^a Forensic and Population Genetics Group, Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, Spain

^b Laboratory of Forensic Anthropology, Forensic Anatomical Institute, Madrid, Spain

^c School of Legal Medicine, Department of Toxicology and Legal Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

^d Archaeologist G3A, Universidad Europea, Spain

^e Department of Archaeology and Antropology (IMF-CSIC), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2015

Accepted 16 September 2015

Available online 24 September 2015

Keywords:

Critical DNA

Mitochondrial DNA

Iberian Peninsula

Mudejar cemetery

Iberian Islamic occupation

ABSTRACT

On their arrival to the Iberian Peninsula, the North African and Berbers Muslims encountered no resistance, but a land with some political trouble between Christians, Godos and the Jewish people, which facilitated somehow the absorption of the new invaders ideas. In on hand, there is the idea that military invasion changed by force daily habits, religious traditions and beliefs: the “Al-Ándalus” region. However, in the other hand, there are evidences of a peaceful co-existence between Muslims and the “Iberians”, as well as, a voluntary absorption of the Islamic culture. Thus, Muslims who lived under Christian rule formed the “Mudejar” community and its biogeographical origin remains still unclear.

Considering the wide geographical extend and duration of the Muslim occupation, it is reasonable to suppose that the Islamic permanency had a significant impact on the Iberian gene-pool.

In Uceda, (Guadalajara, Spain), 70 medieval bodies were found buried in a Mudejar cemetery. According to anthropologists' experts, Muslim burial was observed, including the body orientation to Mecca, and all led to believe that the individuals had an Islamic origin. So, we are carrying out a genetic study in order to verify if their mitochondrial lineage is coincident with the characteristic haplogroups described for peoples from the actual Islamic geographical areas.

The sampling process concerned two teeth per individual, obeying to the criteria to select evidences for critical DNA analysis. The samples were directly exposed to the floor conditions, and, in some cases, were externally damaged, requiring some adaptations in the analysis process.

Our preliminary results seem to indicate that the individuals did not have North-African origin, since they revealed, so far, European haplogroups, indicating a possible religious conversion.

From the forensic perspective, this is an important study since we adapted the technique in order to obtain reliable and replicable data from critical samples that were buried and directly exposed to the floor conditions. Historically, these results could be quite challenging because ancient DNA technology can be useful to shed light into the genetically history of the Iberian Peninsula

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Battle of Salado, in 1340, was the accolade of Iberian Christian kingdoms, in which has been referred to the “Reconquista”. From this moment onwards, the XIV century was the end

of the North African Berber aspirations, with the Christian kingdoms only sharing the Iberian Peninsula with the oldest Andalusian Petty Kingdom, the Nasrids who ruled from the Alhambra.

Inside the Iberian Peninsula, the government of Castile had already stabilized since the fall of the Petty Kingdom of Toledo in 1085. Effectively, there were centuries of “cohabitation” between the three great religions of the Book: Christians, Jewish and Muslim peoples [1]. The “Mudéjares”, as an Islamic community assimilated in medieval Castile, represented one of the most important cultural

* Corresponding author at: Forensic and Population Genetics Group, Department of Toxicology and Legal Medicine, Medical School, Complutense University of Madrid, Spain Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: clopes01@ucm.es (C. Gomes).

and economic bastions of the Iberian culture, largely keeping Islam and customs, but incrementing differences from Granada and North Africa.

The “Mudéjar” Uceda cemetery presents such cultural spectrum between the XIII and XIV century: a “pseudo Islamic” heterodox rite which shows the great Andalusian customs of burial, but with great complexity and assimilation of the Christian customs. However, not all the Mudéjar community had “pure” Islamic origins; from 711 there had been many Christians who were converted to Islam or belonged to the Mozarabic communities, therefore they participated in the formation of this “Mudéjar” community.

Archaeologists have been able to recover several skeletons from dozens of burials of archaeological excavations, presenting this medieval population identity issue; burials supine versus laterally decubitus Andalusian classics [2] but with their heads turned to one side.

So, the present work tries to evaluate such hypothesis through mitochondrial DNA (mtDNA) investigations, attempting to undisclosed the biogeography origin of these corpses of presumptive Iberian Muslims, by the investigation of their maternal lineage.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Nine different individuals were sampled, from the alleged Mudéjar cemetery of Uceda, selecting a total of eighteen samples (sixteen teeth, two bones).

2.2. Extraction

The external layer of the samples were excised with a Sandblaster, and irradiated for 15 min on each side of the sample. Then, the samples were pulverized in a freezer mill filled with liquid Nitrogen. Then, the extraction protocol was followed according to the described by Rohland and Hofreiter [3]. The samples seem to be very critical, thus, the period of time that each one of them was in contact with the extraction buffer were amplified to 24 h. DNA extracts were stored in at -20°C until the amplification took place.

2.3. PCR amplification and sequencing

A 295 base pairs (bp) fragment was studied from mtDNA HVR I (Hypervariable Region I) and a 360 bp fragment from the HVR II, by the independent amplification of two short overlapping sequences, for each one of the regions (positions 16105–16400 and 29–389, respectively) [4].

2.4. Authenticity criteria

Recommended procedures were carried out in order to obtain validated DNA sequences: analysis in an exclusive critical DNA laboratory, physical separation of pre- and post-PCR areas and procedures, analysis by a single researcher, use of “blanks” in all of the protocols steps, repeated amplifications from the same extract.

3. Results

For each one of the samples, eight amplifications were needed, considering the four fragments studied—two per fragment. Except for individual n°21, all of the results are replicated, so the haplotype and respective haplogroup are exposed in Table 1, after a research in Phylotree [5].

Haplogroup U4 was found for three individuals, haplogroup J1b for two individuals and the following haplogroups were obtained for one individual each one: H1, H27, K, and J1c.

These are preliminary results, since only nine of the seventy individuals were so far analysed.

4. Discussion

These preliminary results suggest that the mtDNA could be just somewhat degraded, since the obtained sequences present a considerable quality (without excessive background noise or dubious double peaks). In similarity to what Gamba et al. [4] described for critical DNA, our results also evidenced that samples preservation mainly depends on the depositional environment, instead of the sample age. On the other hand, we also noticed that not always the degraded external aspect of the sample implies null results.

Concerning the achieved haplotypes, only for the individual n°21 we were not able to replicate the results. We can observe that only two individuals share the same haplotype, possibly being related by a maternal lineage.

No one of the studied individuals revealed characteristic Berber and/or Arabic haplogroups (U6 [1] and L1). Towards these results, we propose two different explanations. The first one concerns the possibility of the nine individuals being from Muslim origin, but only by paternal side. Due to the degradation level of the genetic nuclear material, we did not obtain any result when analysing Y-chromosome, so it is not possible to decline this hypothesis. The other possible explanation for our preliminary results could be the conversion of the individuals, having, therefore, European origin. Such interpretation is based upon these haplogroup frequencies in Europe and the anthropological data obtained in the individuals' burials, which indicates an Islamic burial.

In one hand, the most frequent haplogroup in the Muslims populations were not found in any sample. Nevertheless, no one of

Table 1

Results obtained after sequencing mtDNA of nine medieval individuals. The haplotype shown for each individual is the result of at least 4 replicated sequences. The haplogroup was determined using the software “Haplogrep”, as well as, “Phylotree”.

Individual	Haplotype	Haplogroup
19UC	73G 152C 195C 263G 16134T 16189C 16356C	U4A1
20UC	195C 263G 315.1C 16134T 16189C	U4A1**
21UC	No replicated results	---
22UC	73G 152C 263G 16189C 16356C	H1b
23UC	16126C 16145A 16261T	J1b
24UC	263G 315.1C 16129A 16316G	H27
27UC	263G 309.1C 315.1C 16224C 16311C	K
31-I-UC	73G 152C 263G 285T 295T 16126C 16145A 16172C 16222T 16261T	J1b1a1
31-II-UC	73G 152C 263G 285T 295T 16126C 16145A 16172C 16222T 16261T	J1b1a1

**According to the Phylotree database, the individual haplotype should also contain the mutation 16356C. However, in all of the replicated sequences, it was never possible to detect such polymorphism.

the obtained haplogroups is exclusive of the Iberian Peninsula, being also present in the characteristic geographical area assigned to the Muslim populations that arrived at the Iberian Peninsula in the VIII century.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

We would like to thanks to Professor Luis Miguel Duarte, as well as to Professor Armando González for their kindness sending all of the literature needed to understand the Medieval Muslim culture and their funeral rites.

This work was supported by G/6401400/8000 research project (Santander-Universidad Complutense de Madrid, Spain) for C.G, by the HAR2011-23149 research project funded by the MICINN of the Spanish Government for J.G., by the HAR2009-10105 project,

funded by the MICINN of the Spanish Government and the BES2010-035322FPI grant for P-D. S, and by the direction of the archaeological Project by Ildelfonso Ramírez González, authorized by the Consejería de Educación, Ciencia y Cultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (Exp. 10.1808).

References

- [1] M. Regueiro, R. Garcia-Bertrand, K. Fadhlouzi-Zid, et al., From Arabia to Iberia: A Y chromosome perspective, *Gene* 564 (2015) 141–152.
- [2] M. Chávet, R. Sánchez, J. Padial, Ensayo de rituales de enterramiento islámicos en Al-Andalus, *An Murcia* 22 (2006) 149–161.
- [3] N. Rohland, H. Siedel, M. Hofreiter, A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput, *Mol. Eco. Resour.* 10 (2009) 677–683.
- [4] C. Gamba, E. Fernández, A. Oliver, M. Tirado, C. Baeza, A.M. López-Parra, E. Arroyo-Pardo, Population genetics and DNA preservation in ancient human remains from Eastern Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 1 (2008) 462–464.
- [5] M. Van Oven, M. Kayser, Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation, *Hum. Mutat.* 30 (2009) (2008) E386–E394.



An unusual kinship case from the Spanish Civil War (1936–1939): Ancient versus degraded sample's investigation

C. Gomes^{a,b,*}, M. Fondevila^c, C. Magaña-Loarte^d, J. Fernández-Jiménez^e, J. Fernández-Serrano^e, S. Palomo-Díez^{a,b}, C. Baeza-Richer^{a,b}, A.M. López-Parra^{a,b}, E. Arroyo-Pardo^{a,b}

^a Laboratory of Forensic and Population Genetics, Department of Legal Medicine, Psychiatry and Pathology, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid (UCM), Spain

^b Grupo de Ciencias Forenses: Genética y Toxicología forenses, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

^c Institute of Forensic Sciences (INCIFOR), Forensic Genetics Service, Santiago de Compostela University, C/ San Francisco, s/n, 15782, Santiago de Compostela - A Coruña, Spain

^d Laboratory of Forensic Anthropology, Forensic Anatomical Institute, Madrid, Spain

^e Laboratory of the Biology Department, Criminalistics Service, Civil Guard, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Kinship
Ancient sample
Degraded sample
Degradation

ABSTRACT

An unusual kinship case arrived to our laboratory, having as main objective to perform a genetic analysis between a living presumable niece and some human remains –eight bones from a hand. The bone samples probably belonged to a cleric executed in Almería (Spain), during the Spanish Civil War (1936–1939), where, after the execution, the cadaver was thrown to a dry well and covered with lime. Later, the cadaver was transferred to a local cemetery, where due to a flood, was then relocated in another sanctuary. It was at this moment when the hand was separated from the other remains, and kept under the control of the family for decades.

After an anthropological study, the three best specimens from the eight available bones were selected to perform the genetic analysis. After the DNA extraction, a mitochondrial DNA analysis was accomplished to test the alleged maternal uncle-niece relationship.

The results confirmed the bones degradation, since each sample produced different mitochondrial sequences, being impossible to obtain a consensus profile. It was impossible to confirm any kinship between the incomplete hand and the living person, or to conclude if the bones were part of the same hand.

Although our study focused on samples with less than 100 years old, similar investigations have been previously successfully achieved in our laboratory on very degraded samples, for example, from the Chalcolithic Period (Palomo-Díez et al., 2017). In that study, the obtained results allowed, not only to establish biological kinships, but also to associate different human remains. It is therefore crucial to distinguish between both concepts - ancient versus degraded (samples). The elapsed time since the sample deposition may not influence the results as much as the preservation conditions.

1. Introduction

An uncommon kinship case arrived to our laboratory, having as main objective to perform a genetic analysis between a living presumable niece and eight finger bones. The preliminary hypothesis was related to the possibility that the bones belonged to a cleric executed in Almería (Southern Spain), during the Spanish Civil War (1936–1939). The assumed chain of events after the individual's execution could certainly help to explain the poor state of the bones conservation - after the execution by headshot in 1936, the cadaver was thrown to a dry

well and covered with lime. In 1941, the cadaver was visually identified by a member of his family and transferred to a local cemetery, where due to a flood in 1950, the human remains were transferred to another coffin. At this moment, according to the familiar's memories, there were already obvious signs of the body decomposition. In 1962, the human remains are finally relocated in another sanctuary, the Basílica de la Santa Cruz del Valle de los Caídos (Madrid, Spain). It is thought that the fingers were separated from the other human remains in some moment before the body transfer, being kept under the control of the family until now. In 2018, after an anthropological study performed on the

* Corresponding author at: Laboratory of Forensic and Population Genetics, Legal Medicine, Psychiatry and Pathology Department, Medicine School, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: clopes01@ucm.es (C. Gomes).

<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.140>

Received 5 September 2019; Received in revised form 8 October 2019; Accepted 11 October 2019

Available online 21 October 2019

1875-1768/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1

Mitochondrial DNA results for the two presumptive related individuals, according to each studied sample.

Individual (analysed sample)	mtDNA sequence
1 (proximal phalanx)	[8-82 16095-16390] 80 T 16221 T 16237G
1 (first middle phalanx)	[8-78 16095-16280] 73 G
1 (second middle phalanx)	[16095-16400] 16362C 16329A
2 (blood sample)	[8-390 15999- 16565] 73 G 263G16169 T 16172C 16189C

Laboratory of Forensic Anthropology, Forensic Anatomical Institute (Madrid, Spain), the samples were analysed on the Laboratory of Forensic and Population Genetics (Complutense University of Madrid, UCM, Spain). The question to be answered was whether the bones held by this family belonged to the alleged maternal uncle of the living presumable niece.

2. Material and methods

To perform the genetic analysis, the three best finger bones were selected from the presumptive maternal uncle (individual 1) – one proximal phalanx, and two middle phalanges, since the remaining samples should be returned to the sanctuary. The registration and cleaning of the samples was performed according to Gomes et al., [1]. Samples' external layer was removed with powdered aluminium oxide pressurized by a sand-blast machine (Dentalarm™), and then irradiated with UV for 30 min, on each side of the sample. Then, in a biological safety cabin, with laminar flow, each sample was cut in half, to perform all analysis in duplicate and separately. A specific DNA extraction for degraded bone samples was achieved according to Gomes and Palomo-Díez et al., [2].

From the presumptive maternal niece (individual 2), after signing informed consent, a blood sample was obtained by finger puncture, performing a DNA extraction with the FTA cards.

Hypervariable mitochondrial regions (HV) 1 and 2 (290 and 360 base pairs fragment, respectively), from all samples, were amplified according to [3], and method C [4]. After a Sanger Sequencing reaction accomplished by the Macrogen's standard sequencing service, obtained sequences were analysed, relative to the revised Cambridge reference mtDNA sequence, by running Mutation Surveyor® (Softgenetics) software.

3. Results

Concerning individual 1, each sample produced different mtDNA sequences, being impossible to obtain a consensus profile. All mtDNA profiles, including from individual 2, are presented on Table 1.

4. Discussion

Although all studied samples produced mtDNA sequences, each bone produced different results, being impossible to obtain a consensus profile from individual 1. So, it was not feasible to compare both individuals' mtDNA profiles, and the maternal uncle – niece hypothesis was not tested. Also, from the genetic point of view, it was not viable to affirm that all human remains belong to the same hand and individual.

The poor preservation of the human remains after the individual's 1 death could have been one of the causes of these inconclusive results.

Lime and the almost constant presence of humidity promoted the probable genetic material inhibition and degradation [5], although samples had less than 100 years. This way, it is crucial to differentiate between both concepts - ancient and degraded condition of the samples. An “ancient” sample is characterized by belonging to a chronological period much earlier than the present, and a “degraded” sample is, by definition, characterized by a reduced and/or degraded DNA concentration [6]. According to this, both ancient as fresh samples could be classified as critical, depending on its DNA concentration and preservation. Therefore, we consider inaccurate to regard “ancient DNA” and “degraded DNA” as synonymous, being a clear confusion between the context of the study (e.g. archaeological, forensic, etc.) with the conservation state of the sample (degraded versus non-critical). Indeed, previous investigations have been achieved in our laboratory from very ancient periods. For example, from one study of the Chalcolithic Period (3970 ± 60 BP) [7], the obtained results allowed, not only to identify the minimal number of buried individuals, but also to establish biological kinships, and to associate different human remains. Other example was an investigation from the European Medieval XIII-XIV period [1], where motherhood was established, studying a foetus and a female adult, being also possible to define the foetus molecular sex.

5. Conclusion

We consider that the elapsed time since the sample deposition may not impact in the results as much as the initial biological preservation conditions.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

We would like to thank to A. Fernández Sánchez, from the Archbishopric of Madrid, as well as, to A. Voyer and family, which allowed us to study and publish this investigation. This work was supported by G/6401400/8000 research project (Banco Santander-Universidad Complutense de Madrid, Spain) for C. Gomes, and has been partially funded by HAR2015-67323-C2-2-P.

References

- [1] C. Gomes, S. Palomo-Díez, E. Dorado-Fernandez, et al., A maternity case with human remains from a XIII-XIV century burial at Uceda, Guadalajara, Central Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 5* (2015) e10–e12.
- [2] C. Gomes, S. Palomo-Díez, J. Roig, et al., Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 5* (2015) e279–e282.
- [3] C. Gamba, E. Fernández, A. Oliver, et al., Population genetics and DNA preservation in ancient human remains from Eastern Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 1* (1) (2008) 462–464.
- [4] C. Gomes, A. Alonso, D. Marquina, et al., “Inhibiting inhibitors”: preliminary results of a new “DNA extraction-amplification” disinhibition technique in critical human samples, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 6* (2017) e197–e199v.
- [5] J. Butler, *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, 2nd edition, Elsevier Academic Press, 2005.
- [6] S. Palomo-Díez, *Caracterización genética de las poblaciones de las Edades del Cobre y del Bronce de la Submeseta Norte de la Península Ibérica*, PhD Thesis Facultad de Ciencias Biológicas, Univ. Complutense de Madrid, 2015.
- [7] S. Palomo-Díez, A. Esparza-Arroyo, C. Gomes, et al., Genetic characterization and determination of the number of individuals by molecular analysis in a prehistoric finding, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 6* (2017) e487–e489.



X-InDels efficacy evaluation in a critical samples paternity case: A Spanish Civil War case from the memorial of the camposines (Tarragona, Spain)

Cláudia Gomes^{a,b,*}, Sara Palomo-Díez^{a,b}, Carlos Baeza-Richer^{a,b}, Ana María López-Parra^{a,b}, Ivon Cuscó^c, Elena Garcia-Arumí^c, Eduardo Tizzano^c, Andrea Fernández-Vilela^d, Diego López-Onaindia^d, Ares Vidal Aixalà^e, Óscar Escala Abad^e, Gemma Domenech Casadevall^f, Juli Cuéllar Gisbert^f, Eduardo Arroyo-Pardo^{a,b}

^a Laboratory of Forensic and Population Genetics, Legal Medicine Psychiatry and Pathology Department, Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^b Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos IdISSC, Grupo de Ciencias Forenses: Genética y Toxicología forenses, Madrid, Spain

^c Hospital Vall Hebron, Clinical and Molecular Genetics Area, Barcelona, Spain

^d Universitat Autònoma de Barcelona, GREAB Grup de recerca en Antropologia Biològica, Unitat d'Antropologia Biològica, Facultat de Biociències, Barcelona, Spain

^e Itirra Arqueologia SL- Corbins, Itirra Arqueologia, Corbins, Spain

^f Generalitat de Catalunya, Departament de Justícia, Direcció General de Memòria Democràtica, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Paternity
X-InDels
Spanish civil war

ABSTRACT

The Memorial of the Camposines (la Fatarella, Tarragona, Spain) consists in a place that honours all combatants of the Spanish Civil War (1936–1939), without distinction of sides. The site was included in the research carried out by the multidisciplinary team coordinated by the program of the General Directorate of Democratic Memory, Generalitat of Catalonia, Spain, for the identification of the victims of the Spanish Civil War. The case investigated on the present study consisted on a presumable paternity. To accomplish the study of the presumptive father critical samples, one of the combatants found on the Memorial, two bone samples were selected - a petrous portion of left temporal bone, and a condyle of *foramen magnum*, both fractured and at a very bad stage of conservation. After a specific DNA extraction for critical bone sample, the next step was an autosomal and Y-chromosome analysis, trying to find a possible coincidence with any possible familiar, from the familial database. A potential match was found, indicating a possible living daughter. However, between both autosomal profiles one Mendelian incompatibility was detected, and also several *allelic dropout* phenomena in the presumptive father's profile. Therefore, samples were analysed for a 32 X-chromosome Insertion-Deletion (InDel) polymorphisms battery, assessing their ability to solve, or at least complementing autosomal information, in a complex paternity case.

It was possible to confirm the efficacy of these 32 X-InDels polymorphisms, by solving undoubtedly the case. Due to the five incompatibilities detected between both X-InDels profiles, it was now possible to discard immediately a possible paternity case.

1. Introduction

In 2018, we performed a genetic analysis of one of the combatants found around the battlefield of the Ebro and deposited on the Memorial of the Camposines (La Fatarella, Tarragona, Spain), analysing both autosomal and Y-chromosome Short Tandem Repeat (STR) markers, according to the standard protocol established by the laboratories involved in the research. In 2019, comparing our autosomal results with

the familial database, a potential match was found, indicating a possible living daughter. However, one possible Mendelian incompatibility was detected, due to an allelic dropout on the D18S51 autosomal marker.

So, the aim of the present work was to evaluate the efficiency of 32 X-chromosome Insertion-Deletion (InDel) polymorphisms [1] in this specific paternity case, taking into account the degraded autosomal profile from the presumptive father. Indeed, X-chromosome

* Corresponding author at: Laboratory of Forensic and Population Genetics, Legal Medicine, Psychiatry and Pathology Department, Medicine School, Complutense University of Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: clopes01@ucm.es (C. Gomes).

<https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.064>

Received 5 September 2019; Received in revised form 7 October 2019; Accepted 7 October 2019

Available online 12 October 2019

1875-1768/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

polymorphisms are progressively an indispensable tool in the routine context of a forensic laboratory, complementing the information obtained with autosomal markers. On the other hand, X-markers have higher mean exclusion chance (MEC) [2], allowing to solve certain kinship questions, inaccessible with autosomal markers [3,4]. Previous studies on other European populations [1] indicate these set of 32 X-InDel polymorphisms as a proficient tool when dealing with kinship analysis, showing a significant MEC values, both for duos, as for trios. Due to their amplicons' length, they were also indicated for degraded biological samples [1], as those studied in the present case.

2. Materials and methods

To perform the DNA analysis, two samples were selected from the presumptive father (individual 1) - a *petrous* portion of left temporal bone, and a condyle of *foramen magnum*, both fractured and at very degraded stage. The registration and cleaning of the samples was carried out according to Gomes et al., [5], as well as, a specific DNA extraction for critical bone samples was achieved according to Gomes and Palomo-Díez et al., [6].

From the presumptive daughter (individual 2), after signing informed consent, a peripheral blood sample was obtained and genomic DNA was isolated by the salting-out method as previously described [7].

GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (ThermoFisher™ Scientific, Foster City, USA), and the 32 X-InDel multiplex were used to perform autosomal and X-chromosome analysis, on both individuals' samples, according to the user's manual [8], and Pereira et al., [1], respectively. Capillary electrophoresis and detection were accomplished in a 3730 Genetic Analyzer (ThermoFisher™ Scientific, Foster City, USA), and electropherogram analysis and allele assignment were performed with GeneMapper software, v 4.0.

Likelihood ratio (LR) computations were performed with *Familias* software, v3.1.9.6 [9,10], considering the dropout values between [0.1 – 0.5] for D18S51 autosomal marker. The evaluated hypotheses were **H1**: individual 1 is the biological father of individual 2, considering both genetic profiles, and **H2**: individual 1 is not the biological father of individual 2, taking into account both genetic profiles.

3. Results

Considering autosomal STR results for individual 1, nine *loci* dropout was observed (on Supplemental Material - Table 1 signed as *), and two allelic dropouts (D18S51 and TH01 markers) were also detected. It was possible to obtain a complete autosomal profile for individual 2.

LR values for autosomal STR markers, where the paternity possibility is evaluated, were as follows ([Dropout Value for D18S51 autosomal marker] - LR_{final} value): [0.1–1855.99]; [0.2–2428.21]; [0.3–2706.34]; [0.4–2870.75]; [0.5–2979.35].

For the 32 X-InDel multiplex (Supplemental Material - Table 1), individual 1 presents 15 *loci* dropout (signed as *), and five Mendelian incompatibilities (MID1361, MID3703, MID3722, MID3774, MID243) when compared with individual 2.

4. Discussion

LR results for autosomal markers are compatible with the proposed kinship, although the determined values are significantly lower than our laboratory standard value (LR ≥ 10,000) for a paternity acceptance. On the other hand, autosomal and X-InDels genetic profiles from individual 1 demonstrate bad DNA conservation, justifying the highly

number of allelic and *loci* dropouts. Considering the X-chromosome analysis, five Mendelian incompatibilities could be detected between individuals 1 and 2 X-InDels profiles. According to the standard working protocol established by our laboratory, the paternity hypothesis is discarded when three or more Mendelian incompatibilities are observed. According to this, the considered paternity hypothesis between individuals 1 and 2 is rejected.

The search on the familial database was performed randomly, investigating possible matches between individuals. On the other hand, the impossibility to discard the paternity with the twelve autosomal markers, where no dropouts were observed, may be due to a high inbreeding rate on the individuals' origin population. These two situations together could be misleading and dangerous, since some laboratory could accept these values [$1855.99 \leq LR \leq 2979.35$] as an indicator of the paternity veracity, attending to the bone sample's degradation.

5. Conclusions

We strongly recommend to always increase the set of markers in cases where an identification or kinship analysis is required, having at least one individual with partial autosomal profiles, and a first positive match. In this case, the high number of incompatibilities observed between both X-InDels profiles reinforces the importance of this tool on forensic genetic laboratories.

Acknowledgments

This work was supported by “DIGNITAT” - Identificación de víctimas de la Guerra Civil Española” (Mass Graves Plan and the Genetic Identification Programme of the Government of Catalonia, Generalitat, Catalonia, Spain), and Iltirta Arqueologia SL- Corbins, Iltirta Arqueologia, Corbins, Spain.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2019.10.064>.

References

- [1] R. Pereira, V. Pereira, I. Gomes, et al., A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR, *Int. J. Legal Med.* 126 (1) (2012) 97–105.
- [2] R. Szibor, X-chromosomal markers: past, present and future, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1 (2) (2007) 93–99.
- [3] C. Gomes, M. Magalhães, C. Alves, et al., 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.* 126 (6) (2012) 917–921.
- [4] C. Gomes, M. Magalhães, C. Alves, et al., How useful is your X in discerning pedigrees? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 3 (2011) e161–e162.
- [5] C. Gomes, S. Palomo-Díez, E. Dorado-Fernandez, et al., A maternity case with human remains from a XIII-XIV century burial at Uceda, Guadalajara, Central Spain, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 5 (2015) e10–e12.
- [6] C. Gomes C, S. Palomo-Díez, J. Roig, et al., Nondestructive extraction DNA method from bones or teeth, true or false? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 5 (2015) e279–e282.
- [7] S.A. Miller, D.D. Dykes, H. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (3) (1988) 1215.
- [8] T. Scientific, GlobalFiler™ PCR Amplification Kit USER GUIDE, (2016).
- [9] D. Kling, A.O. Tillmar, T. Egeland, Familias 3-Extensions and new functionality, *Forensic Sci Int-Gen.* 13 (2014) 121–127.
- [10] T. Egeland, P.F. Mostad, B. Mevag, et al., Beyond traditional paternity and identification cases selecting the most probable pedigree, *Forensic Sci. Int.* 110 (1) (2000) 47–59.

Resultados y análisis genéticos no publicados

Esta sección tiene como objetivo presentar los resultados que no han sido publicados durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, por lo que para cada yacimiento estudiado se presentará un breve resumen introductorio, con la información arqueológica disponible en el momento, así como el análisis de los resultados genéticos obtenidos. Se consideran los datos obtenidos en estos estudios muy relevantes para completar los análisis publicados y sostener las interpretaciones e hipótesis planteadas.

Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico neolítico de Can Gambús -1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España)

Información arqueológica previa

El conjunto de inhumaciones del yacimiento arqueológico neolítico de Can Gambús-1, asociado a la conocida como “Cultura de los Sepulcros de Fosa” (finales del V a inicios del IV milenio cal BC), se localiza en el término municipal de Sabadell (Barcelona), (Roig et al., 2010). En esta necrópolis neolítica se han documentado 47 estructuras funerarias, de las cuales 43 son enterramientos individuales y cuatro dobles (Roig et al., 2010). De un total de 51 individuos, 44 serían adultos, seis subadultos y uno de edad indeterminada, resaltando el elevado porcentaje de inhumados adultos, en comparación con individuos infantiles, cuando se compara con otros yacimientos neolíticos vecinos, caso de la Bòbila Madurell (Sant Quirze del Vallès, Barcelona), Camí de Can Grau (La Roca del Vallès, Barcelona) o Sant Pau del Camp (Barcelona). La elevada concentración de sepulturas contrasta con la ausencia de estructuras domésticas como silos, fosas con desechos o hábitats. Ello ha llevado a pensar que sería un espacio exclusivamente funerario

Análisis genético

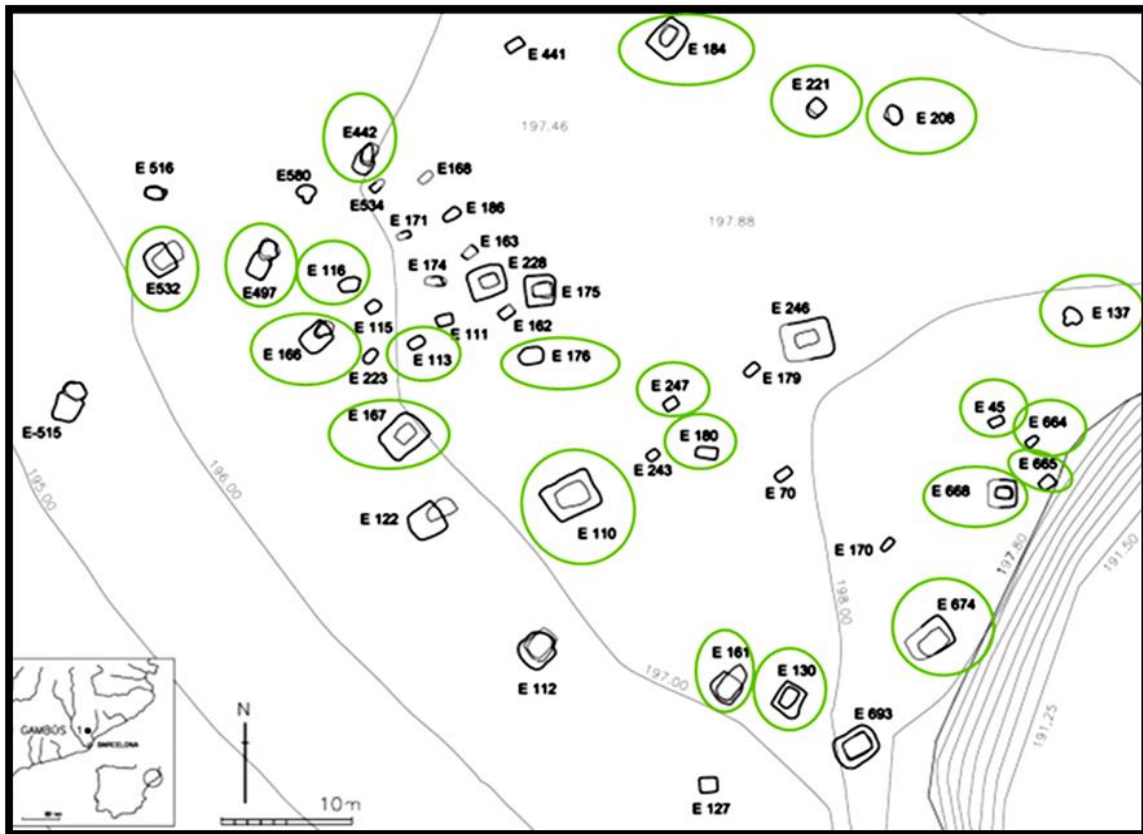
Se han analizado 22 individuos adultos, con el objetivo de determinar la existencia de parentescos biológicos entre ellos, así como patrones de enterramiento semejantes entre individuos biológicamente relacionados. En la **figura 10** se representa la planta general del yacimiento neolítico de Can Gambús-1 (Roig et al., 2010), señalándose las estructuras funerarias estudiadas en la presente tesis doctoral. Por otro lado, en la **tabla 1** se indica para cada individuo estudiado qué tipo de muestras se han analizado, así como su sexo antropológico y edad aproximada.

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos con la secuenciación Sanger, se analizaron esas muestras a través de la técnica MPS, o *Mass Pararell Sequencing* (“Secuenciación Masiva en Paralelo”), también comúnmente designada por NGS, *Next Generation Sequencing* (“Secuenciación de Nueva Generación”). Este análisis fue realizado en los laboratorios del equipo de investigación de Genomics Core Facility de la Universitat Pompeu Fabra, Barcelona (Cataluña, España). Se eligió como plataforma la tecnología *MiSeq Illumina®*, siguiéndose el protocolo e indicaciones de análisis recomendadas por la plataforma para “*Human mtDNA D-loop Hypervariable Region Guide*”, 15034858 01, de Febrero de 2016,

exceptuando algunos pasos que se comentarán a continuación. En primer lugar, se optó por la amplificación de fragmentos cortos utilizando los primers MII, de la tabla 2 del referido manual. Por otro lado, teniendo en cuenta el nivel de degradación detectado durante la secuenciación tradicional, para algunas muestras se han utilizado 12, en vez de 10, en la primera amplificación del paso designado en el manual por “*mt D-loop PCR*”.

Para la interpretación de los polimorfismos donde se obtuvieron dos bases simultáneamente, comúnmente designado por “doble pico” (por ejemplo, A/G o C/T), en el laboratorio se estableció como criterio la aceptación de la base observada en por lo menos 70% de las secuencias analizadas. Por ejemplo, si se observara A (74%) y G (26%), se aceptaría como resultado la base A.

Figura 10: Planta general de la necrópolis neolítica de Can Gambús -1 (Fuente: Roig et al., 2010). Se señala con círculos verdes las estructuras cuyos individuos se han estudiado en la presente tesis.



forma como habían sido sepultados. En el citado estudio, los autores describen que, aunque hayan podido determinar el posible vínculo materno entre tres individuos, en general, no existen lazos biológicos entre la mayoría de los individuos enterrados. Así, no se han encontrado hasta el momento influencias por vía materna en el ritual de enterramiento ni de la necrópolis de Gurgy (Le Roy et al., 2016), ni en la de Can Gambús-1. Ya que también en ambas no fue posible la obtención de resultados del análisis de cromosoma Y, la cuestión de una posible influencia paterna en la organización de ambas necrópolis permanece en abierto. Otro elemento importante presente en ambos estudios se refiere a la dieta. Efectivamente, tanto en Gurgy, como en Can Gambús-1, no existen diferencias significativas en la dieta de los individuos (Fontanals-Coll et al., 2015; Le Roy et al., 2016). Esto podría significar que la comunidad funcionaba como un todo, sin dividirse por ejemplo en clanes o familias, no verificándose diferencias significativas en la nutrición de los individuos.

Tabla 1. Individuos analizados del yacimiento arqueológico de Can Gambús -1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España), respectivas muestras biológicas analizadas, así como el sexo y edades determinados a nivel antropológico.

Estructura	Individuo	Muestra(s)	Sexo antropológico (Fuente: Fontanals et al., 2015)	Edad antropológica (Fuente: Fontanals et al., 2015)
E184	725	725CG1, 725CG2, 725CG3: Tres piezas dentales - premolares	Masculino	>70 años
E221	543	543CG1, 543CG2, 543CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	60-70 años
E208	569	569CG1, 569CG2, 569CG3: Tres piezas dentales - premolares	Femenino	45 años
E137	612	612CG1, 612CG2, 612CG3: Tres piezas dentales - premolares	Masculino	25-35 años
E442	1417	1417CG1, 1417CG2, 1417CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	18-25 años
E532	1688	1688CG1, 1688CG2, 1688CG3: Tres piezas dentales - molares	Femenino	40-43 años
E497	1534	1534CG1, 1534CG2, 1534CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	25-35 años
E116	150	150CG1, 150CG2, 150CG3: Tres piezas dentales - molares	Femenino	18-25 años
E113	306	306CG1, 306CG2, 306CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	33-45 años
E167	265	265CG1, 265CG2, 265CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	25-35 años
E176	256	256CG1, 256CG2, 256CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	Adulto
E247	583	583CG1, 583CG2, 583CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	33-45 años
E180	232	232CG1, 232CG2, 232CG3: Tres piezas dentales - molares	Femenino	Adulto
E110	713	713CG1, 713CG2, 713CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	25-35 años
E161	246	246CG1, 246CG2, 246CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	25-35 años
E130	261	261CG1, 261CG2, 261CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	70 años
E674	1858	1858CG1, 1858CG2, 1858CG3: Tres piezas dentales - molares	Femenino	18-25 años
E668	1843	1843CG1 Y 1843CG2 - molares 1843CG3 - premolar	Masculino	25-35 años
E166	252	252CG1, 252CG2, 252CG3: Tres piezas dentales - molares	Masculino	40-60 años
E665	1864	1864CG1 y 1864CG3 - dos premolares 1864CG2 - molar	Femenino	45-60 años
E45	363	363CG1, 363CG2, 363CG3: Tres piezas dentales - premolares	Indeterminado	33-45 años
E664	1825	1825CG1, 1825CG2, 1825CG3: Tres piezas dentales - molares	Femenino	33-45 años

Tabla 2: Individuos analizados pertenecientes al yacimiento arqueológico de Can Gambús -1, sus respectivas estructuras y muestras analizadas. Se detalla también el haplotipo y siempre que fue posible, el haplogrupo mitocondrial determinado. f.r: frecuencia relativa; *: Actualizado en Marzo 2020

Estructura	Individuo	Rango de lectura	Haplotipo mitocondrial consenso	Haplogrupo mitocondrial consenso	Frecuencia del Haplogrupo en la base de datos AmtDB
E184	725	---	Sin resultado	Sin resultado	---
E221	543	(81-390; 16105-16400)	152C 263G 315.1C 16145A 16298C 16362C	H6a1 + 152C*	H6a: 1/411*
E208	569	(81-390; 16105-16280)	263G 309.1C 309.2C 315.1C	H	H: 69/411*
E137	612	---	Sin resultado	Sin resultado	---
E442	1417	(16105-16400)	16362C	H1b*	H1: 2/411*
E532	1688	(10-390; 16105-16400)	263G 315.1C 16222T 16261T	H3p + 16261T*	H3: 4/411*
E497	1534	(81-390; 16105-16400)	185A 228A 263G 295T 315.1C	J1c	J1c: 4/411*
E116	150	(10-390; 16105-16280)	73G 263G 315.1C 16179T	U4	U4: 25/411*
E113	306	(57-390; 16105-16400)	72C 263G 315.1C 16298C 16326G	HV0 + 16326G	HV0: 7/411*
E167	265	(16105-16400)	16172C 16304C	H5 + 16172C	H5: 13/411*
E176	256	(81-390; 16105-16280)	263G 315.1C	H	H: 69/411*
E247	583	(10-129; 16105-16400)	73G	H4a	H4: 1/411*
E180	232	(10-390; 16105 -16400)	239C 263G 16298C 16326G 16362C	H6a1 +16326G*	H6a: 1/411*
E110	713	---	Sin resultado	Sin resultado	---
E161	246	(81-390)	249del 263G 292C 315.1C	H20a1a	H20: 0/411*
E130	261	(10-390; 16105-16400)	73G 263G 315.1C 16221T	HV4	HV: 4/411*
E674	1858	(16105-16400)	CRS	H	H: 69/411*
E668	1843	(58-340; 16105-16400)	73G 185A 228A 263G 295T 16126C 16362C	J1c	J1c: 4/411*
E166	252	(81-390; 16105-16400)	150T 263G 315.1C 239C 16126C 16298C 16362C	H6a1 + 16126C*	H6a: 1/411*
E665	1864	(10-390; 16105-1640)	263G 315.1C 16298C	HV	HV:: 4/411*
E45	363	(10-390)	73G 263G 315.1C	Indeterminado	---
E664	1825	(10-390)	263G 315.1C	Indeterminado	---

Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico neolítico de El Llord (Castellar de la Ribera, Lleida, Cataluña, España)

Información arqueológica previa

El conjunto de inhumaciones del yacimiento arqueológico neolítico de El Llord también pertenece al horizonte de la “Cultura de los Sepulcros de Fosa”, pero en este caso dentro del horizonte conocido como “Solsonià”, caracterizado por la construcción con losas de piedra de estructuras funerarias en cista o cámaras megalíticas. Cronológicamente se sitúa a finales del V e inicios del IV milenio cal BC (Gibaja et al., 2020).

En la necrópolis de El Llord, se documentaron siete cámaras megalíticas y un menhir, hallándose evidencias óseas de 11 individuos humanos. En la estructura El Llord I se han documentado 40 punzones de hueso fragmentados, una plaqueta de hueso con dos agujeros de suspensión, dos colmillos de jabalí, un caracol marino (*Cassis*), con agujero de suspensión, tres hachas de piedra pulida, dos hojas de sílex opaco, una de color blanco y otra de color grisáceo (Castany, *in press*). En El Llord II, solo uno de los individuos presentaba ajuar, estando constituido por 60 punzones de huesos muy fragmentados, mezclados con los huesos, especialmente en la zona de las costillas, y dos colmillos de jabalí partidos por la mitad con agujero de suspensión, dispuestos a lado y lado del cráneo (Castany, *in press*). Actualmente, los restos arqueológicos encontrados en este yacimiento arqueológico están depositados en el Museo Diocesano y Comarcal de Solsona (Lleida, Cataluña, España).

Análisis genético

De los 11 individuos documentados, únicamente se han analizado cuatro, en base a la disponibilidad ofrecida por el Museo Diocesano y Comarcal de Solsona. Para averiguar si los enterramientos habían tenido algún vínculo biológico, se han seleccionado aquellos individuos pertenecientes a tumbas múltiples. De El Llord I se ha analizado una mujer adulta, de aproximadamente 25-35 años, y un individuo subadulto de entre los 17 -18 años. De El Llord II, se ha estudiado los dos individuos encontrados, dos mujeres adultas, con edades comprendidas entre 20-33 y 25-35 años. Durante la excavación no se evaluó si los enterramientos fueron simultáneos, y sólo se dispone de una única datación del individuo de 25-35 años de El Llord I (Morell et al. 2018). Por otro lado, en la **tabla 3** se indica para cada individuo el tipo de muestra analizada, así como su sexo antropológico y edad aproximada.

Resultados genéticos

Con respecto al análisis de marcadores autosómicos, no ha sido posible la obtención de resultados consenso.

En lo que respecta al análisis mitocondrial, fue posible la determinación de resultados para los cuatro individuos analizados. En la **tabla 4**, se detallan los haplotipos determinados, así como el haplogrupo mitocondrial consenso, siempre que fue posible. Los dos individuos de El Llord II comparten el mismo linaje mitocondrial. En el caso de El Lord I, aunque para ambos individuos se han obtenido resultados, para el individuo 2LL solamente fue posible obtener datos para un intervalo de la región *D-loop* más corto que para el individuo 1LL. Sin embargo, comparando el rango de lectura común, (28-128), no es posible excluir la pertenencia a un mismo linaje materno.

Discusión de los resultados genéticos

En el caso específico de El Llord II, se verificó que ambos individuos compartían el mismo linaje materno. Sin embargo, dada la forma de transmisión del mtDNA, no es posible precisar de qué tipo de relación de parentesco se podría tratar (hermanas, madre-hija, etc.). No siendo un enterramiento simultáneo, la edad de ambos individuos no es un factor que facilite la determinación de posibles parentescos biológicos. Aunque a primera vista pueda parecer una hipótesis compleja, el hecho es que una de las mujeres pudo haber fallecido con 20-30 años, y su descendiente (hija o nieta) haber fallecido décadas después, también dentro del mismo rango de edad.

Considerando tanto las estructuras de El Llord I como las de El Llord II, los individuos parecen ser enterrados de acuerdo con un posible ritual familiar, dándose primacía a un posible vínculo biológico en detrimento de otras costumbres sociales presentes en otras necrópolis, como podría ser el enterramiento solitario de individuos adultos, igual al observado en el yacimiento neolítico de Can Gambús-1. Lo observado en el yacimiento de El Llord fue también descrito en el yacimiento Koszyce (2880–2776 BCE, Polonia), donde se describe el análisis genético de 15 individuos neolíticos que, a pesar de una probable muerte violenta, han pasado por un ritual de enterramiento muy cuidadoso, dándose prioridad a los lazos biológicos (Schroeder et al., 2019), a semejanza de lo observado en El Llord, aunque en este último yacimiento no se observaran signos de violencia. En Koszyce los investigadores han llevado a cabo un estudio de linajes, tanto materno como paterno, verificándose un gran conocimiento de los elementos de la comunidad neolítica sobre los lazos de parentesco entre los fallecidos a la hora de enterrarlos, describiéndose que las mujeres estaban enterradas con sus hijos e hijas, así como hermanos y/o hermanas que estaban también enterrados siempre juntos. En el estudio de

Koszyce (Polonia), los autores destacan el “*fuerte sentido de afiliación familiar y cohesión*” demostrado en el ritual funerario, posiblemente como forma de reforzar los lazos biológicos como pilar de funcionamiento de esa comunidad en cuestión. Así, es probable que el cuidadoso posicionamiento de los individuos estudiados en el yacimiento de El Llord, sepultando posibles parientes juntos en la misma tumba, revele la clave para conocer el modo de organización social.

Así, ambos yacimientos neolíticos, tanto El Llord (España) como Koszyce (Polonia), podrán representar un tipo de sociedad neolítica distinta a la observada en Can Gambús-1. Es de destacar también la importancia de que El Llord (España) y Koszyce (Polonia) no se encuentran en un mismo punto geográfico y, aun así, se verifica una tendencia semejante para el entierro de individuos emparentados.

Tabla 3. Individuos analizados del yacimiento arqueológico de El Llord (Castellar de la Ribera (Solsonès), Cataluña, España), muestras biológicas analizadas, sexo y edades determinados a nivel antropológico.

Estructura	Individuo	Muestra(s)	Sexo antropológico	Edad Antropológica
El Llord I	1LL	1LL1 y 1LL2 Dos fragmentos cortados de la porción petrosa, a partir de uno de los huesos temporales.	Femenino	25-35 años
El Llord I	2LL	2LL1 y 2LL2 Dos fragmentos cortados de la porción petrosa, a partir de uno de los huesos temporales.	Indeterminado	Joven
El Llord II	3LL	3LL1 y 3LL2: Dos piezas dentales (molares)	Femenino	---
El Llord II	4LL	4LL1: una pieza dental, molar 4LL2: una pieza dental, incisivo	Femenino	---

Tabla 4: Individuos analizados pertenecientes al yacimiento arqueológico neolítico de El Llord (Castellar de la Ribera (Solsonès), Cataluña, España), donde se detalla el haplotipo y, siempre que fue posible, el haplogrupo mitocondrial determinado, así como la frecuencia en la base de datos

Individuo	Rango de lectura	Haplotipo mitocondrial consenso	Haplogrupo consenso	Frecuencia del Haplogrupo en la base de datos AmtDB
1LL	(28-390; 16140-16398)	73G 263G 315.1C 16311C	R1	1/411 (20 Marzo 2020)
2LL	(8-128)	73G	Indeterminado	---
3LL	(29-316; 16094-16400)	73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 16126C 16294T 16304C	T2b	20/411 (20 Marzo 2020)
4LL	(29-390; 16094-16400)	73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 16126C 16294T 16304C	T2b	20/411 (20 Marzo 2020)

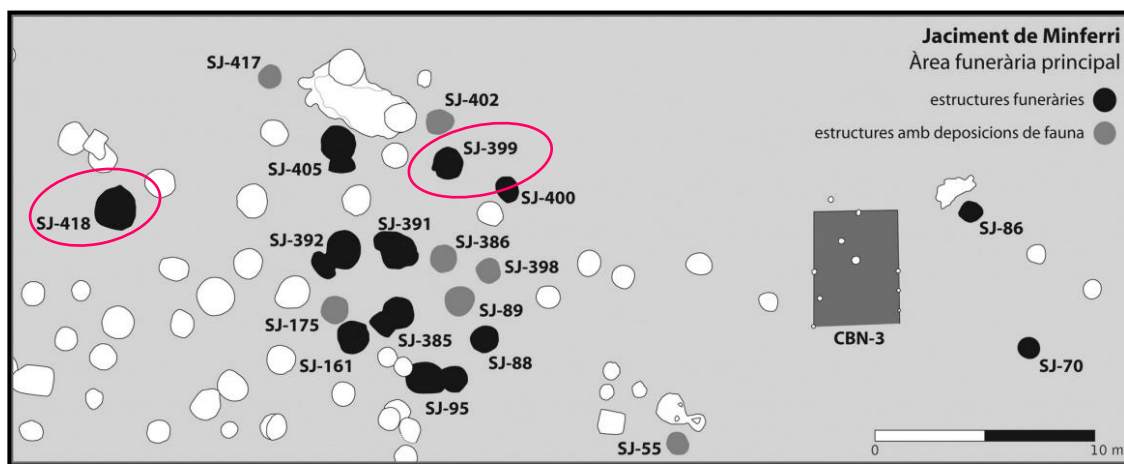
Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico de las Edades del Cobre-Bronce de Minferri (Lleida, Cataluña, España)

Información arqueológica previa

El yacimiento de Minferri (2100-1650 cal. B.C.) es considerado un yacimiento de referencia de la prehistoria reciente en la Península Ibérica (Palomo et al., 2012). Hasta el año 2012, se habían excavado aproximadamente 1,5 hectáreas (ha), de las 10 ha que se estima que podría ocupar. De acuerdo con Palomo y colaboradores (2012), se han encontrado 425 estructuras excavadas en el subsuelo, 170 de las cuales se habrían destinado al almacenamiento de cereales. Por otro lado, los mismos autores señalan también la presencia de 66 fosas que, entre otras utilidades, se emplearon como enterramientos. En ellos se documentaron los restos óseos de aproximadamente 50 individuos humanos. Para el presente estudio, la dirección del yacimiento seleccionó dos de los cuatro silos de Minferri (SJ-399 y SJ-418) descritos como enterramientos colectivos, indicados en la **figura 14**.

La información antropológica de la que se disponía previamente a los análisis genéticos sobre cada silo, se indica a continuación en la **tabla 5**.

Figura 14. Planta de una de las zonas del yacimiento de Minferri, donde se localizan los dos silos analizados en el presente estudio (SJ-399 y SJ-418). Fuente: Espinet et al., 2014.



Análisis genético

Teniendo en cuenta el contexto arqueológico, el estudio genético tuvo como objetivo verificar posibles parentescos biológicos entre los individuos enterrados en el mismo silo, así como, entre los individuos inhumados en ambos. Se han estudiado un total de 16 individuos, siete enterrados en el primer silo (SJ-399) y nueve en el segundo silo (SJ-418).

Resultados genéticos y su interpretación

Resultados de mtDNA

Los resultados consenso del análisis de mtDNA para cada individuo se han obtenido tras la lectura de todas las secuencias, siendo que cada una de ellas replicada al menos cuatro veces. En casos puntuales, no se ha aceptado la mutación por no haberse podido replicar con los resultados de las otras muestras del mismo individuo y/o con la misma muestra. En la **tabla 6** se presentan los perfiles genéticos consenso obtenidos tras la valoración de los resultados, así como los haplogrupos más probables. A este respecto, se han podido determinar cinco linajes maternos distintos. De los nueve individuos, siete pueden ser agrupados en tres distintos linajes: 5310 y 5312 pertenecen a un linaje, los individuos 5213 y 5307 a otro, y los individuos 5349, 5264 y 5339 al tercero. Los otros individuos exhiben haplotipos mitocondriales diferentes, por lo que no están emparentados, por lo menos, por vía materna.

Resultados de nuDNA

Con respecto a la información nuclear, cada perfil autosómico fue repetido tres veces. Fue posible obtener resultados para los individuos 5349, 5312, 5310, 5307, 5339, 5264 y 5352 (**tabla 7**). Utilizando la herramienta *BlindSearch*, disponible en el software *Familias3* v3.2.3 (Kling, et al., 2014), se han buscado todos los parentescos posibles entre estos individuos. Esta herramienta no tiene en consideración la información mitocondrial previamente determinada. En el presente caso el resultado obtenido es “*no-Informativo*”, teniendo en cuenta que no se ha obtenido información autosómica para todos los individuos y se observan importantes pérdidas alélicas. El único resultado que se obtuvo del software fue “madre-hijo/a”, información ésta contraria a la obtenida con el genoma mitocondrial

A parte de la información autosómica, se han analizado también 32 marcadores X-InDels. De los 16 individuos, se ha podido obtener información para los individuos 5213, 5312, 5310, 5307 y 5264 (**tabla 8**). Observando sus perfiles, es posible descartar ciertas relaciones de parentesco, teniendo siempre en cuenta el modo de transmisión del cromosoma X. En la **tabla 9**

se presentan los valores de LR para algunas de las relaciones de parentesco posibles entre los individuos, teniendo en cuenta la información obtenida para los marcadores de X-InDels, utilizando la base de datos publicada en el **artículo 3**. Por otro lado, los valores de LR asociados a las relaciones de parentesco presentes en la **tabla 9** han tenido en cuenta la información mitocondrial obtenida, ya que permitió descartar algunos parentescos, tales como “madre-hija”.

❖ Entre los individuos **5312** y **5310** se puede observar una incompatibilidad mendeliana (marcador 3727), considerando por ejemplo la hipótesis de maternidad entre ambas. En el marcador en cuestión, los dos individuos son homocigotos distintos (el individuo 5312 es 2, y el individuo 5310 es 1). Teniendo en cuenta que es la única incompatibilidad mendeliana encontrada, se podría proponer la hipótesis de maternidad, siempre y cuando se plantee una de las tres hipótesis siguientes:

- a) Pérdida alélica (el individuo 5312 sería 1-2 y el individuo 5310 sería 1-2, siendo los alelos rojos la información perdida);
- b) Mutación (el alelo 2 de la presunta madre (individuo 5312) ha mutado para 1 en la hija (5310);
- c) *Silent allele*, (el individuo 5312 sería s-2 y el individuo 5310 sería 1-s, siendo s el alelo “nulo”, no visible en los electroferogramas, pero que ambas compartirían). La probabilidad de este parentesco, considerando la hipótesis de maternidad, frente a no estar emparentadas, es de LR=1,084.

Pensando en otras hipótesis que no la maternidad, y teniendo en cuenta tanto los perfiles de cromosoma X como de mtDNA, se pueden plantear otros parentescos cercanos, tales como que se trate de hermanas (LR=0,317), o de abuela materna – nieta (LR=1,353), ambos supuestos apoyados por los dos marcadores genéticos referidos anteriormente. La hipótesis abuela paterna-nieta se puede descartar siempre y cuando no exista la posibilidad de incesto, dado que comparten el mismo haplotipo mitocondrial.

❖ Observando los individuos **5312** y **5307**, se puede descartar relaciones de parentesco por vía materna, ya que no comparten el mismo haplotipo materno. Sin embargo, la información del cromosoma X para las dos mujeres permite plantear dos parentescos: abuela paterna – nieta (LR=3,199) o medio hermanas – paternas (LR=3,199), ya que para cada marcador donde se obtuvieron alelos en ambas personas, no se observa ninguna incompatibilidad mendeliana respecto de estas dos posibilidades. Aparte de estos dos parentescos, los individuos 5312 y 5307 pueden estar emparentados por cualquier otro parentesco por vía paterna, como por ejemplo tía paterna – sobrina (LR=2,216), primas vía paterna (LR=2,216), etc.

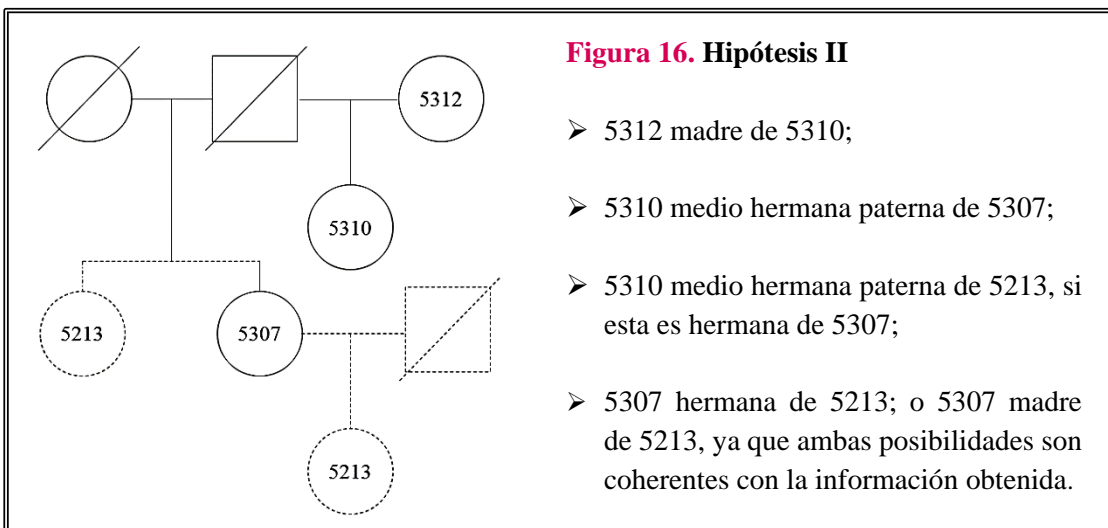
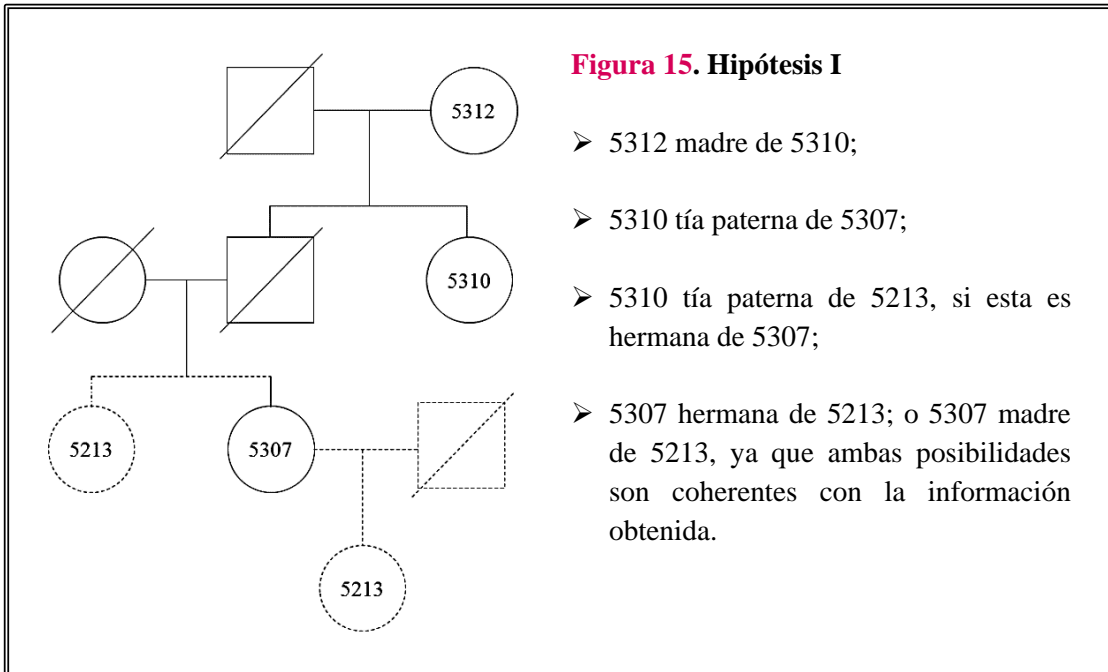
❖ Por último, considerando los individuos **5307** y **5310**, el análisis es muy similar a lo previamente explicado para el dúo 5312 y 5307. Entre los individuos 5307 y 5310 se puede descartar cualquier parentesco por vía materna, así como la relación “abuela paterna – nieta”, dadas las edades de los individuos (6-7 y 12-15 años). En todos los marcadores de X-Indels donde se obtuvieron resultados, nunca se han encontrado incompatibilidades mendelianas, por lo que se puede plantear el parentesco medio hermanas – paternas (LR=2,241), o cualquier otro parentesco no cercano vía paterna (tía paterna sobrina, primas –paternas, etc.).

Dado que no se ha llevado a cabo el análisis de marcadores de linaje paterno (cromosoma Y), no se pueden establecer relaciones de parentesco vía paterna entre los 16 individuos estudiados. Por otra parte, debido al elevado número de *allelic* y *loci dropout* observado en el análisis de marcadores de cromosoma X (**tabla 8**), se concluye que los resultados de X-InDels no han aportado mucho, ya que los valores de LR obtenidos (**tabla 9**) han sido muy próximos a 1, lo cual no permite excluir las hipótesis contrastadas. Sin embargo, conjugando los resultados obtenidos, tanto de mtDNA como de marcadores autosómicos y de cromosoma X, así como los datos antropológicos relativos a las edades de los individuos, es posible proponer por lo menos cuatro hipótesis de familias biológicas entre los individuos 5312, 5310, 5307 y 5213, representados a continuación en las **figuras 15-17**. En este contexto, la hipótesis III tiene en cuenta un posible caso de incesto, representado por *, teniendo en cuenta tanto la información de mtDNA como de cromosoma X.

Aunque la ausencia de resultados de otros individuos del silo 399 impide generalizar, se puede plantear la posibilidad de que otros individuos de ese enterramiento estuviesen emparentados con individuos enterrados en el silo 418.

Por otro lado, igual que lo documentado en Míferri entre los individuos 5310-5312 (por ejemplo), también en el yacimiento de “Los Tolmos” (Palomo – Díez, 2015) se repite el patrón de enterramiento familiar, donde las tres mujeres (LTB1, LTB2 y LTB3) enterradas simultáneamente, parecen estar relacionadas por vía materna.

Figuras 15-17. En cada una de las siguientes figuras se presentan cuatro posibles hipótesis de parentesco entre los individuos 5312, 5310, 5307 y 5213 del yacimiento arqueológico de Minferri (Lleida, Cataluña, España). Cada círculo representa “Mujer”; cada cuadrado “Hombre”, cada figura tachada significa “no disponible para el análisis genético”; * representa relación incestuosa. (Imágenes de elaboración propia).



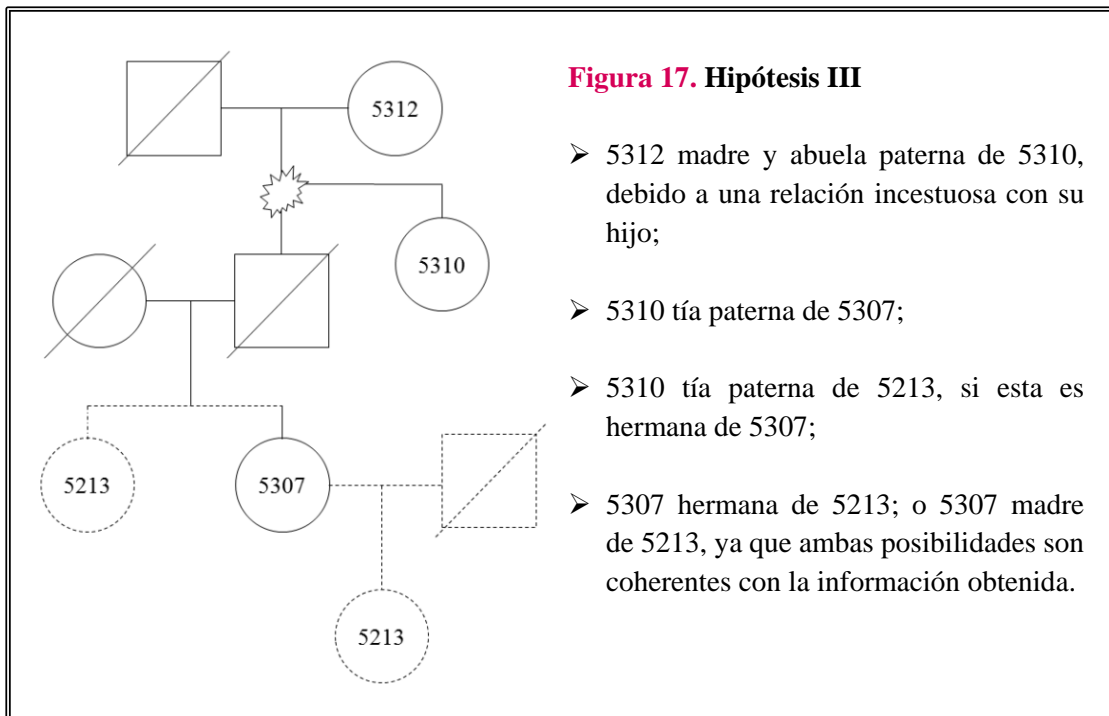


Figura 17. Hipótesis III

- 5312 madre y abuela paterna de 5310, debido a una relación incestuosa con su hijo;
- 5310 tía paterna de 5307;
- 5310 tía paterna de 5213, si esta es hermana de 5307;
- 5307 hermana de 5213; o 5307 madre de 5213, ya que ambas posibilidades son coherentes con la información obtenida.

Tabla 5. Datos arqueológicos de los 16 individuos (Ind.) estudiados pertenecientes al yacimiento de Minferri (Lleida, Cataluña, España), incluyendo las muestras analizadas en el estudio genético, sexo y edades determinados a nivel antropológico, y su respectiva nomenclatura.

Silo	Ind.	Tipo de enterramiento	Sexo antropológico	Grupo de Edad	Edad antropológica	Muestras biológicas estudiadas
399	5222	Individual	No determinado	Infantil	2 años	1MIN1 y 1MIN2 Dos piezas dentales - molares
399	5252	Individual	Masculino	Adulto	> 50 años	2MIN1 y 2MIN2 Dos piezas dentales - premolares
399	5274	Individual	Femenino	Adulto	30-40 años	3MIN1: pieza dental – molar 3MIN2: piza dental- incisivo
399	5220	Individual	Masculino	Adulto	18-20 años	4MIN1: pieza dental - molar 4MIN2: pieza dental- premolar
399	5212	Doble simultanea	No determinado	Infantil	7-8 años	5MIN1 y 5MIN2 Dos piezas dentales - molares
399	5199	Individual	Femenino	Adulto	25-30 años	6MIN1 y 6MIN2 Dos piezas dentales - molares
399	5213	Doble simultanea	No determinado	Perinatal	12-18 meses	7MIN1: pieza dental - molar 7MIN2 – varios fragmentos dentales
418	5311	Cuádruple simultaneo	No determinado	Infantil	2-3 años	8MIN1 y 8MIN2 Dos piezas dentales - molares
418	5349	Individual	Femenino	Adulto	40-50 años	9MIN1 y 9MIN2 Dos piezas dentales - molares
418	5312	Cuádruple simultaneo	Femenino	Adulto	30-40 años	10MIN1 y 10MIN2 Dos piezas dentales - molares
418	5310	Cuádruple simultaneo	No determinado	Infantil	6-7 años	11MIN1 y 11MIN2 Dos piezas dentales - molares
418	5307	Individual	No determinado	Joven	12-15 años	12MIN1: pieza dental - incisivo 12MIN2: pieza dental- molar
418	5339	Individual	Femenino	Adulto	50-60 años	13MIN1 y 13MIN2 Dos piezas dentales - molares
418	5264	Individual	Femenino	Adulto	40-50 años	14MIN1: pieza dental - premolar 14MIN2: pieza dental- molar
418	5338	Individual	No determinado	Infantil	2-3 años	15MIN1 y 15MIN2 Dos piezas dentales: incisivos
418	5352	Individual	No determinado	Perinatal	3-6 meses	16MIN1 y 16MIN2 Varios fragmentos óseos

Tabla 6. Perfiles genéticos (haplotipos) consenso de mtDNA de los 16 individuos estudiados del yacimiento de Minferri (Lleida, Cataluña, España), así como, su haplogrupo más probable y su frecuencia en la base de datos AmtDB. * (Actualizado en marzo 2020)

Individuo	Rangos de lectura	Haplotipo consenso	Haplogrupo consenso	Frecuencia del haplogrupo en la base de datos AmtDB
5222	---	Sin resultados	---	---
5252	---	Sin resultados	---	---
5274	---	Sin resultado consenso	---	---
5220	---	Sin resultados	---	---
5212	---	Sin resultado consenso	---	---
5199	---	Sin resultado consenso	---	---
5213	(8-390; 16105-16400)	73G 263G 315.1C 16256T 16270T	U5a2	U5a: 72/754
5311	---	Sin resultado consenso	---	---
5349	(8-390; 16105-16400)	263G 309.1C 315.1C 366A	H	H: 198/754*
5312	(8-390; 16105-16400)	73G 152C 263G 315.1C 16224C 16311C 16319A	K1b1a1	K1b: 17/754*
5310	(8-390; 16105-16400)	73G 152C 263G 315.1C 16224C 16311C 16319A	K1b1a1	K1b: 17/754*
5307	(8-390; 16105-16400)	73G 263G 315.1C 16256T 16270T	U5a2	U5a: 72/754*
5339	(8-390; 16105-16400)	263G 309.1C 315.1C 366A	H	H: 198/754*
5264	(8-390; 16105-16400)	263G 309.1C 315.1C 366A	H	H: 198/754*
5338	(8-390; 16105-16400)	72C 263G 315.1C 16298C	HV0	HV0: 4/754*
5352	(8-390; 16105-16400)	73G 263G 16126C 16278T 16294T	T2f3	T2f: 5/754*

Tabla 7. Perfiles genéticos consenso obtenidos, tras la valoración de los resultados obtenidos para los individuos estudiados del yacimiento arqueológico de Minferri en las sucesivas amplificaciones de STRs autosómicos, llevadas a cabo con el kit AmpF ℓ STR ® MiniFiler ™ PCR Amplification Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC).

(--) Casos en los que no fue posible obtener un consenso para el marcador correspondiente.

Individuo	D13S317	D7S820	AMEL	D2S1338	D21S11	D16S539	D18S51	CSF1PO	FGA
5349	--	11	X	21-23	28-31	--	--	--	--
5312	12	8-10	--	17-18-20 a)	28-30	15-16	--	8-9-13 a)	20-22
5310	--	--	X	17-18	--	--	12-16	10-11	--
5307	8-9	---	X	16-29	28-31,2	8	15-16	9-12-13 a)	--
5339	9-12	--	X	20-25	32,2-33,2	8	13-19	11-12	--
5264	10-12	--	--	16	31,2	--	12	10,2	--
5338	--	--	--	--	--	--	--	--	--
5352	12-13	--	X	17-23	--	--	13-14	10-12	--

a) Debido a la antigüedad y al elevado estado de descomposición de la muestra, para estos marcadores se han obtenido durante las diversas amplificaciones 3 alelos distintos.

Tabla 8. Perfiles genéticos consenso obtenidos tras la valoración de los resultados obtenidos para los individuos analizados del yacimiento arqueológico de Minferri, en las sucesivas amplificaciones de X-InDels, publicados de acuerdo con Pereira et al., (2012). (-) Casos en los que no fue posible obtener un consenso para el marcador correspondiente.

Individuo	3736	3730	1361	329	3716	3692	2637	3740	198	3703	3690	3722	3732	3712	1736	3719	2089	3774	3760	3701	2612	1839	3754	111	2652	1511	2692	357	356	243	3727	3753	
5213	1	2	1-2	1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
5312	1	--	1-2	2	1	--	1	2	2	2	1-2	1-2	2	2	2	--	--	2	1-2	1-2	1-2	--	--	--	--	1	2	2	2	--	2	--	
5310	1-2	1-2	1-2	1-2	1	2	1-2	1-2	1-2	2	1-2	1-2	2	1-2	1-2	1-2	1-2	2	1-2	2	1-2	1	2	1-2	1	1-2	1-2	2	--	--	1	--	
5307	1	--	1-2	1-2	1-2	--	1	1-2	2	2	2	2	2	2	1	--	--	2	1	2	1-2	1	2	2	1	1-2	2	2	2	1	2	2	
5264	2	--	--	2	--	--	--	--	1	--	--	--	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Tabla 9. Valores de LR obtenidos, considerando el análisis de los 32 X-InDels (Pereira et al., 2012), comparando distintas hipótesis de parentesco biológico. Los valores de LR presentados han sido obtenidos comparando cada hipótesis de parentesco indicada *versus* “no emparentado”.

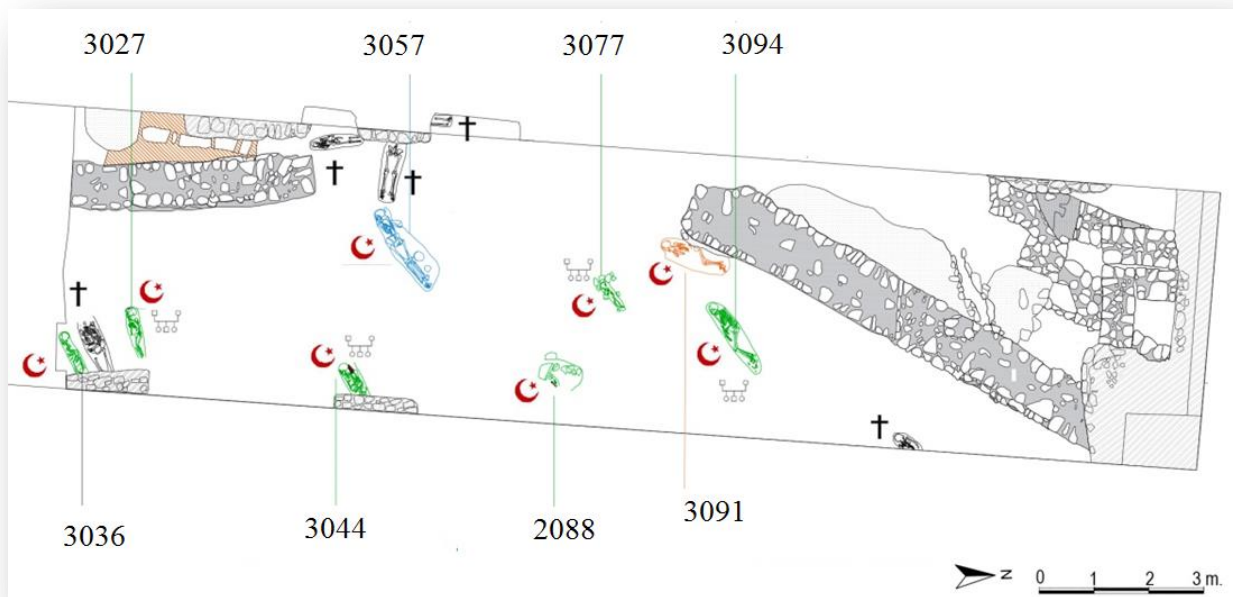
Individuo 1	Individuo 2	Relación de parentesco	LR	Individuo 1	Individuo 2	Relación de parentesco	LR
5312	5310	Maternidad	1,084	5312	5310	Abuela paterna - nieta	1,353
5213	5307	Hermandad	2,782	5312	5310	Abuela materna - nieta	1,353
5312	5310	Hermandad	0,317	5312	5307	Tía paterna - sobrina	2,216
5312	5307	Medio-hermanas vía paterna	3,199	5312	5307	Primas	2,216
5310	5307	Medio-hermanas vía paterna	2,241	5310	5307	Primas	1,616
5213	5307	Medio-hermanas vía paterna	1,609	5213	5307	Primas	1,287
5213	5312	Medio-hermanas vía paterna	1,609	5213	5312	Primas	1,287
5312	5310	Medio-hermanas vía paterna	1,353	5312	5310	Primas	1,244
5310	5264	Medio-hermanas vía paterna	1,353	5310	5264	Primas	1,186
5312	5307	Abuela paterna - nieta	3,199	5213	5310	Primas	1,002

Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico medieval de Galligants (Girona, Cataluña, España)

Información arqueológica previa

La intervención arqueológica en 2015-2016, durante la rehabilitación del edificio en la calle Riu Galligants, 5 de la ciudad de Girona, permitió documentar un pequeño cementerio con 13 tumbas datadas entre la primera mitad del siglo VIII y finales del primer cuarto del siglo X d.C. Desde un primer momento, y a pesar de tratarse de una misma fase cronológica, se observó que ocho de las tumbas presentaban una tipología distinta a los enterramientos cristianos. La disposición de los individuos no era en decúbito supino, sino en decúbito lateral mirando hacia el Este, por lo que podían adscribirse al período islámico. En la **figura 18** se representa el yacimiento de Galligants, donde se muestra con ☉ los individuos enterrados según el ritual islámico, y con † los individuos inhumados, mediante el ritual cristiano. En la **tabla 10** se pueden consultar las muestras utilizadas para el estudio genético de los ocho individuos exhumados del yacimiento arqueológico de Galligants.

Figura 18. Plano del yacimiento arqueológico de Galligants (Girona, Cataluña, España), donde se indican numerados los individuos estudiados, enterrados de acuerdo con el ritual islámico, representados por ☉, y con † los individuos inhumados mediante el ritual cristiano



Estudio genético

Este estudio ha seguido dos vías de investigación. En primer lugar, se han estudiado las relaciones de parentesco biológico, evaluando la información recombinante (marcadores autosómicos y de cromosoma X), como la relacionada con el linaje (tanto cromosoma Y, como mtDNA). La otra vía de investigación tuvo como objetivo la determinación del posible origen biogeográfico de los individuos, dada la hipótesis arqueológica inicial, indicando que serían posibles europeos cristianos convertidos al Islam.

Resultados genéticos

Para el análisis de mtDNA, el haplotipo consenso se ha obtenido tras la lectura de las secuencias de cada uno de los individuos (**tabla 11**). Cada secuencia fue replicada por lo menos cuatro veces. En casos puntuales, no se ha aceptado la mutación por no poder replicar los resultados con las otras muestras del mismo individuo y/o de la misma muestra.

Aunque para los ocho individuos se han conseguido perfiles para los análisis de nuDNA, tanto autosómicos, como de cromosoma X, no fue posible obtener un perfil consenso. Con respecto al análisis de STRs autosómicos, solamente fue posible obtener un perfil consenso para los individuos 3057 y 3094 (**tabla 12**). Se han obtenido también ocho perfiles de cromosoma Y, sin embargo, no fue posible hasta el momento replicar los resultados.

Comparando la información autosómica obtenida para los individuos 3094 y 3057, se excluye la relación de parentesco padre-hijo, puesto que en los seis marcadores donde ambos tienen información, se observan tres inconsistencias respecto de la hipótesis de parentesco establecida (marcadores vWA, D19S433 y FGA) (**tabla 12**). Por otro lado, no se pueden establecer o descartar otras relaciones de parentesco vía paterna entre los ocho individuos estudiados, ya que no fue posible determinar un perfil consenso para todos los individuos.

Teniendo en cuenta los resultados de mtDNA obtenidos (**tabla 11**), se considera que los individuos 3027, 3094 y 3077 pertenecen al mismo linaje materno, pudiendo pertenecer a la misma familia materna. Los otros individuos exhiben otros haplotipos mitocondriales, por lo que no están emparentados, por lo menos, por vía materna.

Discusión de los resultados genéticos

Aunque se observa un parentesco por linaje materno entre los individuos 3027, 3094 y 3077, recurriendo al plano del yacimiento (**figura 18**), se verifica que los individuos no han sido enterrados juntos, existiendo varios metros de distancia entre ellos. Eso podrá ser explicado por

distintos momentos de enterramiento, depositando los individuos según iban falleciendo, y no de acuerdo con el vínculo biológico materno entre ellos. Otra posibilidad es que el enterramiento obedeciese a criterios culturales y/o sociológicos, tales como, enterrar a los individuos de acuerdo con el sexo, o también de acuerdo con la posición social.

Teniendo en cuenta los resultados de mtDNA (**tabla 11**), se considera que los individuos pertenecen a haplogrupos predominantes en Europa, salvo el individuo 3057, cuyo haplogrupo tiene un origen biogeográfico materno predominantemente africano. Estos resultados apuntan a una posible conversión de los individuos, o ancestros suyos por vía materna, a la cultura islámica.

Se pretende en un futuro replicar todos los datos de obtenidos de cromosoma Y, así como, llevar a cabo un análisis de AIMs (ancestry informative markers), ya que podrán confirmar el origen biogeográfico de los individuos.

Tabla 10. Muestras utilizadas para el estudio genético de los ocho individuos exhumados del yacimiento arqueológico de Galligants (Girona, Cataluña, España).

Individuo	Nomenclatura utilizada y respectivas muestras analizadas
3044	1HCG1 molar y 1HCG2 incisivo
3036	2HCG1 y 2HCG2: Dos fragmentos óseos cortados a partir de la porción petrosa de uno de los huesos temporales.
3057	3HCG1, 3HCG2 y 3HCG3: Tres piezas dentales: tres molares
3091	4HCG1 4HCG2 y 4HCG3: Tres piezas dentales: tres molares
3094	5HCG1 y 5HCG2: Dos piezas dentales: dos molares
3027	6HCG1 y 6HCG2: Dos piezas dentales: dos molares
3077	7HCG1 7HCG2 y 7HCG3: Tres piezas dentales: tres incisivos
2088	8HCG1 y 8HCG2: Dos piezas dentales: dos molares

Tabla 11: Perfiles genéticos (haplotipos) consenso de mtDNA de los 8 individuos estudiados, así como su haplogrupo más probable.

Individuo	Rangos de lectura	Haplotipo consenso	Haplogrupo consenso	Frecuencia del haplogrupo en la base de datos AmIDB
3044	(48-128; 198-390; 16105-16400)	73G 263G 315.1C 16270T 16311C	U5b1d1	8/309
2088	(51-128; 194-316; 16105-16400)	73G 263G 309.1C 309.2C 315.1C 16126C 16193T 16270T 16311C	J2b1a	5/309
3091	(8-128; 152-353;16105-16400)	73G 189G 194T 195C 204C 207A 263G 315.1C 16223T 16325C 16292T	W6	2/309
3036	(41-109; 190-316;16105-16400)	43T 263G 309.1C 315.1C 16362C	H1bv1	2/309
3027	(8-127; 152-389; 16105-16400)	73G 263G 315.1C 16270T	U5b1d1a	8/309
3094	(8-127; 192-389;16105-16400)	73G 263G 315.1C 16270T	U5b1d1a	8/309
3077	(8-389; 16105-16400)	73G 263G 315.1C 16270T	U5b1d1a	8/309
3057	(190-390; 690-790; 10390-10485; 16105-16400)	195C 247A 263G 315.1C 357G 709A 710C 750G 769A 10398G 16223T 16264T 16270T 16278T 16293G 16311C	L1b	0/309

Tabla 12. Perfiles genéticos consenso obtenidos para los individuos 3094 y 3057, tras el análisis genético con los kits comerciales VeriFiler™ Express y AmpFLSTR™ NGM Select™ PCR Amplification Kit (ThermoFisher Scientific, Foster City, USA).

Individuo	D3S1358	vWA	D16S539	CSF1PO	TPOX	D10S1248	D16S539	D2S1338	Y indel	AMEL	D8S1179	D21S11	D18S51	PENTA E	D2S441	D19S433	TH01
3094	-	14-17	-	-	-	13-15	-	-	-	X-Y	14	30-31.2		-	-	11-14	7-9
3057	16	18-19	13	11-13	10-11	-	-	-	-	-	-	29-30	14-16	5-15	11	15	7-9
Individuo	FGA	D22S1045	D5S818	D13S317	D7S820	D6S1043	D2S441	D3S1358	D1S1656	D12S391	SE33	D10S1248	D1S1656	D12S391	D2S1338	Penta D	
3094	22-23	12-17	-	-	-	-	11	16	15-16	17*	-	-	-	-	-	-	-
3057	20-24	17	-	11-12	8*	19	-	-	-	-	-	-	-	19.3-22	17-23	10	

Estudio de posibles relaciones de parentesco entre los individuos inhumados pertenecientes al yacimiento arqueológico medieval de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España)

Información arqueológica previa

El yacimiento de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona, España.) es un ejemplo de aldea de época visigoda con su necrópolis en un espacio vecino. Excavados ambos en toda su extensión, en la necrópolis se hallaron 35 tumbas que acogían a 37 individuos. Cronológicamente, estuvo en uso aproximadamente 300 años (Roig, 2011, 2015). Según los directores de la excavación, el espacio funerario presenta una distribución más o menos ordenada de las sepulturas, con dos sectores diferenciados espacial y cronológicamente. Ninguno de los individuos inhumados tiene ajuar, a excepción de una tumba (individuo 393) en cuyo interior se halló una pequeña jarra de cerámica en la zona de la cabecera. Según Roig (2012) este tipo de prácticas funerarias siguen las costumbres hispanorromanas en la región.

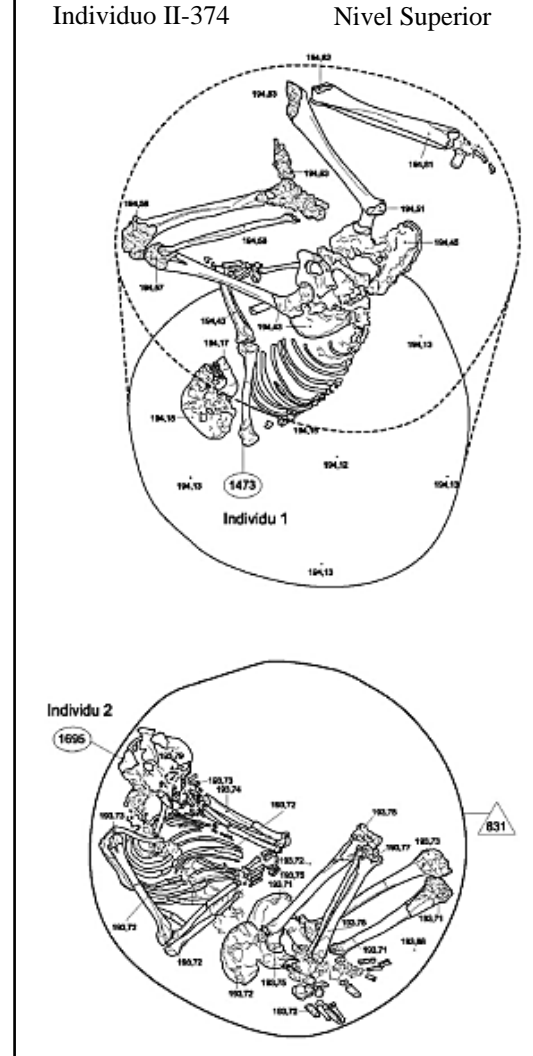
El espacio de la necrópolis, sin embargo, no era un privilegio de toda la comunidad. Así lo demuestra el hecho de que se hayan documentado siete individuos más, depositados y/o arrojados dentro de tres silos y de un pozo de agua, junto a desechos domésticos y a animales, sin ningún tipo de tratamiento funerario, como por ejemplo el individuo 94, o los individuos I y II-374 (Roig, 2015).

Los depósitos humanos anómalos en la necrópolis de Can Gambús-1 (medieval).

Estas estructuras designadas *anómalas* con depósitos humanos están distribuidas por diferentes puntos de la mitad norte del asentamiento, en medio de otros silos de fases anteriores. Por ejemplo, en el silo E94, de donde procede el individuo 94, Roig (2015) describe una singular secuencia de deposiciones diacrónicas sucesivas, “*con un primer individuo adulto (individuo 94) masculino arrojado en el fondo, justo por encima de la piedra de cierre del silo, quedando en una forzada posición anatómica, y tal vez, ligeramente tapado con tierras. (...). Posteriormente, y por encima de este individuo, se arrojó a un perro y se cubrió ligeramente con tierras, y más tarde, se arrojó a un segundo individuo adulto femenino, junto con una oveja y un cráneo de bóvido, todo a la vez y en un mismo momento, tapándose inmediatamente de tierras hasta casi medio metro por debajo de la boca del silo. Finalmente, y en este punto, se echó a un último perro, completándose la secuencia de vertidos de este silo-basurero*”.

Otro ejemplo lo encontramos en el pozo de agua (E374). Se aprecia una sucesión de dos individuos arrojados en momentos distintos, una vez abandonado el pozo. De acuerdo con la descripción de Roig (2015), “*en un nivel inferior, a más de 3 metros de profundidad, y con la mitad del pozo ya rellena de tierras, se documentó a un adulto masculino (individuo I-374) arrojado junto a varios animales muertos en conexión anatómica: dos perros, dos gatos y tres crías de cerdo doméstico, formando todo un mismo paquete. El individuo presentaba una postura totalmente forzada y flexionada, con las piernas dobladas y los brazos cruzados por la cintura (figura 19). Por encima, se echó tierra junto a desechos domésticos con una potencia de casi medio metro. Con posterioridad, y a unos 2,25 m de profundidad desde la boca, se arrojó a un segundo individuo joven femenino (individuo II-374), en este caso tirado directamente de cabeza al interior del pozo, quedando en la característica postura con las piernas en alto y la cabeza abajo. En este caso, se le cubrió de tierras directamente, de manera que, al descomponerse el cuerpo, se mantuvo la posición vertical invertida (figura 19).*”

Figura 19. Pozo de agua donde se han encontrado los individuos I-374 y II-374
Fuente: Roig, 2015



Análisis genético

El análisis de 15 de los individuos inhumados ha tenido dos objetivos. En primer lugar, determinar la existencia de posibles parentescos biológicos, tanto entre los individuos sepultados en la necrópolis, como entre los sepultados en los denominados depósitos anómalos. En segundo lugar, determinar el origen biogeográfico de tales individuos, con el fin de evaluar si los procedentes de los depósitos anómalos podrían pertenecer a otra población. En la **tabla 13** se encuentran detallados los individuos estudiados y sus respectivas muestras biológicas. Se especifican también las dataciones calibradas, así como el sexo y la edad, cuya información ha

sido amablemente cedida por M. García-Collado (por el momento no está publicada al formar parte de la tesis de la citada investigadora).

Resultados genéticos

De los 15 individuos analizados a través del estudio de mtDNA, fue posible obtener resultados de 12 de ellos (**tabla 20**), aunque debido al mal estado de conservación del material genético, han sido necesarias para cada análisis más de tres amplificaciones hasta obtener un resultado consenso. Sin embargo, tras varios intentos fue imposible obtener marcadores genéticos autosómicos.

Observando los resultados obtenidos (**tabla 20**), no se puede descartar la posibilidad de parentesco biológico, por vía materna, en ocho de los 12 individuos. En concreto, los siguientes individuos estarían emparentados entre sí: I-374 y II-393; II-374 y I-392; II-392 y 370 y, finalmente, 381 y 254. Los demás individuos no están emparentados, por lo menos, por vía materna. Cabe destacar los resultados obtenidos para los individuos I y II-374 hallados en uno de los pozos, que pueden estar emparentados por vía materna con otros individuos sepultados en la necrópolis de la aldea visigoda de Can Gambús-1.

Desde el punto de vista biogeográfico, se han obtenido predominantemente haplogrupos mitocondriales europeos, en concreto, haplogrupo H1, H5, H6, U5 y R. Para los individuos 373 y 381 no ha sido posible determinar un solo haplogrupo, teniendo en cuenta el haplotipo consenso obtenido y el rango de lectura.

Discusión de los resultados genéticos

En el estudio del presente yacimiento medieval (**figura Sup.Mat.13**) si por un lado era importante conocer posibles parentescos entre los inhumados de la necrópolis de la aldea visigoda, el estudio de los individuos encontrados en los denominados “depósitos anómalos” ha permitido discutir y poner en cuestión las hipótesis arqueológicas previamente planteadas. Las primeras hipótesis explicadas por el equipo de arqueología, en concreto los investigadores Roig (2011) y Vigil-Escalera (2013) y respectivos colaboradores, sugerían que, dada la ausencia de tratamiento a la hora de depositar a los individuos, posiblemente se trataran de esclavos, extranjeros y/o personas excluidas socialmente de la comunidad, independientemente de su *status* jurídico. Otro punto importante de los depósitos anómalos se refiere al estudio de paleodieta realizado por García-Collado (2016), donde describe que no existen diferencias entre los individuos inhumados del cementerio y de los depósitos anómalos.

De acuerdo con los resultados genéticos obtenidos, se han determinado tres posibles parentescos por vía materna: entre los individuos 370 y II-392, ambos enterrados en la

necrópolis de la aldea; entre los individuos I-392 y II-374 y entre II-393 y I-374, siendo que ambos individuos 374 han sido encontrados en uno de los depósitos anómalos (**figura Sup.Mat.14, C3 y C4**).

Partiendo del hecho que los resultados no permiten descartar directamente ninguna de las hipótesis arqueológicas, la realidad es que, en este momento, es más difícil justificar por lo menos dos de ellas. La primera, la que propone que serían esclavos es ahora un poco más complicada de sostener, a no ser que dentro de una misma familia existiesen unos individuos esclavos y otros no, estando estos últimos enterrados en el cementerio. La segunda, nace de los resultados del análisis de la dieta (García-Collado, 2016). La ausencia de diferencias significativas permite exponer dos alternativas: a) Tanto los individuos encontrados en los depósitos como los del cementerio, fueran o no esclavos, tenían una dieta similar; b) los individuos arrojados a los depósitos no eran esclavos, justificando las semejanzas entre ambas dietas.

La hipótesis de que los individuos encontrados en los pozos y/o basureros fueran extranjeros genera también muchas dudas, ya que por lo menos por vía materna los individuos serían “tan extranjeros” como los sepultados en la necrópolis.

Se podría plantear la hipótesis de la reutilización de los nichos del cementerio, donde pasado un determinado tiempo, los restos óseos podrían ser retirados para dar lugar a otros fallecidos, familiares o no. No obstante, esta hipótesis presenta algunas contradicciones. En primer lugar, tratándose de una aldea visigoda es muy probable que fuesen ya de las primeras comunidades cristianas de la Península Ibérica, por lo que el abandono de un fallecido en un basurero/pozo podría ser considerado como la profanación de un cadáver. En segundo lugar, si se confirmara esta hipótesis, sería esperable encontrar un número muy superior de individuos arrojados a los basureros/pozos. Finalmente, si el objetivo de arrojar a los individuos a los pozos fuera la reutilización de las tumbas, se esperaría observar una acumulación de huesos sin relación entre sí. En los depósitos anómalos de Can Gambús-1, lo que se observa son individuos cuya posición indica que han sido ubicados antes del proceso de esqueletización, estando perfectamente individualizados entre sí, en distintos niveles de los pozos/basureros.

Tabla 13. Individuos analizados del yacimiento arqueológico de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España) y respectivas muestras biológicas analizadas, sexo y edades determinados a nivel antropológico. U.E: Unidad estratigráfica; Ind: Individuo. *Tesis doctoral, datos arqueológicos y antropológicos no publicados.

Datación (Jordi, 2015; García-Collado, 2020*)	Tipo de enterramiento (Jordi et al,2011; Jordi 2015)	U.E. (Jordi et al,2011; Jordi 2015)	Ind.	Muestra(s)	Sexo antropológico (García-Collado, 2020*)	Edad antropológica (García-Collado, 2020*)
VI-s. VIII Datación C ¹⁴ 1345+-35 BP (calibrada 636-723, 82.7%)	Fosa simple, sector oeste del cementerio	UE925	391	391CGM1 y 391CGM2 Dos piezas dentales - molares	Femenino	Adulto
VII-VIII, datación C ¹⁴ 1320+-35 BP (calibrada 650-729, 71.1%)	Depósito anómalo, silo entre las estructuras domésticas	---	94	94CGM1 y 94CGM2 Dos piezas dentales- premolares	Probablemente femenino	Adulto
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	UE879	395	395CGM1 y 395CGM2 Dos piezas dentales -molares	Probablemente masculino	Adulto
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	UE915	370	370CGM1: una pieza dental - molar 370CGM2: una pieza dental - incisivo	Probablemente masculino	Adulto
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	UE901	411	411CGM1 y 411CGM2 Dos piezas dentales - molares	Masculino	Adulto,
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	UE840	381	381CGM1 y 381CGM2 Dos piezas dentales - premolares	Probablemente femenino	Adulto
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	UE826	380	380CGM1 y 380CGM2 Dos piezas dentales - premolares	Masculino	Adulto

VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	UE823	373	373CGM1 y 373CGM2 Dos piezas dentales - molares	Indeterminado	Adulto
VI	Fosa simple, sector este del cementerio	UE623	254	370CGM 1: una pieza dental - incisivo 370CGM 2: una pieza dental - molar	Indeterminado	Adulto
VII-VIII	Depósito anómalo, pozo entre las estructuras domésticas	UE1473	I-374	374CGM1 y 374CGM2 Dos piezas dentales - molares	Indeterminado	Juvenil (15-20 años)
VII-VIII	Depósito anómalo, pozo entre las estructuras domésticas	---	II-374	II-374CGM 1: una pieza dental - molar II-374CGM 2: una pieza dental - premolar	Probablemente masculino	Adulto
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	---	I-393	II-393CGM1y II-393CGM2 Dos piezas dentales- molares	Indeterminado	Juvenil (17-20 años)
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	---	II-393	II-393CGM1 una pieza dental - premolar II-393CGM2: una pieza dental - molar	Probablemente masculino	Adulto
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	---	I-392	I-392CGM1y I-392CGM2 Dos piezas dentales- premolares	Probablemente masculino	Adulto
VI-s. VIII	Fosa simple, sector oeste del cementerio	---	II-392	II-392CGM1y II-392CGM2 Dos piezas dentales- molares	Femenino	Adulto

Tabla 14. Individuos analizados pertenecientes al yacimiento arqueológico de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona, Cataluña, España). Se detalla el haplotipo y, siempre que fue posible, el haplogrupo mitocondrial determinado, así como la frecuencia en la base de datos AmtDB.

Individuo	Rango de lectura	Haplotipo mitocondrial consenso	Haplogrupo consenso	Frecuencia del haplogrupo en la base de datos AmtDB
I-374	(16105-16280)	16162G 16187T	H1a+16187T	4/309
II-374	(8-78; 85-350; 16277-16400)	239C 263G 3091C 315.1C 16362C	H6	1/309
I-393	(51-390; 16150-16400)	73G 263G 315.1C 16311C 16319A	R1+16319A	0/309
II-393	(16105-16240)	16162G 16187T	H1a+16187T	4/309
I-392	(155-390; 16277-16400)	239C 263G 309.1C 309.2C 315.1C 16362C	H6	1/309
II-392	(16105-16400)	16304C 16311C	H5+16311C	7/309
370	(150-390; 16105-16400)	263G 315.1C 16304C	H5	7/309
391	(192-390; 16260-16400)	263G 315.1C 16270T 16311C 16362C	U5a2e	6/309
94	(16290-16400)	16304C 16362C	R	1/309
411	----	Sin resultado	---	---
373	(16105-16280)	16172C	Indeterminado	---
381	(16230-16400)	CRS	Indeterminado	---
395	(16105-16400)	16172C 16304C 16362C	H6+ 16304C	1/309
280	----	Sin resultado	---	---
254	(8-190; 16105-16280)	CRS	H	85/309

Resultados y análisis genéticos no publicados

- 1. Procesos experimentales en el laboratorio**
- 2. Análisis bioinformático y estadístico global**

Se presenta a continuación la metodología común empleada, así como, los análisis bioinformáticos y estadísticos globales realizados en la presente tesis.

1. Procesos experimentales en el laboratorio

La metodología común empleada para la obtención de los resultados no publicados se describe en detalle en el artículo “Paleogenetic evidence of a Pyrenean Neolithic Family: kinship, physical appearance and biogeography multidisciplinary analysis”, incluido en la presente tesis (**artículo 5**).

2. Análisis bioinformático y estadístico global

Análisis estadístico de las variables biológicas analizadas

2.1 El análisis estadístico “ χ^2 de Pearson” y “Prueba exacta de Fisher” fue realizado para la evaluación de los resultados genéticos obtenidos según el tipo de muestra biológica analizada (objetivo 2 de la presente tesis doctoral). Se utilizó el software *SPSS Statistics v22* (IBM), considerando como valor de referencia $p \leq 0,05$.

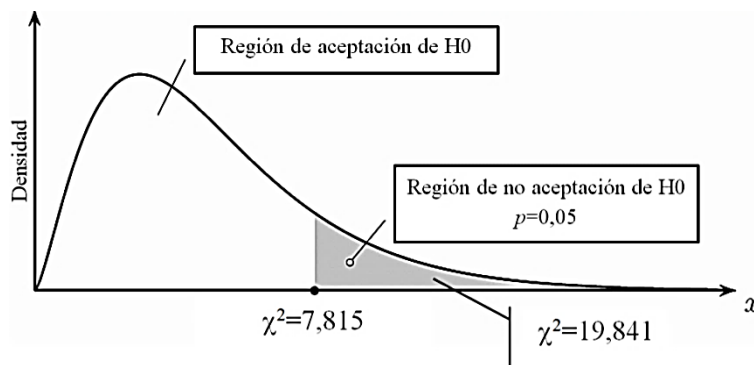
Las variables biológicas analizadas consistieron en “hueso” (N=25), “diente” (N=154), así como, “sangre” (N=49) y “saliva” (N=280), para llevar a cabo el estudio de parentesco publicado en el **artículo 8** y la base de datos de X-InDels (**artículo 3**). Para este último análisis no se han tenido en cuenta los 180 extractos de DNA solicitados al *Banco Nacional de ADN* (Salamanca, España), ya que no se ha recibido la información del tipo de muestra biológica al que pertenecía cada extracto. En la **tabla 15** se presentan los resultados obtenidos considerando los cuatro tipos de muestras biológicas (hueso, diente, saliva y sangre), considerando que el “éxito” del análisis se midió comparando los casos con resultados consenso (“Si”), frente a los casos sin resultados (“No”). Como hipótesis iniciales se consideraron H_0 = “el éxito del análisis genético no depende de la muestra biológica analizada” y H_1 = “el éxito del análisis genético depende de la muestra biológica analizada”.

Teniendo en consideración el valor de $p \leq 0,05$ y de $gl=3$, se ha consultado una tabla de distribución de χ^2 ([https://www.mun.ca/biology/scart/4250 Chi-square critical values.html](https://www.mun.ca/biology/scart/4250%20Chi-square%20critical%20values.html)), obteniéndose como valor de referencia de $\chi^2=7,815$. Considerando el valor de χ^2 obtenido en el análisis de las variables biológicas, $\chi^2= 19,841$, se aceptará la hipótesis H_1 , o sea, el éxito en la obtención de un perfil genético depende de la muestra biológica en cuestión (**figura 20**).

Tabla 15. Resultados del análisis estadístico de las variables biológicas analizadas (hueso, diente, saliva y sangre), calculándose el “éxito”, χ^2 de Pearson y Prueba exacta de Fisher. g.l. = grados de libertad.

	Grupos	Si	No	Total	% Éxito	χ^2 de Pearson	Prueba exacta de Fisher
Muestras biológicas	Hueso	22	3	25	88,000%	$\chi^2 = 19,841$ $p < 0,0001$ gl = 3	Valor = 20,499 $p < 0,0001$ gl = 3
	Diente	132	22	154	85,714%		
	Sangre	40	9	49	81,633%		
	Saliva	269	11	280	96,071%		
		463	45	508	91,122%		

Figura 20. Gráfico de la distribución χ^2 de Pearson, gl=3 y $p=0,05$. Considerando el valor de χ^2 obtenido ($\chi^2 = 19,841$) se descarta la hipótesis H0, aceptando H1. (Imagen de elaboración propia).



Análisis biogeográfico

Para realizar un análisis biogeográfico global de los yacimientos arqueológicos estudiados en la presente tesis, se han efectuado dos estudios - sincrónico y diacrónico, tal como se describe a continuación. En ambos casos, se ha analizado solo la región mitocondrial HV1, aunque en la mayoría de los individuos de la presente tesis se disponía de HV2. Tal se debe a la indisponibilidad de secuencias de HV2 en algunas de las secuencias previamente publicadas, por lo que se optó por analizar en todas el mismo intervalo de mtDNA.

3.1 Estudio sincrónico - los grupos considerados para este análisis contemplan tanto los yacimientos estudiados en la presente tesis, como estudios previamente publicados, correspondientes al mismo periodo histórico en cuestión, presentes en la base de datos AmtDB.

En todos ellos se analizaron solamente los grupos cuyo tamaño muestral era superior a N=4, por lo que no se han considerado, los yacimientos de La Feixa del Moro (**artículo 5**)

(N=3) (periodo Neolítico), El Llord (N=4) (periodo Neolítico) y Plana del Castell (N=3) (Periodo de las Edades del Cobre-Bronce). Otro criterio utilizado para la selección de individuos presentes en la referida base de datos consistió en las regiones geográficamente más próximas a las analizadas, así como la disponibilidad de secuencias de mtDNA en formato *FASTA* (extensión *.fa*).

3.2 Estudio diacrónico: las regiones aquí estudiadas señaladas en la **figura 12**, en concreto, Castilla la Mancha (blanco) y Cataluña (violeta), se corresponden con las actuales comunidades autónomas de donde han procedido las muestras estudiadas. En la **figura 12** se indica también qué yacimientos se han tenido en cuenta para el estudio diacrónico, indicándose entre paréntesis el número de individuos considerados en cada caso, así como, con un código de colores, a qué periodo histórico pertenecen (Neolítico: rosa; Cobre-Bronce: azul; Medieval: verde).

Se consideró también información poblacional previamente publicada, analizándose todos los individuos presentes en la base de datos de DNA antiguo (AmtDB) pertenecientes a cada una de las regiones consideradas, siempre que estuviera disponible su secuencia de mtDNA en formato *FASTA* (extensión *.fa*). Los individuos seleccionados de cada artículo, periodo histórico y respectiva referencia bibliográfica se encuentran en el material suplementario de la presente tesis.

Figura 21. Zonas geográficas consideradas en el estudio diacrónico, concretamente Cataluña (violeta) y Castilla la Mancha (blanco). Para cada región, se indica que yacimientos se han tenido en cuenta, el número de individuos considerados en cada caso, así como, con un código de colores a que periodo histórico pertenecen (Neolítico: rosa; Cobre-Bronce: azul; Medieval: verde). (*Imagen de elaboración propia*).



En ambos estudios se investigó la posible variabilidad a nivel mitocondrial, intra e inter yacimientos arqueológicos, a través del análisis de varianza molecular (AMOVA), así como, la existencia de posibles diferencias poblacionales a través del análisis de F_{ST} .

Análisis AMOVA

Todos los análisis de varianza molecular realizados han tenido en cuenta los tres métodos de análisis a) Tamura y Nei (1993), b) Tajima y Nei (1984); y c) Kimura 2P (1980), para verificar si existían diferencias significativas entre los tres métodos de análisis. En este caso, como no se tenía una idea *a priori* de las frecuencias de las transiciones de las secuencias aquí analizadas, principalmente por tratarse en muchos casos de DNA muy antiguo, se ha procedido al análisis de todas las AMOVA siempre con los tres métodos, realizando 10000 permutaciones en cada análisis.

Estudio de diferencias poblacionales, F_{ST} .

Este análisis se ha realizado a través del estudio de uno de los estadísticos F de Wright (1951), en concreto, a través del índice de fijación F_{ST} . Aunque los valores de este índice son flexibles, la diferenciación genética sería reducida para un valor de F_{ST} dentro del intervalo [0-0,05], moderada entre [0,05-0,15], elevada entre [0,15-0,25] y extremadamente elevada a partir de un valor superior a 0,25 (Pasternak, 2005).

Se ha estudiado este parámetro utilizando el software *Arlequin v3.5* (Excofier, 2010), utilizando la aproximación de Slatkin al valor de F_{ST} , con 10100 permutaciones por análisis, con un valor de significancia de $p \leq 0,05$. Se ha elegido para este análisis el método Tamura & Nei, ya que mediante los análisis previos de AMOVA se observó que no existían diferencias significativas entre los tres métodos, así como, por ser el método que no atribuye un valor concreto a las frecuencias de las posibles transiciones.

Finalmente, la matriz obtenida para cada análisis F_{ST} fue representada a través de la técnica estadística multivariante conocida como **Multidimensional scaling** (MDS, Escalamiento MultiDimensional), usualmente utilizada para investigar la existencia de subestructuras poblacionales (Graffelman, et al., 2018). Si los individuos no provienen de una única población homogénea, sino que provienen de dos o más con distintas frecuencias alélicas, entonces el gráfico MDS representará a esos individuos en distintas poblaciones.

Con la finalidad de visualizar la matriz de diferencias genéticas F_{ST} en dos o tres dimensiones (2D y 3D, respectivamente), el software SPSS permite realizar el escalamiento de acuerdo con la herramienta matemática PROXCAL (*PROXimity SCALing*). Este análisis realiza una escala multidimensional, intentando encontrar la estructura existente en un conjunto de medidas de proximidad.

La representación gráfica en el plano fue realizada utilizando el software *SPSS Statistics* v22 (IBM), teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- ❖ *Goodness-of-Fit*, o *bondad de ajuste*. De acuerdo con Kruskal (1964) éste parámetro expresa cómo representa el gráfico el conjunto de datos genéticos, y, aunque depende del número de dimensiones elegidas, está directamente relacionado con la medida “*stress*” o “esfuerzo” tal como se explica a continuación (Pereira, 2004):

Valor de <i>stress</i> obtenido	<i>Goodness-of-Fit</i>
0,200 →	Malo
0,100 →	Regular
0,050 →	Bueno
0,025 →	Excelente
0,000 →	Perfecto

- ❖ “*D.A.F*” (“*Dispersion Accounted For*”, o “*Dispersión explicada por*”) y el “Coeficiente de congruencia de Tucker”: ambos valores indican la calidad de la representación de los datos en un plano 2D o 3D, siendo el mejor valor el que más se acerque a la unidad (1 o 100%).

Análisis biogeográfico - resultados

1. ESTUDIO SINCRÓNICO

Periodo neolítico

Considerando el análisis de AMOVA (**tabla 16**), se observa que el porcentaje más elevado de varianza molecular se encuentra dentro de las propias comunidades neolíticas (aproximadamente 68,5%), aunque ese porcentaje no es tan elevado como el observado en los restantes períodos analizados. Este resultado ofrece una imagen de poblaciones muy homogéneas, aunque en realidad pertenecían a distintos yacimientos arqueológicos.

Observando tanto los resultados de diferenciación genética (**tablas 17 y 18**) como de escalamiento multidimensional (**figura 22**), Can Gambús-1 manifiesta una mayor proximidad a las poblaciones de Escocia e Inglaterra y un acentuado distanciamiento relativamente a Alemania.

Periodo de las Edades del Cobre y Bronce

Se verifica que el porcentaje de varianza molecular más acentuado se encuentra dentro de las distintas poblaciones (aprox.97%), para un valor de $F_{ST} = 0,02602$ y $p = 0,00441 \pm 0,00067$ (**tabla 16**).

No obstante, los resultados de diferenciación genética (**tablas 19 y 20**) obtenidos concretamente para el yacimiento de Minferri no han revelado valores significativos relativamente a las demás poblaciones. Observando el escalonamiento multidimensional (**figura 23**) se observa que el yacimiento de Minferri se encuentra muy próximo de las demás poblaciones de Europa Occidental, en concreto, otras poblaciones de España, Portugal, Escocia e Inglaterra.

Periodo medieval

Se observa que el mayor porcentaje de varianza molecular se encuentra dentro de las poblaciones (aprox.93%), para un valor significativo de $F_{ST} = 0,06647$ y $p = 0,00010 \pm 0,00010$ (**tabla 16**).

Considerando los resultados de F_{ST} (**tablas 21 y 22**), para los yacimientos de Uceda y Galligants, existen diferencias elevadas y significativas relativamente a las demás poblaciones analizadas [$0,11 < F_{ST} < 0,21$]. Estas diferencias son también visibles en la representación gráfica de MDS (**figura 24**), donde se observan ambas poblaciones aisladas en los extremos del gráfico. Analizando el sector medieval de Can Gambús-1, se observan diferencias moderadas (aproximadamente $F_{ST} = 0,09$) y significativas con relación a las demás poblaciones consideradas, también reflejadas en el gráfico de escalonamiento multidimensional.

Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

Tabla 16. Análisis de la varianza molecular (AMOVA), comparando los yacimientos neolíticos, de las Edades del Cobre –Bronce y medievales analizados en la presente tesis, con la información previamente publicada de otros yacimientos del mismo periodo histórico. Las poblaciones aquí comparadas pueden ser consultadas en el Material Suplementario, sección “Material y Métodos”.

Periodo	Método	Tamura & Nei				Tajima & Nei				Kimura 2P			
		Fuente de variación	d.f	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	% de variación	d.f	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	% de variación	d.f	Suma de cuadrados	Varianza de componentes
Neolítico	Entre Poblaciones	3	44,080	0,75509 Va	31,28	3	44,149	0,75716 Va	31,51	3	43,772	0,75031 Va	31,41
	Dentro de las Poblaciones	71	117,777	1,65883 Vb	68,72	71	116,861	1,64593 Vb	68,49	71	116,342	1,63863 Vb	68,59
	Total	74	161,857	2,41392	---	74	161,009	2,40309	---	74	160,115	2,38894	
	Índice de Fijación F_{ST} asociado al análisis	0,31281; $p = 0,00000 \pm 0,00000$				0,31508; $p = 0,00000 \pm 0,00000$				0,31408; $p = 0,00000 \pm 0,00000$			
Cobre - Bronce	Entre Poblaciones	7	21,635	0,05452 Va	2,62	7	21,398	0,05364 Va	2,60	7	20,884	0,05145 Va	2,54
	Dentro de las Poblaciones	175	354,208	2,02404 Vb	97,38	175	351,311	2,00749 Vb	97,40	175	345,936	1,97678 Vb	97,46
	Total	182	375,842	2,07856	---	182	372,709	2,06113	---	182	366,820	2,02823	---
	Índice de Fijación F_{ST} asociado al análisis	0,02623; $p=0,00525 \pm 0,00080$				0,02602; $p=0,00441 \pm 0,00067$				0,02537; $p=0,00426 \pm 0,00066$			
Medieval	Entre Poblaciones	5	19,208	0,13910 Va	6,66	5	19,037	0,13766 Va	6,65	5	19,037	0,13766 Va	6,65
	Dentro de las Poblaciones	78	151,938	1,94792 Vb	93,34	78	150,792	1,93324 Vb	93,35	78	150,792	1,93324 Vb	93,35
	Total	83	171,146	2,08702	---	83	169,829	2,07089	---	83	169,829	2,07089	---
	Índice de Fijación F_{ST} asociado al análisis	0,06665; $p=0,00000 \pm 0,00000$				0,06647; $p=0,00010 \pm 0,00010$				0,06647; $p=0,00010 \pm 0,00010$			

Diferenciación genética F_{ST}

Tabla 17. Valores de diferenciación genética F_{ST} obtenidos, comparando el yacimiento de Can Gambús-1, con la información previamente publicada de otros yacimientos neolíticos. Las poblaciones aquí comparadas pueden ser consultadas en el Material Suplementario, sección “Material y Métodos”. Los valores negativos se interpretan como extremadamente bajos, muy próximos del valor 0.

	Can Gambús- 1 (España)	Alemania	Escocia	Inglaterra
Can Gambús- 1 (España)	0,00000			
Alemania	0,60994	0,00000		
Escocia	0,08256	0,53370	0,00000	
Inglaterra	0,14932	0,51763	-0,02505	0,00000

Tabla 18. Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} en los yacimientos del periodo Neolítico. A negrita se indican los valores considerados significativos para una un valor de $p=0,05$.

	Can Gambús- 1 (España)	Alemania	Escocia	Inglaterra
Can Gambús- 1 (España)	*			
Alemania	0,00000±0,0000	*		
Escocia	0,00137±0,0004	0,00000±0,0000	*	
Inglaterra	0,00000±0,0001	0,00000±0,0000	0,89815±0,0032	*

Tabla 19. Valores de diferenciación genética F_{ST} , obtenidos tras comparar el yacimiento de Minferri, con la información previamente publicada de otros yacimientos de las Edades del Cobre-Bronce. Las poblaciones aquí comparadas pueden ser consultadas en el Material Suplementario, sección “Material y Métodos”. Los valores negativos se interpretan como extremadamente bajos, muy próximos del valor 0.

	OBKR Alemania	HUGO Alemania	Minferri (España)	Escocia	Portugal	España	Hungría	Inglaterra
OBKR Alemania	0,00000							
HUGO Alemania	0,12414	0,00000						
Minferri (España)	-0,01383	0,06711	0,00000					
Escocia	0,03174	0,04664	-0,00832	0,00000				
Portugal	-0,02555	-0,05343	0,00171	-0,00388	0,00000			
España	0,00574	0,06501	-0,00717	0,01888	-0,05541	0,00000		
Hungría	-0,00297	0,17699	0,11230	0,08984	-0,01564	0,02999	0,00000	
Inglaterra	0,04288	0,06499	-0,02229	-0,00597	0,01106	0,02127	0,10396	0,00000

Tabla 20. Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} en los yacimientos de las Edades del Cobre y Bronce. En negrita se indican los valores considerados significativos para un valor de $p=0,05$.

	OBKR Alemania	HUGO Alemania	Minferri (España)	Escocia	Portugal	España	Hungría	Inglaterra
OBKR Alemania	*							
HUGO Alemania	0,00304±0,0006	*						
Minferri (España)	0,57886±0,0048	0,10901±0,0027	*					
Escocia	0,08411±0,0023	0,11803±0,0030	0,49868±0,0048	*				
Portugal	0,60308±0,0049	0,76316±0,0042	0,44574±0,0052	0,44760±0,0050	*			
España	0,27566±0,0048	0,03049±0,0018	0,51073±0,0058	0,14626±0,0040	0,83953±0,0036	*		
Hungría	0,40369±0,0048	0,02745±0,0017	0,08372±0,0027	0,05803±0,0022	0,45545±0,0052	0,20743±0,0042	*	
Inglaterra	0,00480±0,0008	0,02108±0,0015	0,79061±0,0034	0,57249±0,0052	0,32497±0,0046	0,02127±0,0015	0,01274±0,0010	*

Tabla 21. Valores de diferenciación genética F_{ST} , obtenidos tras comparar los yacimientos medievales analizados en la presente tesis, con la información previamente publicada de otros yacimientos medievales. Las poblaciones aquí comparadas pueden ser consultadas en el Material Suplementario, sección “Material y Métodos”. Los valores negativos se interpretan como extremadamente bajos, muy próximos del valor 0.

	Alemania	Uceda (España)	Galligants (España)	Can Gambús – 1 (España)	CI (Italia)	LICOL (Italia)
Alemania	0,00000					
Uceda (España)	0,05715	0,00000				
Galligants (España)	0,06154	0,20687	0,00000			
Can Gambús – 1 (España)	0,05127	0,18768	0,17647	0,00000		
CI (Italia)	-0,02223	0,12610	0,11013	0,09310	0,00000	
LICOL (Italia)	0,01461	0,12851	0,12441	0,09231	-0,04312	0,00000

Tabla 22. Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} en los yacimientos medievales. En negrita se indican los valores considerados significativos para un valor de $p=0,05$.

	Alemania	Uceda (España)	Galligants (España)	Can Gambús – 1 (España)	CI (Italia)	LICOL (Italia)
Alemania	*					
Uceda (España)	0,05480±0,0025	*				
Galligants (España)	0,02804±0,0015	0,00069±0,0003	*			
Can Gambús – 1 (España)	0,01519±0,0011	0,00029±0,0002	0,00196±0,0004	*		
CI (Italia)	0,81365±0,0036	0,00745±0,0008	0,01020±0,0011	0,00127±0,0003	*	
LICOL (Italia)	0,21037±0,0043	0,00588±0,0008	0,00627±0,0008	0,00569±0,0007	0,97687±0,0015	*

Escalamiento MultiDimensional, MDS

Figura 22. Representación en el espacio del análisis MDS, de los yacimientos del periodo Neolítico, a través del método PROXCAL.

EspCANGAMB = yacimiento de Can Gambús-1.

Valor de stress = 0,00202; D.A.F = 0,99798; Coeficiente de congruencia de Tucker=0,99899

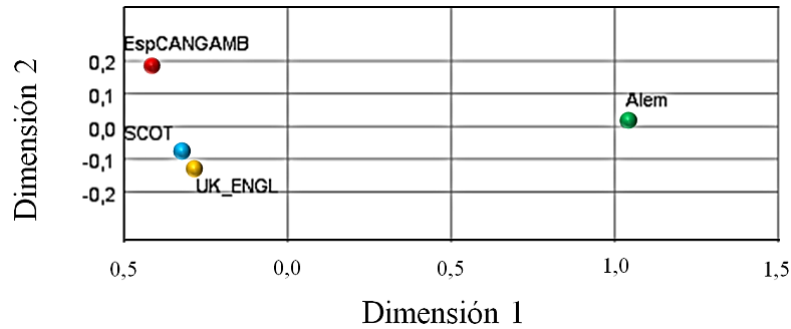


Figura 23. Representación en el espacio del análisis MDS, de los yacimientos de las Edades del Cobre y Bronce, a través del método PROXCAL.

EspMINF = yacimiento de Minferri.

Valor de stress = 0,19630; D.A.F = 0,80370; Coeficiente de congruencia de Tucker=0,89649

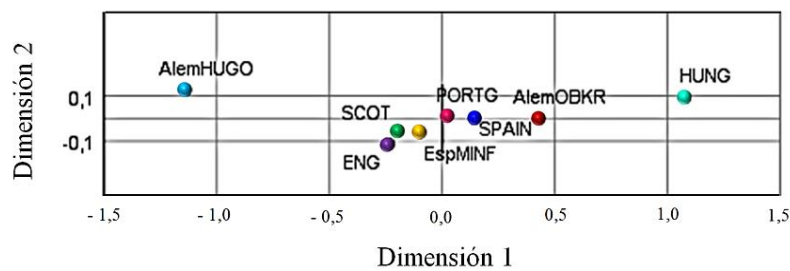
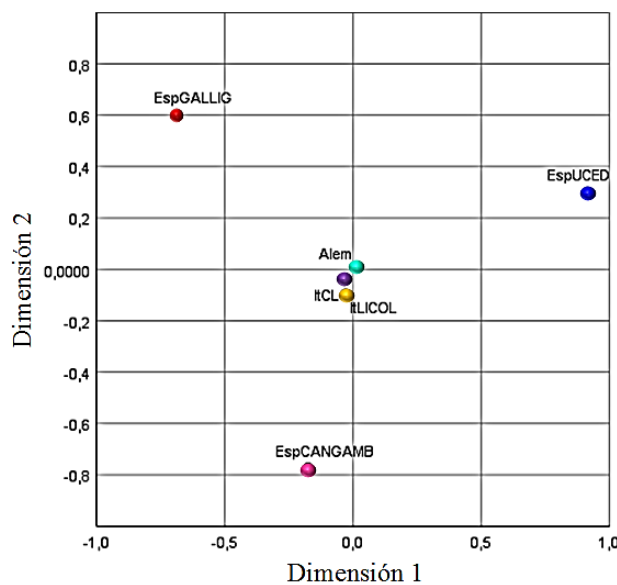


Figura 24. Representación en el espacio del análisis MDS, de los yacimientos del periodo Medieval, a través del método PROXCAL.

EspGALLIG = yacimiento de Galligants; **EspUCED** = yacimiento de Uceda; **EspCANGAMB** = yacimiento de Can Gambús-1 (medieval).

Valor de stress = 0,03898; D.A.F = 0,96102; Coeficiente de congruencia de Tucker=0,98032



2. ESTUDIO DIACRÓNICO

El estudio diacrónico fue realizado considerando dos regiones de España, Castilla la Mancha-La Mancha y Cataluña, intentando entender la evolución de la variabilidad genética mitocondrial a lo largo de los distintos periodos históricos. Así, para la Comunidad de Castilla-La Mancha se han considerado las Edades de Cobre-Bronce, Medieval y actual; para Cataluña, las del Neolítico, Cobre-Bronce, Medieval y actual.

Observando los resultados obtenidos para AMOVA (**tabla 23**), el mayor porcentaje de variabilidad genética se observa dentro de cada periodo histórico considerando – aproximadamente 88% para Castilla-La Mancha y 95% para Cataluña.

Considerando los resultados significativos obtenidos para la diferenciación genética F_{ST} (**tablas 24-27**) en Castilla-La Mancha, se verifican diferencias de moderadas a elevadas entre las edades del Cobre y Bronce y Medieval cuando se comparó con la población actual. En lo que respecta a Cataluña, los valores de diferenciación genética indican niveles reducidos de diferencias genéticas desde el periodo Neolítico hasta la actualidad, asociados en prácticamente todos los casos a valores significativos de p ($p < 0,05$).

Observando, finalmente, los escalamientos multidimensionales obtenidos (**figuras 25 y 26**), no se observan grupos definidos, sino una dispersión semejante entre las dos regiones estudiadas. En cuanto a la región de Castilla-La Mancha, se verifica que la población actual se distancia más de las restantes, estando la población medieval mucho más próxima de las de las Edades del Cobre y Bronce. Finalmente, para la región de Cataluña, En la representación MDS de Cataluña, aunque las diferencias genéticas son reducidas, existen, observándose una mayor proximidad entre las Edades del Cobre y Bronce y el periodo Medieval, y un mayor distanciamiento tanto del periodo Neolítico como respecto de las poblaciones actuales.

Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

Tabla 23. Análisis de la varianza molecular (AMOVA), en las regiones de Castilla la Mancha y Cataluña., considerando los siguientes periodos históricos: Castilla la Mancha: a) Cobre-Bronce; b) Medieval; c) actual; Cataluña: a) Neolítico; b) Cobre-Bronce; c) Medieval; d) actual.

Región	Método	Tamura & Nei				Tajima & Nei				Kimura 2P			
		d.f	Suma de cuadrados	Varianza de componente	% de variació	d.f	Suma de cuadrados	Varianza de componente	% de variació	d.f	Suma de cuadrado	Varianza de componente	% de variació
Castilla la Mancha	Entre periodos	2	13,735	0,23307 Va	12,23	2	13,671	0,23209 Va	12,25	2	13,542	0,23021 Va	12,31
	Dentro de cada periodo	80	133,786	1,67233 Vb	87,77	80	132,981	1,66226 Vb	87,75	80	131,202	1,64003 Vb	87,69
	Total	82	147,521	1,90540	---	82	146,651	1,89435	---	82	144,744	1,87023	---
	Índice de Fijación F_{ST} asociado al análisis	0,12232, p = 0,00000+-0,00000				0,12252, p = 0,00000+-0,00000				0,12309, p = 0,00000+-0,00000			
	Entre periodos	3	10,337	0,07192 Va	4,63%	3	10,275	0,07143 Va	4,62%	3	10,242	0,07118 Va	4,62%
Cataluña	Dentro de cada periodo	112	165,968	1,48185 Vb	95,37%	112	165,151	1,47456 Vb	95,38%	112	164,679	1,47035 Vb	95,38%
	Total	115	176,304	1,55377	---	115	175,426	1,54599	---	115	174,921	1,54153	---
	Índice de Fijación F_{ST} asociado al análisis	0,04629, p = 0,00000+-0,00000				0,04620, p = 0,00010+-0,00000				0,04618, p = 0,00000+-0,00000			

Diferenciación genética F_{ST}

Tabla 24. Valores de diferenciación genética F_{ST} , comparando los yacimientos estudiados en la región de Castilla la Mancha.

Periodos	Cobre y Bronce	Medieval	Actual
Cobre y Bronce	0,00000		
Medieval	0,08481	0,00000	
Actual	0,11964	0,16507	0,00000

Tabla 25. Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} obtenidos comparando los yacimientos estudiados en la región de Castilla la Mancha.

En negrita se indican los valores considerados significativos para un valor de $p=0,05$ y 10000 permutaciones.

Periodos	Cobre y Bronce	Medieval	Actual
Cobre y Bronce	*		
Medieval	0,03029±0,0016	*	
Actual	0,00000±0,0000	0,00059±0,0002	*

Tabla 26. Valores de diferenciación genética F_{ST} , comparando los yacimientos estudiados en la región de Cataluña.

Periodos	Neolítico	Cobre y Bronce	Medieval	Actual
Neolítico	0,00000			
Cobre y Bronce	0,04014	0,00000		
Medieval	0,05800	0,00640	0,00000	
Actual	0,05348	0,03142	0,06635	0,00000

Tabla 27. Valores de significancia de p , asociados al análisis de F_{ST} obtenidos comparando los yacimientos estudiados en la región de Cataluña.

A negrita se indican los valores considerados significativos para un valor de $p=0,5$.

Periodos	Neolítico	Cobre y Bronce	Medieval	Actual
Neolítico	*			
Cobre y Bronce	0,02020±0,0014	*		
Medieval	0,00752±0,0008	0,29997±0,0048	*	
Actual	0,00020±0,0001	0,00782±0,0009	0,00000±0,0000	*

Escalamiento MultiDimensional, MDS

Figura 25. Representación en el espacio 2D del análisis MDS, de los estudiados en la región de Castilla la Mancha, a través del método PROXCAL.

CobBron = Cobre-Bronce; **Mediv** = Medieval.

Valor de stress = 0,00008; D.A.F = 0,99992; Coeficiente de congruencia de Tucker=0,99996

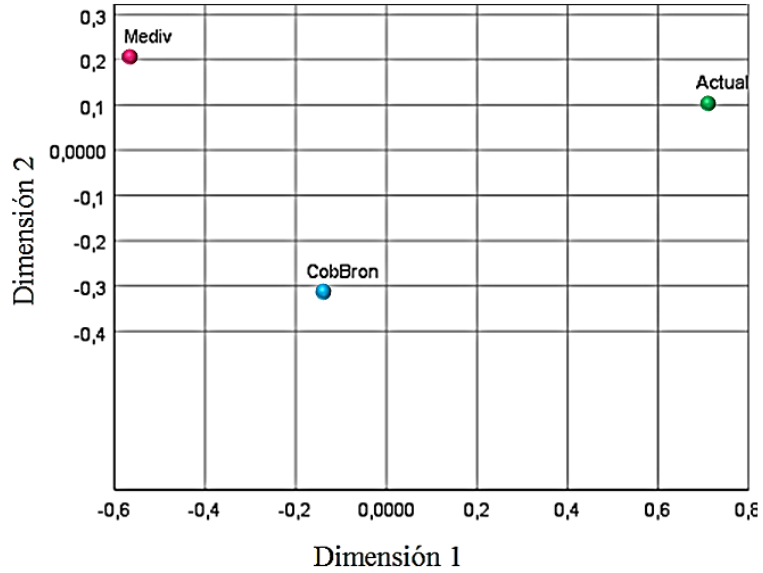
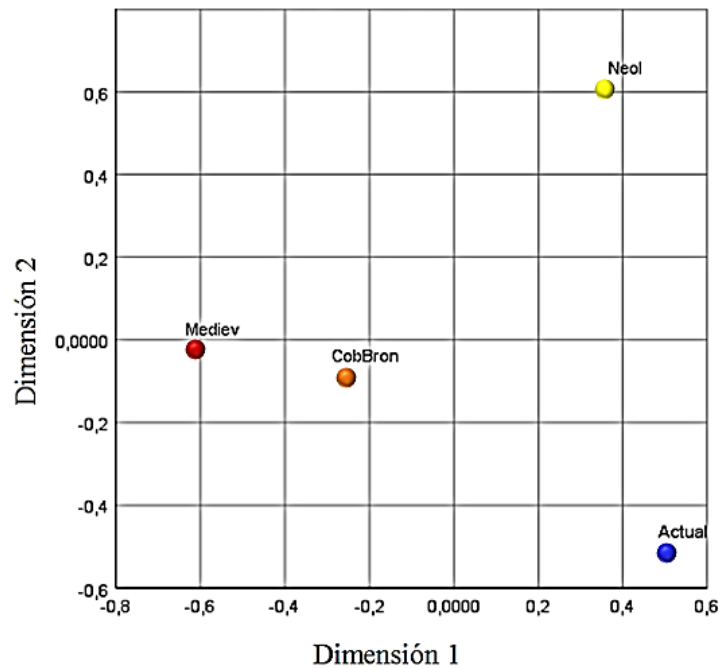


Figura 26. Representación en el espacio 2D del análisis MDS, de los yacimientos estudiados en la región de Cataluña, a través del método PROXCAL.

Neol = Neolítico; **CobBron** = Cobre-Bronce; **Mediev** = Medieval

Valor de stress = 0,02336; D.A.F = 0,97664; Coeficiente de congruencia de Tucker=0,98825



Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **D**iscusión

El objetivo principal de esta tesis doctoral es el estudio de relaciones de parentesco biológico, a través del análisis genético de muestras biológicas degradadas, de origen tanto arqueológico como antropológico y con aplicaciones forenses.

Para el desarrollo de los distintos objetivos propuestos antes descritos, se han estudiado individuos que vivieron en diferentes períodos cronológicos, así como en diversas regiones del actual territorio español.

El hecho de haber tenido acceso a individuos pertenecientes a diferentes períodos históricos ha permitido no solamente estudiar la problemática de las relaciones de parentesco, sino también poder evaluar el efecto de la “antigüedad” de la muestra en el resultado obtenido.

Bajo este principio, no siempre fue posible encontrar una gran cantidad de enterramientos múltiples pertenecientes a todos los periodos históricos. De los yacimientos excavados y propuestos al inicio del estudio, ni todos han proporcionados individuos bien conservados para proceder a su estudio genético, ni todas las muestras analizadas han proporcionado resultados válidos, ya sea por su antigüedad, o por su grado de conservación.

En este apartado se analizará cada uno de los objetivos específicos. Estos se han clasificado en: a) objetivos metodológicos, b) establecimiento de relaciones familiares, y c) genético-poblacional. Dentro de cada objetivo se amplían diferentes apartados, indicando el artículo al que se hace referencia.

1. OBJETIVOS METODOLÓGICOS.

Implementación y adaptación de distintas técnicas para el análisis de muestras biológicas.

Objetivo 1.

Adaptación de una técnica de extracción no destructiva para muestras óseas y dentales.

En el caso del análisis de muestras óseas o dentales, una de las problemáticas es que los tradicionales protocolos de extracción implican su destrucción (por ejemplo, Marshall et al., 2014; Rothe et al., 2016; Siriboonpiputtana et al., 2018; Phua et al., 2019; Kontopoulos et al., 2019, Emmons et al., 2020). En este caso, uno de los objetivos fue la adaptación y optimización del protocolo de extracción implementado en el laboratorio (Rohland et al., 2007, 2009; Palomo

– Díez, 2015), permitiendo la recuperación física de la muestra ósea o dental, así como una completa extracción de DNA. Para llevar a cabo este objetivo, el DNA de las muestras de los distintos yacimientos analizados (**artículos 4-7**) ha sido obtenido siempre por duplicado: con la técnica tradicional (Rohland et al., 2007, 2009; Palomo – Díez, 2015), y con la técnica de extracción no destructiva (**artículo 1**). El objetivo de la doble extracción, aparte de cumplir uno de los criterios de autenticidad (Fernández, 2005), permite comparar ambas técnicas y evaluar los resultados obtenidos con la técnica no destructiva que se buscaba adaptar. La finalidad era saber si se obtendría el mismo resultado a partir de dos muestras de un mismo individuo, sea mediante la técnica destructiva y de la no destructiva, valorando si una de ellas producía más perfiles parciales (menos efectiva, por lo tanto). Por último, se pretendió también verificar la calidad de los perfiles obtenidos, medida en RFUs en el caso del análisis de fragmentos (InDels, STRs) y en el indicador de calidad del software Mutation Surveyor® v.4.0.9 (Softgenetics®), en el caso de secuencias de mtDNA (consultar la metodología empleada en el **artículo 5**).

Los resultados preliminares publicados en el **artículo 1**, demuestran, por primera vez, los cambios efectuados en la técnica de extracción de DNA no destructiva. En primer lugar, después de la limpieza y radiación con UV, la muestra deja de ser triturada, pasándose directamente a la extracción de DNA. Otra modificación importante, la incubación de la muestra durante 48 horas, permite al buffer de extracción tener un mayor contacto con la muestra. En este trabajo, tanto las concentraciones como las temperaturas y restantes tiempos de incubación, no habían sido todavía objeto de modificación. No se observaron diferencias a nivel de resultados entre las dos extracciones a nivel de perfil genético obtenido. Por otro lado, en este artículo se documentan también los cambios visuales que sufren las muestras antes y después del proceso de extracción de DNA, siendo, por lo general, el cambio más significativo la pérdida de volumen y de color.

Tras la publicación de este artículo, distintas pruebas han sido realizadas para intentar mejorar la técnica. Se ha investigado la contribución del EDTA en la extracción, cambiando tanto la concentración, como su volumen en el buffer de extracción. Se ha verificado que un aumento significativo de la concentración de EDTA en el *buffer* de extracción generaba una mayor concentración y calidad del DNA, si bien no era posible recuperar la muestra, quedándose prácticamente irreconocible o destruida al final del proceso. La temperatura durante la incubación de 48 horas fue también analizada, testándose tres temperaturas distintas (40°C, 45°C y 56 °C), no habiéndose observado cambios significativos en los resultados. Por tanto, la concentración de EDTA y la temperatura se han mantenido iguales al protocolo original (Rohland et al., 2007, 2009; Palomo – Díez, 2015; **artículo 1**). Los distintos cambios que han permitido la mejora de la técnica, optando por ésta como único método de extracción de DNA en el laboratorio. En un futuro próximo publicaremos todos los resultados obtenidos hasta la fecha (**artículos 4-9**; Arroyo-Pardo et al., 2019; Palomo – Díez et al., 2019a, b).

No obstante, este nuevo método de extracción presenta también desventajas a nivel metodológico. Por un lado, se incrementa el tiempo necesario para la extracción, pasando de tres a cuatro días. Por otro, las muestras deberán ser valoradas cuidadosamente, principalmente en aquellos casos en los que no sean abundantes. Ante una posible contaminación o pérdida del extracto, no será posible recurrir nuevamente a ese mismo hueso o diente. Indudablemente, esto es un inconveniente en casos de muestras únicas o de valor incalculable.

Objetivo 2

Evaluación de los resultados genéticos obtenidos de acuerdo con el tipo de muestra biológica analizada

Teniendo en cuenta la diversidad de muestras analizadas, este objetivo tenía como función evaluar si la obtención de los resultados sería o no independiente de las características de la muestra.

Los análisis estadísticos realizados (**tabla 15**, sección “Resultados no publicados, análisis estadístico”) revelan que existen diferencias significativas entre las distintas muestras analizadas, aunque el porcentaje de éxito entre los cuatro grupos es semejante. Aunque uno de los pasos fundamentales del análisis – la extracción de DNA, siempre es específico del tipo de muestra en cuestión, se observa que el porcentaje de éxito depende del tipo de muestra biológica que se analiza.

Con respecto a las muestras de sangre y saliva, analizadas en los **artículos 3 y 8**, el porcentaje de éxito de la saliva frente a la de la sangre es notablemente superior (% éxito saliva = 96,071%; % éxito sangre=81,633%). Esta diferencia puede deberse a la presencia de un importante inhibidor mencionado en la introducción de la presente tesis doctoral (ver “*Inhibición del DNA*”), la hemoglobina, ya que en diversos procesos de extracción, al no ser eliminada de forma eficaz, actúa como un inhibidor impidiendo la obtención de un perfil genético completo.

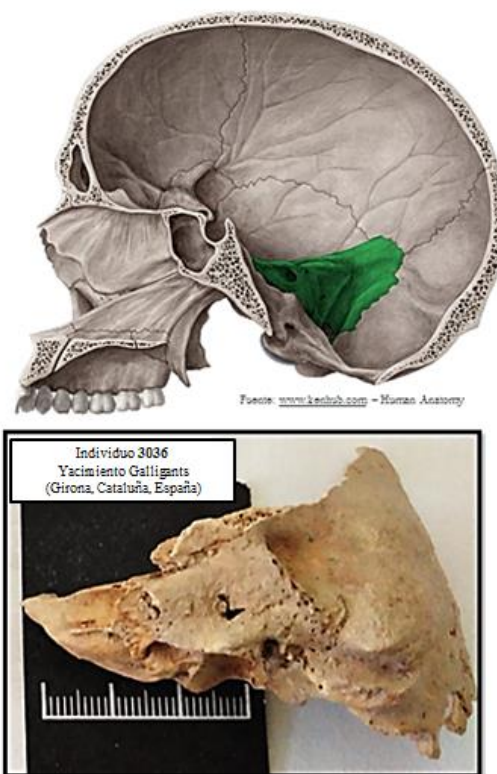
Comparando los resultados obtenidos para las muestras óseas y dentales, se verifica que el porcentaje de éxito es semejante (% éxito huesos = 88,000%; % éxito dientes=85,714%). Durante varios años se consideró la pieza dental, sin fisuras o caries, como la mejor muestra para el análisis de DNA en muestras degradadas y/o antiguas (por ejemplo, Adler et al., 2011; Higgins et al., 2013; Palomo-Díez, 2015), atribuyéndose al esmalte la capacidad de mantener una mayor integridad del diente y, en consecuencia, de su material genético. Sin embargo, estudios posteriores, por ejemplo de Hansen y colaboradores, en 2017, compararon la eficiencia de piezas dentales y huesos, en especial, enfocando el análisis en un hueso en concreto – la porción

petrosa, o *Pars petrosa* (**figura 27**) del hueso temporal. Concluyen que ambas piezas permiten la obtención de resultados muy buenos y fiables, aunque, en general, la porción petrosa del hueso

temporal proporcionaba una eficiencia superior. A la luz de tales estudios, para seguir desarrollando los análisis genéticos en la presente tesis, se solicitó a los equipos de arqueología y antropología, en primer lugar, una parte de la porción petrosa, y solo en caso de no ser posible, el envío de piezas dentales, sin fisuras o caries. No obstante, en ocasiones no fue posible recibir ese tipo de muestras, ya sea porque no existían o porque suponía la parcial destrucción del cráneo. Siguiendo en esta línea, Pilli y colaboradores en 2018, descartan por completo el análisis de dientes, indicando que la mejor muestra es la porción petrosa. A semejanza de Pilli y colaboradores (2018), González y colaboradores (2020) indican la

porción petrosa como el único hueso a utilizar en casos forenses, en detrimento de los dientes, indicando también que se trata de la mejor muestra para estudios de secuenciación masiva. Como se ha mencionado antes, los resultados obtenidos con ambas muestras presentan un porcentaje semejante de éxito. Por un lado, la porción petrosa es un tipo de hueso bastante compacto situado en una zona que, en principio, no se vería afectada por la actividad física del individuo (**figura 27**), por lo que no se deberá observar un desgaste óseo significativo asociado con la edad o el sexo de individuo. No obstante, su análisis conlleva siempre una destrucción total o parcial del cráneo, lo que puede dificultar su obtención, principalmente las que estén depositadas en museos, o asociadas a casos forenses. Por otro lado, otro punto negativo del análisis de la porción petrosa es que el rendimiento está directamente relacionado con el proceso de extracción del hueso. Si la fractura y/o corte del hueso no se realiza en condiciones de esterilidad absoluta, la porción expuesta puede verse comprometida debido a posibles contaminaciones con DNA presente en el ambiente, ya que requiere la utilización de varias herramientas para realizar la separación del hueso. Por este motivo, siempre que sea posible, se recomienda el envío de todo el hueso temporal al laboratorio de genética adaptado al análisis de

Figura 27. Localización de la porción petrosa (color verde), en el hueso temporal y ejemplo de una muestra de porción petrosa, perteneciente al individuo 3036 del yacimiento de Galligants (Girona, Cataluña, España).



muestras críticas, para que ahí se proceda al corte de la porción petrosa en condiciones de esterilidad controladas.

Finalmente, la obtención de resultados a partir de muestras óseas no parece estar directamente relacionada con su antigüedad, pero sí con la forma en que el material genético fue conservado, tal como se discutirá más adelante en el Objetivo 4.

Asimismo, también se han analizado otro tipo de huesos. En el **artículo 8**, una falange proximal y dos falanges medias de un individuo del sexo masculino, fallecido en el año de 1936 (**figuras Material Suplementario (Mat.Sup.) 1 y 2**). Tal como se discute en el artículo, la deficiente preservación del material genético, posiblemente debido a todo el proceso por el que pasó el cadáver hasta su deposición final en el cementerio, generó distintos resultados con cada nueva amplificación del material genético. Por otro lado, en el **artículo 5** (La Feixa del Moro) se estudió una clavícula y una costilla (**figuras Mat.Sup. 3 y 4**), y en el **artículo 5** (yacimiento de Uceda), una vértebra y una posible tibia (**figura Mat.Sup. 5**). Todos ellos demuestran, una vez más, que no es la antigüedad, sino más bien la correcta preservación del hueso lo que permite la obtención de perfiles genéticos, tanto de mtDNA como de nuDNA. En ambos casos, dada la ausencia de dientes, se optó por el análisis de los huesos más compactos disponibles. En las dos situaciones fue posible la obtención tanto de resultados mitocondriales como nucleares, incluyendo la determinación del sexo.

Con respecto al estudio de muestras dentales, al estar protegidos por el esmalte y a su vez por los huesos de la mandíbula (dientes inferiores) y maxilar (dientes superiores), suelen ser menos propensos a fracturas. Su desgaste tiende a estar relacionado con el tipo de alimentación, patologías, su uso a modo de instrumento y edad del individuo. Observando los casos donde no se han obtenido resultados, una vez más parece no estar relacionado con la antigüedad de la muestra, pero sí con la preservación de esta, ya que las muestras que no produjeron resultados se distribuyen por distintos periodos temporales, desde neolíticos (por ejemplo, estudio no publicado de Can Gambús-1), a las Edades del Cobre - Bronce (estudio no publicado de Minferri) o el periodo medieval (**artículo 7**, yacimiento de Uceda).

Finalmente, no se han observado diferencias a la hora de analizar individuos de distintas edades, obteniéndose resultados satisfactorios, tanto a nivel de nuDNA como de mtDNA, en todos los rangos de edad estudiados. Efectivamente, los casos del feto analizado en el **artículo 6** (yacimiento de Uceda), del bebé estudiado en el **artículo 5** (yacimiento de La Feixa del Moro), y de los infantiles estudiados en los yacimientos de Minferri y Galligants (estudios no publicados), permiten concluir que no es la edad del individuo a la hora de su muerte que condiciona la obtención de resultados genéticos. Una vez más, son las condiciones de conservación de la muestra que determinan el éxito del análisis genético.

Objetivo 3.

Adecuación del protocolo de extracción y amplificación para la resolución de casos de inhibición del material genético.

El análisis de muestras biológicas en avanzado estado de descomposición puede estar asociado al factor inhibición. Como se ha explicado en la introducción, pueden ser diversos los factores que impiden la extracción y la amplificación del material genético. En el **artículo 6** se presentan dos métodos de extracción (A y B) y tres métodos de amplificación (A, B y C), para poder determinar cuál es la combinación de métodos que mejor funcionaría en un caso específico de tres individuos de las Edades del Cobre-Bronce. Tras diversos intentos de amplificación sin resultado, se determinó la inhibición del material genético añadiendo a un pequeño volumen de extracto de 2 μ L de DNA control no inhibido. En este caso, tampoco se ha podido obtener resultados, por lo que se confirmó la presencia de inhibidores en las muestras. Aparte del contexto geológico donde se han encontrado los restos humanos enterrados en el suelo, en las proximidades del yacimiento existía una zona de deposición de residuos industriales. Por consiguiente, existía la posibilidad de encontrar tanto inhibidores típicos del suelo como químicos.

De todas las combinaciones entre los métodos propuestos, el mejor resultado fue el obtenido con el método de extracción B, incubando las muestras durante 48h con un *buffer* de extracción a pH = 8, asociado al método de amplificación C, donde se asocia la utilización de Proteína Sérica Bovina (BSA) a un incremento de MgCl₂. La asociación de ambos métodos permitió la obtención de resultados de mtDNA y el aumento de la calidad del material genético (Tabla 1, **artículo 6**).

De acuerdo con Garland (2010) y Alonso (2016) y respectivos colaboradores, la utilización de BSA reduce de forma sustancial la inhibición durante la amplificación del material genético, siempre que ésta fuera causada por componentes fenólicos presentes en el suelo. Por otro lado, el ajuste de la concentración de MgCl₂, en muestras posiblemente inhibidas, permite que éste se asocie a posibles inhibidores (por ejemplo, un exceso de calcio), permitiendo una mejor actuación de la enzima DNA polimerasa.

La mejora de calidad en los resultados obtenidos empleando ambos métodos, nos llevó a implementarlos en el laboratorio, siendo utilizados en todas las amplificaciones de mtDNA de muestras degradadas. Los resultados de mtDNA obtenidos en los **artículos 5, 8 y 9** han sido conseguidos mediante el uso de este nuevo protocolo, asociando los métodos de extracción B y de amplificación C.

Objetivo 4.

Evaluación de los resultados obtenidos en individuos de distintos períodos de tiempo: “DNA crítico *versus* DNA antiguo”.

Como previamente fue descrito, una muestra crítica se caracteriza por su material genético degradado y/o en escasa concentración, no siendo la “antigüedad” de la muestra un factor determinante para que ésta sea considerada crítica. En el presente trabajo se han estudiado individuos de distintos períodos históricos. Exceptuando el estudio de parentesco publicado en el **artículo 9**, en las demás investigaciones, independientemente del periodo histórico estudiado, fue posible en todos los casos la obtención de mtDNA, aunque en alguno, como por ejemplo en el **artículo 6** (yacimiento de Uceda) fue necesario introducir modificaciones en los protocolos de análisis. Como previamente se ha explicado en la introducción, el mtDNA se encuentra en la célula humana en concentraciones muy superiores a las del nuDNA, siendo muchas veces el único material genético disponible en muestras en avanzado estado de descomposición. En lo que concierne a resultados de nuDNA, de los 13 casos de parentesco investigado, no fue posible obtener resultados en cuatro de ellos - Can Gambús-1 (periodos neolítico y medieval), El Llord (neolítico) y Plana del Castell (Edades del Cobre-Bronce), no siendo por eso un problema directamente asociado a los individuos más antiguos aquí estudiados. En el **artículo 8** se discute la problemática relacionada con la antigüedad de las muestras *versus* la obtención de resultados. En ese estudio en concreto, se han analizado tres huesos del siglo XX, no siendo posible determinar si pertenecían a uno o más individuos, dado el elevado grado de degradación de las muestras. Aunque fueron necesarios cambios en la metodología de análisis para la obtención de los resultados de mtDNA, aun así, no fue posible incrementar la calidad mediana de las secuencias mitocondriales obtenidas. En los artículos **4, 5 o 6** aunque las muestras pertenecían a un periodo histórico anterior (periodos neolíticos y medieval), la calidad de las secuencias obtenidas ha sido incomparablemente superior a las obtenidas en el caso estudiado y publicado en el artículo 8 (siglo XX).

En definitiva, tratar siempre como sinónimos **muestras críticas** y **muestras antiguas** es un error, ya que en el primer caso la nomenclatura hace referencia al estado de conservación de la muestra y, en el segundo caso, a una temática concreta del estudio, vinculada a estudios arqueológicos. Sin embargo, aunque errónea, persiste en la literatura científica la idea de que “muestra antigua” y “muestra degradada” son sinónimos (por ejemplo, Hummel et al., 1999; Pruvost et al., 2005; Knapp et al., 2012), pudiendo ser observado en prácticamente todas las investigaciones de DNA antiguo la idea de la degradación como un factor derivado de la antigüedad, y no como una causa de la limitada preservación del material genético.

Objetivo 5.

Evaluación de la utilidad de marcadores de cromosoma X en la determinación de relaciones de parentesco biológico, donde por lo menos una de las muestras estudiada tiene una concentración de DNA baja.

Aunque en la actualidad el análisis de marcadores autosómicos sigue siendo la herramienta de elección para la determinación de parentescos biológicos, hay casos donde no es la más adecuada. Efectivamente, hay casos donde estos marcadores pierden utilidad al no permitir distinguir ciertas relaciones de parentesco entre sí (Hartman et al., 2011; Gomes et al., 2011; Gomes et al., 2012), caso, por ejemplo, de “abuela paterna – nieto” o “tía materna – sobrino”. No obstante, estudios anteriores (Gomes et al., 2011; Gomes et al., 2012) han demostrado que marcadores específicos del cromosoma X tienen una eficacia superior al de los estudios convencionales de autosómicos en la determinación de casos de parentesco concretos. Un problema actual es la reducida oferta de kits comerciales de marcadores de cromosoma X adaptados a muestras con baja concentración de DNA. Por este motivo, en la presente tesis se ha aplicado el estudio de Pereira y colaboradores (2012), utilizando un conjunto de 32 marcadores de cromosoma X de tipo InDel. Antes de la aplicación de estos polimorfismos fue necesario el desarrollo de una base de datos de frecuencias de la población española para un correcto cálculo probabilístico (**artículo 3**). La base de datos de polimorfismos X-InDel publicada, con 509 individuos, comprende tanto información alélica, como haplotípica, dependiendo del marcador en cuestión, cumpliendo las recomendaciones de la *International Society for Forensic Genetics* (Gusmão et al., 2017), de Butler (2014), y de Tilmár y colaboradores (2017), incluyendo la aprobación del estudio por un comité de ética, en este caso, del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico San Carlos, (código interno 17/424-E, de 8 de noviembre del 2017).

La utilización de estos polimorfismos nos ha permitido la resolución de un caso concreto de paternidad publicado en el **artículo 9**, así como, la confirmación del sexo de los individuos en el **artículo 5**.

En estudios con muestras más degradadas, han sido varios los casos donde no se obtuvieron resultados (por ejemplo, los no publicados de los yacimientos de Minferri o Galligants). Dada la aparente ineficiencia de estos marcadores en muestras muy degradadas, el motivo puede deberse a que el método publicado por Pereira y colaboradores (2012) no esté adaptado a muestras con tan baja concentración de DNA. Por ello, es recomendable, en un futuro, poner a punto la técnica de amplificación de estos marcadores, en especial en lo referente a la relación entre los volúmenes utilizados en la amplificación y el número de ciclos necesarios para la obtención de perfiles completos.

Finalmente, una dificultad añadida encontrada durante el estudio de estos polimorfismos fue la utilización del software FamLink X, v2.5. Por un lado, porque está pensado para la utilización de X-STRs y no de polimorfismos de tipo InDel, principalmente a la hora de introducir los marcadores en el *software*; y, por otro, porque la existencia de *allelic dropout* en prácticamente todos los casos llevó a que el programa no fuese capaz de proseguir los análisis en varias ocasiones, dejando de funcionar, y siendo necesario recomenzar nuevamente los análisis.

2. OBJETIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES FAMILIARES

Objetivo 6

Evaluación de las hipótesis de parentesco biológico a través del análisis de muestras críticas.

Periodo Neolítico

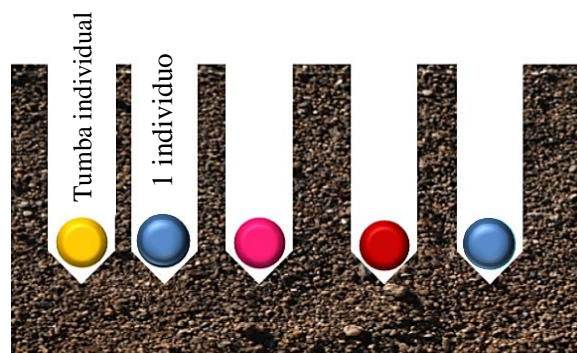
Los tres estudios llevados a cabo en la presente tesis se han realizado sobre yacimientos neolíticos del noreste peninsular (**figuras Mat.Sup. 6**) que han sido ampliamente estudiados desde distintas perspectivas y disciplinas. El registro neolítico en esta zona es muy relevante y el número de contextos funerarios muy elevado (por ejemplo, Aubán et al., 2015; Fontanals-Coll et al., 2015; Montes et al., 2016; Revelles et al., 2017; Allué et al., 2017; Piqué et al., 2018, Oms et al., 2018; Bergadà et al., 2018; Rovira et al., 2018; Martín et al., 2019; Masclans et al., 2019). No obstante, hasta la fecha son muy reducidos los estudios de parentescos realizados. Sería deseable en un futuro intentar asociar las hipótesis arqueológicas e históricas con la perspectiva genética, ya que permitirá abrir un nuevo abanico de posibilidades de estudio sociológico entre los individuos de las sociedades neolíticas.

Frente a la escasez de análisis genéticos centrados en las relaciones de parentesco, son cada vez más numerosos los que abordan las cuestiones relacionadas con los movimientos poblacionales y los procesos de neolitización (por ejemplo, Winter-Schuh et al., 2018; Rojo-Guerra, et al., 2018; Worley et al., 2019; Boyadzhiev, 2020; Valera et al., 2020; Snoeck et al., 2020; Roustaei K et al., 2020, entre otros). El reducido número de individuos encontrados en cada comunidad neolítica, asociado a la previsible degradación del material genético nuclear, dificultan el entendimiento de posibles patrones entre la familia biológica inhumada y el tipo de enterramiento.

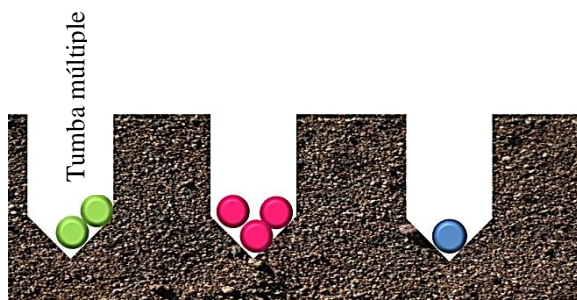
En la Feixa del Moro (**artículo 5**) hay dos enterramientos en cista en el que se han inhumado uno y dos individuos, respectivamente. Arquitectónicamente se vincula más a El Llord que a las inhumaciones en fosa, mayoritariamente individuales, de Can Gambús-1 (**figura 28 I y II**). Mientras en la cista 3 se documentó el entierro de dos individuos emparentados juntos, posiblemente madre –hijo, en la cista 2 hay un único individuo masculino adulto, cuyo resultado genético parece que lo emparenta con el bebé (**artículo 5**).

Figura 28. Tipos de enterramiento más frecuentes en el periodo Neolítico (*Imágenes de elaboración propia*).

I: Individual, con algunos individuos emparentados entre sí (representado en la figura por el mismo color).



II: enterramiento múltiple, con un reducido número de individuos emparentados entre sí.



Edades del Cobre – Bronce

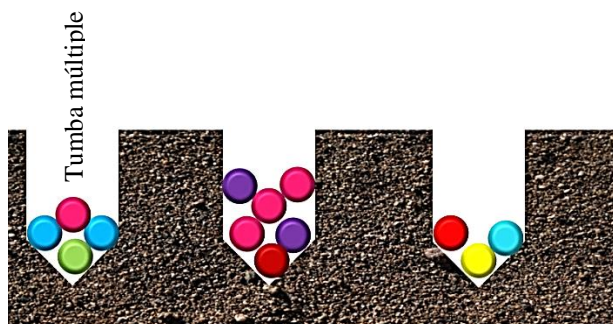
No se puede generalizar que el modelo de enterramiento en esta época dependa de las relaciones de parentesco biológico. Minferri y la Plana del Castell (**figura Mat.Sup. 7**) revelan dos realidades distintas (**figura 29 I y II**). Aunque ambos yacimientos son múltiples y se sitúan en regiones geográficamente próximas (**figura Mat.Sup. 8**), el número de individuos encontrados en cada uno es muy distinto ($N_{\text{Minferri}}=16$ y $N_{\text{PlanaCastell}}= 3$, de los 6 individuos encontrados). Mientras en Minferri se han podido determinar parentescos biológicos entre los individuos hallados en el mismo silo, así como entre diferentes silos, en la Plana del Castell los tres individuos analizados no estaban emparentados, por lo menos por vía materna.

Aunque existen cada vez más estudios centrados en la perspectiva genealógica de los yacimientos de las Edades del Cobre – Bronce, tal como el caso estudiado de “Los Tolmos” (Palomo – Díez, 2015), sería importante ampliar este tipo de análisis a contextos de otras

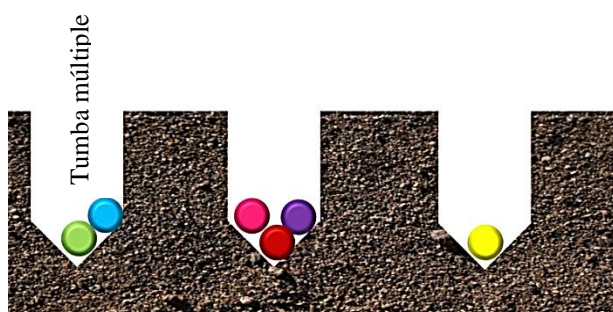
regiones de la Península Ibérica. En la mayoría son prácticamente inexistentes, como es el caso de los yacimientos de la franja atlántica.

Figura 29. Tipos de enterramientos más frecuentes en el periodo del Cobre-Bronce:

I: enterramiento múltiple, con varios individuos, algunos emparentados entre sí (en la figura, con el mismo color).



II: enterramiento múltiple, con un reducido número de individuos, sin parentesco biológico entre sí.



(Imágenes de elaboración propia).

Época Medieval

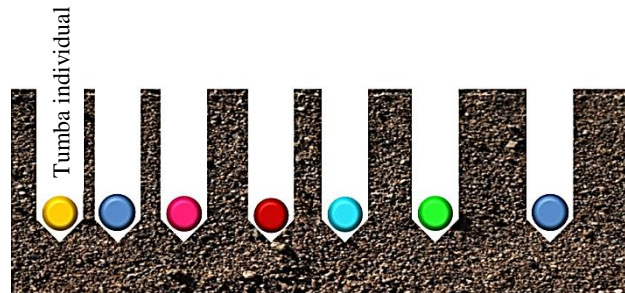
El análisis de los yacimientos de Galligants (**figura Mat.Sup. 9**) y Can Gambús-1 (medieval) (**figuras Mat.Sup. 10 y 11 A, B, C1, C2, C3 y C4**) demostró una realidad semejante: todos los enterramientos eran individuales, pudiéndose determinar parentescos biológicos entre algunos individuos. Con respecto al yacimiento de Uceda (publicado en los **artículos 6 y 7**) (**figura Mat.Sup. 12**) todas las inhumaciones eran también individuales, detectándose solo un parentesco por vía materna entre dos individuos enterrados simultáneamente (caso de la maternidad publicado en los **artículos 6 y 7**). Este tipo de enterramiento, con dos individuos emparentados e inhumados de forma simultánea, fue también observado y descrito por de Deguilloux (2018) y Rott (2018), y respectivos colaboradores.

En general, en este periodo histórico se observan prácticas funerarias paganas tradicionales y cristianas. Sobresalen los enterramientos colectivos de mujeres y/o hombres, de todas las clases sociales (Rott et al., 2018). Aunque se empieza a verificar alguna tendencia a partir del período Cobre- Bronce, es durante el periodo medieval europeo, con la expansión del Cristianismo en Europa, cuando se empieza a asumir que el entierro individual es un derecho, por lo que irá generalizándose su práctica (Rott et al., 2018). Están también documentados en esta época diversos enterramientos colectivos simultáneos, como consecuencia de diversas

enfermedades como la denominada “Peste de Justiniano I” (siglo VI, en la Península Ibérica), o la “Peste Negra” (siglo XIV en Europa) (McCormick, 2007 y 2015).

Figura 30. Tipo de enterramiento más frecuente en el periodo Medieval: individual, con algunos individuos emparentados entre sí (representado en la figura por el mismo color).

(Imagen de elaboración propia).



Época Moderna

Hay también casos donde el enterramiento simultáneo puede deberse a motivos bélicos, tales como la Guerra Civil Española. Durante el decurso del conflicto, el abultado número de fallecidos simultáneamente lleva a su deposición en fosas comunes. Por ese motivo, el estudio actual de estas fosas no tiene como objetivo primordial la búsqueda de relaciones de parentesco entre los individuos encontrados en el mismo lugar, sino entre presuntos parientes vivos, tales como los dos casos analizados en los **artículos 8 y 9**. Aunque en el caso del **artículo 9** ha sido posible descartar la paternidad utilizando marcadores autosómicos y de cromosoma X, con el paso del tiempo será cada vez más difícil encontrar posibles parientes vivos para realizar el estudio. De esta forma, sería recomendable analizar no solo este tipo de marcadores, para la determinación de parentescos cercanos, sino también marcadores de linaje, permitiendo en un futuro que se sigan identificando individuos.

Consideraciones finales

Observando los resultados desde un punto de vista general, en el caso de los **enterramientos individuales**, no existe un patrón único, aunque lo más frecuente fue no observar parentescos biológicos entre la mayoría de los individuos.

Con respecto a los **enterramientos múltiples**, en general, los individuos enterrados simultáneamente están biológicamente emparentados, pareciendo esta tendencia no depender del período histórico, exceptuando el caso de que el enterramiento se deba a motivos bélicos o a enfermedad.

A nivel molecular, se confirma que el mtDNA es el marcador genético que mejor se conserva y permite determinar y excluir parentescos por vía materna, desde el periodo Neolítico

hasta la actualidad. Con respecto al análisis de X-InDels se verifica su utilidad tanto en la posible determinación y exclusión de parentescos cercanos, en la determinación del sexo de los individuos, así como, asociado al análisis de mtDNA, ha permitido proponer hipótesis de parentesco basadas en posibles situaciones de incesto.

3. OBJETIVO GENÉTICO-POBLACIONAL

Objetivo 7.

Análisis de los linajes obtenidos, comparando sus distribuciones y frecuencias tanto con las respectivas poblaciones históricas, como con la población actual.

Consideraciones generales

El análisis biogeográfico fue, en general, realizado a través del estudio de mtDNA. Éste se ha basado, no solo en la distribución de los haplogrupos mitocondriales, sino también en tres análisis estadísticos que permitieron entender la diversidad, diferenciación y proximidad entre las distintas poblaciones estudiadas. Esos tests estadísticos son: el cálculo de AMOVA, el índice de fijación F_{ST} de Slatkin (Slatkin, 1993), y el método de escalamiento multidimensional MDS, respectivamente. Con respecto a este último análisis, se ha elegido el método de representación gráfica MDS, ya que es la técnica utilizada para analizar la relación entre objetos, en este caso matrices de diferenciación genética entre varias poblaciones, mediante la representación gráfica de esas asociaciones.

Aunque consciente de la reducida representatividad muestral para cada periodo histórico estudiado y región, los resultados obtenidos están de acuerdo con publicaciones previas, tal como se explica en la discusión de este objetivo. A continuación, se describen los linajes mitocondriales más frecuentes, así como su posible origen y distribución, tanto en poblaciones antiguas como modernas. Posteriormente, se discuten los resultados biogeográficos de acuerdo con cada periodo histórico.

ANÁLISIS BIOGEOGRÁFICO SINCRÓNICO

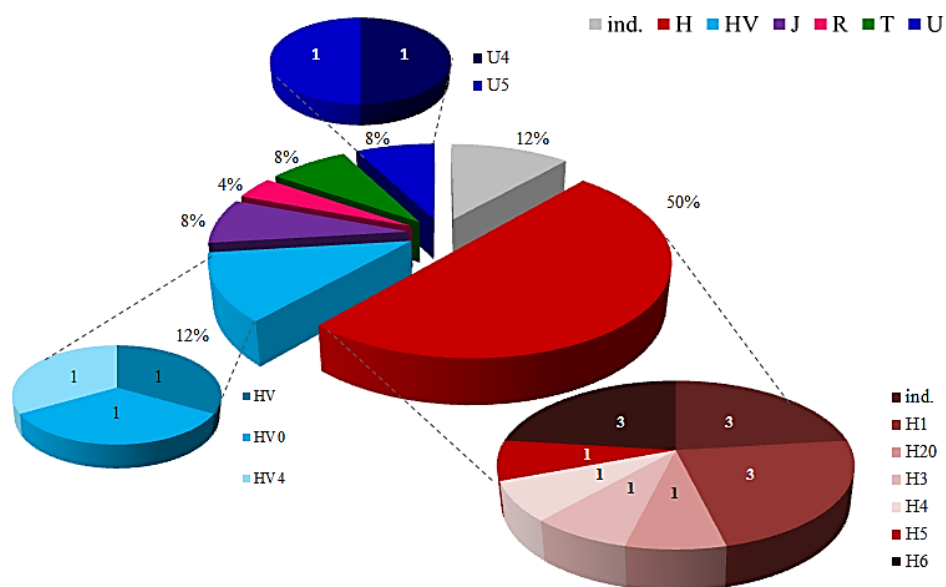
Neolítico

Distribución de los linajes de mtDNA

El haplogrupo con la frecuencia más elevada en este periodo es, indudablemente, el macrohaplogrupo H (50%) (**figura 31**), en contraste con los resultados obtenidos por Gamba

(2012)., donde este haplogrupo aparece con una baja frecuencia (16%), y de Fernández et al., (2014), donde los haplogrupos más frecuentes son el K y derivados de N. Consultando la base de datos de referencia de DNA antiguo, AmtDB, se verifica que la frecuencia del linaje H es del 19,95%. Con respecto a la población actual de la Península Ibérica, el haplogrupo H aparece con una prevalencia entre [32-52%], dependiendo de la región (Barral-Arca et al., 2016). Los tres yacimientos neolíticos estudiados-indican una composición mitocondrial semejante a la actual, en la región estudiada (Cataluña), contrario a lo concluido por Fernández (2005) en su estudio de poblaciones neolíticas de esta misma región.

Figura 31. Distribución de los haplogrupos mitocondriales en el Período Neolítico.
ind: haplogrupo indeterminado. (Imagen de elaboración propia).



Varianza molecular y diferenciación genética entre poblaciones neolíticas

Cuando comparamos los resultados de AMOVA, se verifica que, en general, todas las poblaciones neolíticas eran bastante diversas desde el punto de vista genético. Por otro lado, soportando esta variabilidad genética están los resultados de diferenciación genética obtenidos a través del estudio de la estadística F_{ST} , donde se han registrado valores entre moderados a muy elevados. Ambos resultados pueden estar indicando una posible entrada de distintos *pools* genéticos neolíticos en la Península Ibérica, no solo por vía marítima (Gamba et al., 2012), sino también terrestre.

Con respecto a los resultados obtenidos a través del escalamiento multidimensional, se verifica una mayor proximidad entre las poblaciones occidentales, concretamente Can Gambús-

l y Escocia e Inglaterra, frente a la de Alemania. Por un lado, puede ser una prueba a favor del modelo de colonización “*de contacto*”, donde la transmisión del conocimiento se realiza de este a oeste, sin que exista una sustitución de los linajes genéticos previos existentes, sino a través de la aculturación de la población, a través del comercio y otros canales de comunicación. Un posible indicio sería la evidencia de ciertos linajes también presentes en el periodo Paleolítico y Mesolítico (Gamba, 2012), como son el caso de los haplogrupos U, H y HV (**figura 31**)

Por otro lado, puede también significar que la población migrante tenía un efectivo poblacional masculino muy superior al femenino y, aunque tanto hombres como mujeres poseen mtDNA, solo las mujeres lo transmiten, y solo ellas podrían ser responsables de la sustitución mitocondrial en una población. Así, esta hipótesis supone que existen, por un lado, diferencias considerables entre las poblaciones a nivel mitocondrial y diferencias muy reducidas a nivel de linajes de cromosoma Y. Sin embargo la ausencia de resultados con cromosoma Y no permite confirmar dicha hipótesis.

Edades del Cobre y Bronce

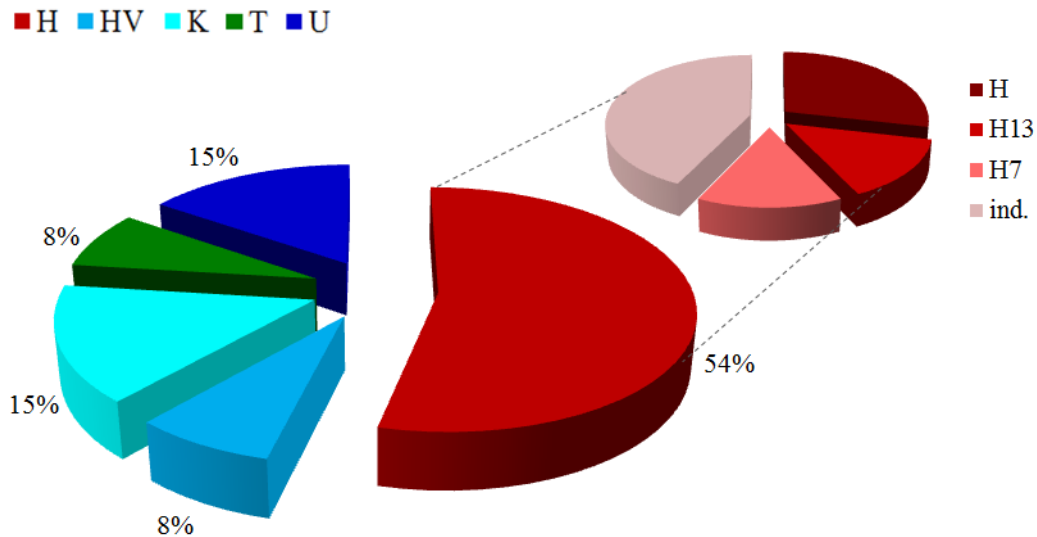
Distribución de los linajes de mtDNA

En este caso concreto, se observa que los macrohaplogrupos con una frecuencia más elevada son el H (54%), el U (15%), surgiendo por primera vez el haplogrupo K (15%) (**figura 32**).

Consultando la base de datos de referencia, se verifica que la frecuencia del haplogrupo K es semejante a la obtenida en la presente tesis, con 17%. Con respecto a los haplogrupos H y U, las frecuencias son distintas (H=27,35% y U=24,93%), pudiendo estas diferencias deberse al efecto muestral. Sería importante aumentar el número de individuos analizados en este periodo histórico para evaluar con mayor precisión la variación de los linajes H y U.

La prevalencia de estos tres haplogrupos, H, U y K, está también de acuerdo con las observaciones de Palomo-Díez (2005), en su estudio sobre las poblaciones de las Edades del Cobre-Bronce de la Submeseta Norte de la Península Ibérica.

Figura 32. Distribución de los haplogrupos mitocondriales en el Período de la Edades del Cobre y Bronce. *ind.*: haplogrupo indeterminado. (Imagen de elaboración propia).



Varianza molecular y diferenciación genética entre poblaciones de las Edades del Cobre-Bronce.

Con respecto a los análisis estadísticos de AMOVA, se verifica que la mayor variabilidad se encuentra “dentro” de las distintas poblaciones. Este dato permite pensar que la tasa de endogamia sería reducida y, dadas las reducidas diferencias entre las poblaciones (aproximadamente el 3%), sería posible la existencia de diversos flujos migratorios entre ellas. Dado el reducido efectivo poblacional que se atribuye a estos periodos, cada comunidad sería pequeña.

Finalmente, el escalamiento multidimensional (MDS) parece reflejar que el yacimiento de Minferri estaría integrado en un grupo formado por otras comunidades del periodo Cobre-Bronce de Europa occidental, pudiendo su variabilidad genética ser el resultado de distintos orígenes de sus ocupantes y/o antepasados. Tal como descrito por Szécsényi-Nagy y colaboradores (2017), el periodo entre el final del Neolítico y el inicio de la Edad Media está caracterizado por profundos cambios sociales, como el intercambio comercial, incluso con poblaciones de otros continentes. Los datos aquí presentados parecen reflejar que el intercambio genético puede haber ocurrido juntamente con los nuevos conocimientos y culturas.

Época Medieval

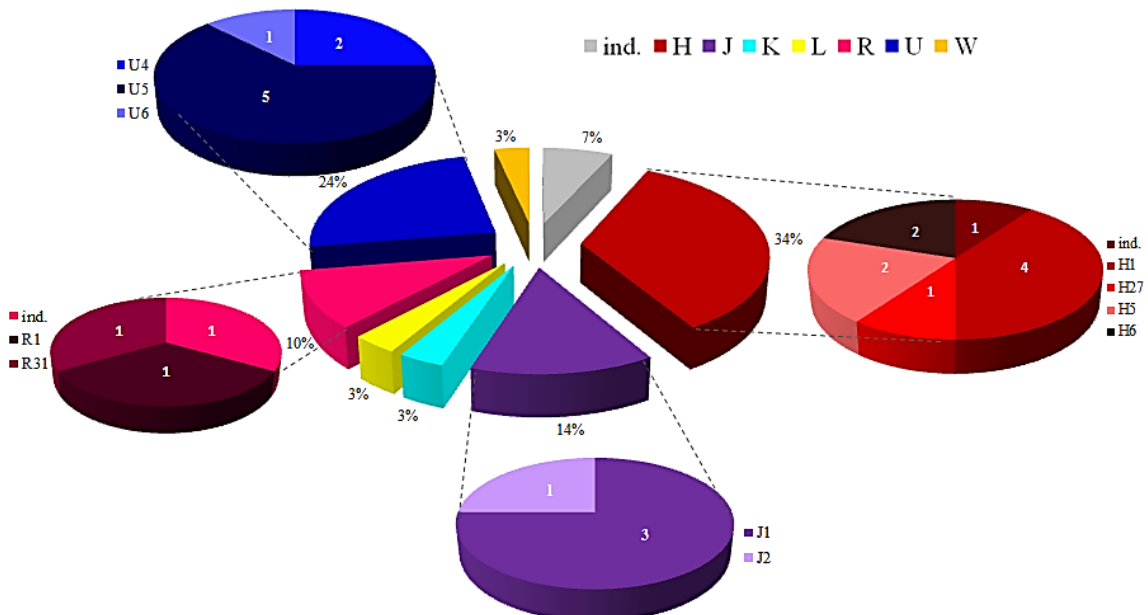
Uno de los imperios más importantes en la historia occidental fue el Imperio islámico. Su presencia se extendió desde el oeste del río Indo hasta la franja atlántica (Gleize et al., 2016). En dos de los yacimientos analizados, Galligants (Cataluña, España) (Alta Edad Media) y Uceda (Castilla la Mancha, España) (Baja Edad Media) (**artículo 7**), la hipótesis arqueológica inicial era que estábamos ante enterramientos islámicos, debido principalmente a la posición de los individuos. Aunque el ritual de enterramiento islámico sigue siendo, hasta la actualidad, una de las características de esa cultura, teniendo en cuenta las diferentes fases de la ocupación islámica de la Península Ibérica, es necesario plantear también otro tipo de hipótesis sobre el origen de esos individuos. Por un lado, un origen biogeográfico típico europeo, indicando la conversión de aquellas personas al Islam. Por otro, un origen norte africano, como resultado de la población berebere que acompañaba la incursión islámica o, finalmente, un origen árabe.

Distribución de los linajes de mtDNA

Los haplogrupos con una mayor representatividad entre los individuos analizados siguen la tendencia de lo observado con anterioridad (**figura 33**). Así, el haplogrupo H es el más representado (34%), seguido del U (26%), y, por primera vez, el linaje J, que aquí es uno de los más frecuentes (14%). En este caso, no se observa una prevalencia tan elevada del haplogrupo K (3%), pudiendo deberse a un efecto muestral, o a un posible efecto de deriva genética.

Figura 33. Distribución de los haplogrupos mitocondriales en el Período Medieval.

ind: haplogrupo indeterminado. (Imagen de elaboración propia).



Varianza molecular y diferenciación genética entre poblaciones medievales.

El análisis de AMOVA entre las poblaciones medievales revela que la mayoría de la variabilidad se encuentra, una vez más, en el interior de las propias comunidades. Cuando se comparan las distintas poblaciones medievales, se observan diferencias genéticas entre moderadas a elevadas. Estas diferencias pueden ser el resultado de un cierto aislamiento genético, no pareciendo existir un flujo muy acentuado entre los grupos poblacionales analizados, o entre sus ancestros maternos. Un factor a tener en cuenta, es la distancia geográfica real entre poblaciones, que podrá también ayudar a explicar los resultados de MDS obtenidos, apreciándose un aislamiento de las tres poblaciones medievales analizadas: (Galligants, Uceda y Can Gambús-1). También se deberán considerar los efectos de una posible deriva genética, tanto a través del efector fundador, donde un pequeño grupo de linajes origina una nueva población distinta a la original; así como, a través del efecto “cuello de botella”, donde a través de distintos fenómenos (naturales, bélicos, enfermedades, entre otros) se observa una reducción drástica en la población, no siendo entonces los linajes más frecuentes los más representativos en la población original.

ANÁLISIS BIOGEOGRÁFICO DIACRÓNICO

El principal objetivo del análisis diacrónico fue la observación del comportamiento de los linajes mitocondriales a lo largo del tiempo, en las dos regiones estudiadas, Castilla-La Mancha y Cataluña. Aunque en la actualidad no era esperable observar diferencias significativas entre el *pool* genético de las poblaciones de costa e interior, en los periodos históricos pasados, la situación geográfica de cada población era determinante a la hora de establecer, por ejemplo, contactos comerciales. En principio, era previsible que las poblaciones de costa presentaran un *pool* genético más diverso, como consecuencia de la actividad comercial y el contacto marítimo con otras poblaciones. Contrariamente, las poblaciones del interior serían genéticamente más homogéneas, ya que los contactos habituales se darían entre comunidades próximas. Tal homogeneidad, se podría traducir en un cierto grado de endogamia y fijación de linajes genéticos, que supondría que ciertos haplogrupos tuvieran una frecuencia más elevada.

Considerando los resultados del análisis de AMOVA, se verificó que la variabilidad genética en las dos regiones es mucho más acentuada dentro de los periodos históricos. Por otra parte, los valores obtenidos para la diferenciación genética F_{ST} indican la presencia de diferencias genéticas moderadas entre los periodos históricos en Castilla la Mancha, al revés de lo observado en Cataluña. Observando los cuatros periodos temporales en Cataluña, se verifican diferencias genéticas reducidas a lo largo del tiempo. Al ser una región de costa, y al mismo

tiempo de frontera terrestre, se esperaba un *pool* genético mucho más diverso. Además, es una región que asistió en el pasado a grandes movimientos poblacionales, caso del establecimiento comercial griego en el puerto de Empúries (actualmente Alt Empordà, Girona), el establecimiento de Tarraco (actualmente Tarragona) como una importante capital del imperio romano, o la unión dinástica entre la corona de Castilla y la de Aragón. No obstante, según los resultados obtenidos, esta región parece haber mantenido los linajes mitocondriales de una forma más o menos estable a lo largo del tiempo, pudiendo interpretarse de, por lo menos, tres formas. En primer lugar, los grandes movimientos poblacionales no supusieron una mezcla significativa de linajes entre las distintas poblaciones. Aunque vivieron en un mismo espacio geográfico, los intercambios genéticos no fueron representativos. Una segunda propuesta, es que los grandes protagonistas de los movimientos poblacionales hubieran sido mayoritariamente varones, por lo que no se aprecia su contribución genética a la hora de estudiar mtDNA. Finalmente, observando los linajes mitocondriales, desde la época neolítica hasta la actualidad, en ningún momento se observa un linaje autóctono. Los distintos haplogrupos están presentes en todo el territorio ibérico e, incluso, en buena parte de la Europa Occidental. Así, aunque es muy probable que hayan existido importantes intercambios genéticos, el *pool* genético no se vio demasiado afectado, siendo siempre los mismos linajes. Una situación muy distinta sería si hubiéramos detectado linajes típicos americanos o australianos, por citar ejemplos extremos, lo cual nos hubiera obligado a contextualizar ese influjo genético con acontecimientos históricos concretos.

A nivel general, los resultados tanto de AMOVA como de F_{ST} están de acuerdo con lo esperado. Las poblaciones cambian a lo largo del tiempo, aunque se mantenga una estructura general. Factores como epidemias, conflictos bélicos o periodos de hambruna, reducen a larga escala la variabilidad genética, pudiendo funcionar como un fenómeno de “cuello de botella” (*Bottleneck*).

Uno de los principales problemas observados a la hora de realizar este estudio tuvo que ver con la ausencia de secuencias genéticas disponibles de todas las épocas históricas, para cada una de las regiones mencionadas. Tampoco fue posible tener acceso a información publicada de todos los periodos históricos en las citadas regiones. Por estos motivos, se considera que el presente estudio diacrónico es estrictamente indicativo, no siendo posible obtener conclusiones sólidas hasta tener un mayor número de datos. En todo caso, es un primer paso que servirá de referente a futuras investigaciones.

Análisis genético – poblacional – consideraciones finales

Si por un lado es verdad que el efectivo poblacional estudiado puede no haber sido representativo de las poblaciones antiguas presentes en la Península Ibérica, no es menos cierto que ello es también consecuencia de las muestras analizadas. El registro arqueológico es en diversos casos escaso, y hemos tenido enormes dificultades a la hora de acceder, por ejemplo, a yacimientos neolíticos intactos, con un número significativo de individuos bien conservados y cuyo análisis genético ofreciera resultados genéticos fiables. En efecto, aunque para realizar un estudio genético-poblacional se requiere un número elevado de individuos, lo que refuerza la fiabilidad de los resultados, la realidad, tanto arqueológica como forense, puede no acompañar a esa exigencia. Por ejemplo, en el yacimiento neolítico de La Feixa del Moro (**artículo 5**), se documentaron dos tumbas con tres individuos, siendo imposible aumentar la muestra del mismo yacimiento. Así, aunque la estadística es una de las herramientas más fiables y esclarecedoras a la hora de interpretar la diversidad y estructura genética de las poblaciones, hay casos donde no es posible aplicar los estándares de efectivo poblacional, característicos del análisis de poblaciones actuales.

❖ Discusión - Consideraciones finales: problemas y perspectivas de futuro

Dadas las características que se pretendían analizar en las muestras biológicas, no fue posible obtener la autorización necesaria para llevar a cabo el estudio en casos forenses. Así, siempre que ha sido posible, se ha recurrido a casos de ámbito arqueológico que, de alguna forma, se asemejaran a la problemática forense. Fue posible analizar un diverso abanico de situaciones, muy parecidas respecto de las que se podrían encontrar en la casuística actual, como, por ejemplo, muestras cuyo material genético estuviera inhibido por posibles contaminantes químicos (**artículo 2**, yacimiento de Plana del Castell).

Por otro lado, el conjunto de muestras analizadas por periodo histórico y/o región no es demasiado profuso para la evaluación biogeográfica de cada situación. No obstante, considerando el valor de esa información, se procedió a su análisis de forma integrada, en el marco del objetivo 7 de la presente tesis de doctorado. Para poder extrapolar cada observación a la realidad, tanto de cada periodo histórico, como de región geográfica, sería interesante ampliar, siempre que fuese posible, el número de individuos analizados dentro de cada yacimiento, periodo histórico y región.

Otro problema fundamental tuvo que ver con la dificultad para encontrar un número significativo de muestras biológicas provenientes de enterramientos múltiples, fueran simultáneos o no. A excepción de los casos procedentes de epidemias o situaciones bélicas,

como las analizadas en los **artículos 8 y 9**, fue especialmente complicado encontrar enterramientos múltiples.

A nivel metodológico, un punto importante fue la implementación por primera vez en nuestro grupo de investigación de la técnica de MPS, como sustituto de la clonación. La perspectiva inicial consistía en el análisis de las muestras críticas considerando siempre las dos técnicas – secuenciación Sanger y MPS, con el fin de comparar los resultados obtenidos. No obstante, hasta el momento, solo fue posible incluir los resultados del yacimiento de Can Gambús-1 (Neolítico), obtenidos por ambas técnicas de secuenciación. Un punto importante a tener en cuenta es la confirmación de estos resultados obtenidos por Sanger, a través de la técnica de MPS.

Los restantes análisis han sufrido diferentes tipos de inconvenientes, siendo el principal y más limitante el volumen de extracto requerido para realizar convenientemente la técnica de MPS, siendo necesario requerir nuevamente los permisos para el análisis de nuevas muestras biológicas. Será importante, en futuros análisis, analizar y evaluar el protocolo de extracción por forma a obtener al final un volumen superior de extracto. Se hicieron diversas pruebas de MPS en distintos laboratorios de genética, tanto nacionales como internacionales, siendo que otro factor importante fue la falta de experiencia a la hora de poner a punto la técnica de MPS, considerando las características particulares de las muestras aquí analizadas.

Finalmente, el elevado número de individuos de los cuales no fue posible obtener datos autosómicos obliga a replantear de alguna forma la estrategia para la obtención de datos nucleares. Una de las perspectivas para un futuro próximo sería obtener datos de todos los yacimientos de la presente tesis, a través de la técnica de secuenciación MPS, que, en el caso de una determinada concentración de DNA y volumen de extracto, podrá permitir tener acceso a datos nucleares.

La metodología de laboratorio y el análisis estadístico aquí realizados, predominantemente empleados en el ámbito forense, permitieron en la mayor parte de los casos la obtención de resultados satisfactorios, confirmando su utilidad también en el contexto arqueológico. Efectivamente, no es el contexto del estudio en cuestión, forense o arqueológico, el que condiciona el análisis genético, sino las condiciones de la muestra biológica que se está estudiando.

Otro punto importante fue la aplicación de marcadores de cromosoma X y la obtención de resultados en muestras en elevado estado de degradación. Aunque se hace necesario perfeccionar la técnica de los X-InDels, se considera su aportación muy importante, ya que ha permitido la determinación y/ exclusión de parentescos biológicos. Permitieron también confirmar el sexo molecular, así como, asociado al análisis de mtDNA, la posibilidad de proponer el incesto como explicación en un caso complejo de parentesco biológico.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ Conclusiones

OBJETIVOS METODOLÓGICOS.

Adaptación de una técnica de extracción no destructiva para muestras óseas y dentales.

Conclusión 1.

- ❖ La mejor técnica para realizar una extracción de DNA es la no destructiva. No se han observado diferencias en los resultados referentes al DNA nuclear y al mtDNA. Las muestras analizadas presentan una preservación prácticamente integral, tanto en forense, como en arqueología.

Evaluación de los resultados genéticos obtenidos de acuerdo con el tipo de muestra biológica analizada.

Conclusión 2.

- ❖ Con relación a muestras de saliva y sangre, se concluye que los mejores resultados se obtienen con la saliva. La saliva presenta un reducido número de inhibidores intrínsecos y los métodos de extracción de DNA son más rápidos e igualmente eficaces que los utilizados para la extracción de sangre.

Conclusión 3.

- ❖ Con respecto a muestras óseas y dentales, interpretamos que tanto el diente como la porción petrosa del hueso temporal presentan un porcentaje de éxito semejante, por lo que ambas podrían ser empleadas en estudios forenses y arqueológicos. Por esto, no se acepta la hipótesis 2.

Conclusión 4.

- ❖ No existen diferencias entre los resultados obtenidos a partir de muestras provenientes de individuos infantiles y adultos. En prácticamente todos los casos analizados de fetos, bebés, infantiles o jóvenes se ha obtenido no solo un perfil de mtDNA, sino también de nuDNA. Asimismo, se ha podido determinar el sexo del individuo.

Adecuación del protocolo de extracción y amplificación para la resolución de casos de inhibición del material genético.

Conclusión 5.

- ❖ El mejor procedimiento para la extracción de DNA es el que asocia una incubación de la muestra biológica durante 48h, con un *buffer* de extracción con pH = 8.

Conclusión 6.

- ❖ La asociación de Proteína Sérica Bovina con un incremento de $MgCl_2$ es el mejor método para la amplificación de DNA, permitiendo la obtención de resultados de mtDNA por primera vez en muestras inhibidas. Dicho proceso aumenta la calidad del material genético en general.

Evaluación de los resultados obtenidos en individuos de distintos períodos de tiempo: “DNA crítico *versus* DNA antiguo”.

Conclusión 7.

- ❖ La obtención de resultados genéticos no depende exclusivamente de la antigüedad de la muestra, sino del proceso de preservación. Por esto, se acepta la hipótesis 3.

Conclusión 8.

- ❖ La designación “DNA antiguo” deberá ser utilizada para denominar el contexto de un estudio genético, concretamente, arqueológico. En muestras biológicas cuya concentración de DNA esté por debajo de los 100pg se deberá emplear la nomenclatura “DNA crítico o degradado”.

Evaluación de la utilidad de marcadores de cromosoma X en la determinación de relaciones de parentesco biológico, donde por lo menos una de las muestras estudiada tiene una concentración reducida de DNA.

Conclusión 9.

- ❖ El empleo de marcadores de cromosoma X permite solucionar casos de parentesco biológico complejos, así como determinar el sexo de los individuos cuando no se obtienen datos del gen de la amelogenina.

Conclusión 10.

- ❖ Asociado al análisis de mtDNA, el empleo de marcadores de cromosoma X ha permitido proponer hipótesis de parentesco basadas en posibles situaciones de incesto.

Conclusión 11.

- ❖ Los valores obtenidos de Probabilidad de Discriminación (PD) y Poder de exclusión *a priori* (MEC) de los 32 X-InDels en la población española confirman su elevada eficiencia forense, tanto en casos de identificación, como en estudios de parentesco.

OBJETIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES FAMILIARES

Evaluación de las hipótesis de parentesco biológico a través del análisis de muestras críticas.

Conclusión 13.

- ❖ Aunque no se observó un patrón único, lo más frecuente fue que individuos enterrados en tumbas individuales consecutivas no estuvieran emparentados.

Conclusión 14.

- ❖ En enterramientos múltiples, los individuos enterrados de manera simultánea están, por lo general, biológicamente emparentados. Este hecho se ha documentado en los distintos periodos históricos analizados.

Conclusión 15.

- ❖ En enterramientos múltiples no simultáneos, independientemente del periodo histórico, no existe un único patrón, pudiéndose encontrar tanto individuos biológicamente emparentados, como sin ningún vínculo biológico. Por esto, se descarta la hipótesis 1.

OBJETIVO GENÉTICO-POBLACIONAL

Análisis de los linajes obtenidos, comparando sus distribuciones y frecuencias, tanto con respecto a las poblaciones contemporáneas del pasado, como con la población actual.

Conclusión 16.

- ❖ El linaje mitocondrial con una mayor representatividad en todos los periodos históricos estudiados es el H.

Conclusión 17.

- ❖ Considerando el estudio sincrónico, independientemente del periodo histórico considerado, el mayor porcentaje de variabilidad genética siempre se observa dentro de cada población, permitiendo concluir que existiría un cierto grado de homogeneidad entre ellas.

Conclusión 18.

- ❖ Con respecto al análisis diacrónico, se observa una mayor variabilidad genética dentro de cada periodo histórico, observándose una continuidad de los linajes mitocondriales a lo largo de los distintos periodos.

Conclusión 19.

- ❖ La metodología de laboratorio y el análisis estadístico, predominantemente empleados en el ámbito forense, confirmaron su utilidad también en el contexto arqueológico. Por esto, se acepta la hipótesis 4.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **Referencias Bibliográficas**

- Adler CJ, Haak W, Donlon D, Cooper A, The Genographic Consortium. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J Archaeol Sci.* 2011; 38(5):956-964.
- Allué E, Picornell-Gelabert L, Daura J, Sanz M. Reconstruction of the palaeoenvironment and anthropogenic activity from the Upper Pleistocene/Holocene anthracological records of the NE Iberian Peninsula (Barcelona, Spain). *Quatern Int.* 2017; 457: 172–189.
- Alonso A, Marquina D. Estudio ecofuncional de la microbiota asociada a suelos de interés vitivinícola. Eprintid: 43985. Master's Thesis. 2016, Universidad Complutense de Madrid.
- Alt K, Vach, W. Odontological Kinship Analysis in Skeletal Remains. *Forensic Sci Int Genet.* 1995; 74: 99–113.
- Alt K, Vach, W. Kinship Studies in Skeletal Remains: Concepts and Examples. 1998. *Dental Anthropology*, eds. Springer.
- Amorim A, Carneiro J. The impact of silent alleles in kinship probability calculations. *Forensic Sci Int Genet: Genetics Supplement Series 1.* 2008; 638–639.
- Arroyo-Pardo E, Gomes C, López-Parra A, Palomo-Díez S. Introducción a la Genética Forense 4ª Edición. 2017. Altom Service SA.
- Arroyo-Pardo E, Gomes C, Palomo-Díez S, Baeza C, Cuscó I, Raffone C, et al., Identificación genética de víctimas de la Guerra Civil Española en Cataluña. 2019. XXI Congreso de la Sociedad Española de Antropología Física – SEAF.
- Aubán J, Barton C, Gordó S, Bergin S. Modeling initial Neolithic dispersal. The first agricultural groups in West Mediterranean. *Ecol Model.* 2015; 307:22-31.
- Baeta M, Núñez C, Cardoso S, Palencia-Madrid L, Herrasti L, Etxeberria F. et al. Digging up the recent Spanish memory: genetic identification of human remains from mass graves of the Spanish Civil War and posterior dictatorship. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 19, 272–279.
- Ballantyne KN, Keerl V, Wollstein A, Choi Y, Zuniga SB, Ralf A, et al. A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6(2):208-18.
- Barral-Arca R, Pishedda S, Gómez-Carballa A, Pastoriza A, Mosquera-Miguel A, López-Soto M, et al. Meta-Analysis of Mitochondrial DNA Variation in the Iberian Peninsula. *PLoS One.* 2016; 11(7): e0159735.
- Bergadà M, Cervelló J, Edo M, Cebrià A, Oms F, Martínez P, et al. Chronostratigraphy in karst records from the Epipaleolithic to the Mid/Early Neolithic (c.13.0–6.0 cal ka BP) in the Catalan Coastal Ranges of NE Iberia: environmental changes, sedimentary processes and human activity. *Quaternary Sci Rev.* 2018. 184, 26–46.
- Biesecker L, Bailey-Wilson J, Ballantyne J, Baum H, Bieber F, Brenner C, et al. DNA Identifications after the 9/11 World Trade Centre Attack. *Science.* 2005; 310 (5751):1122-1123.

- Boyadzhiev K. The transition to the Late Neolithic in the Upper Thracian Plain. *Quatern Int.* 2020. In Press.
- Buckleton J, Triggs C, Walsh S. *Forensic DNA Evidence Interpretation*. 2nd Edition. 2016. CRC Press.
- Budowle B. *DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis*. 1st Edition. 2000. Eaton Publishing Company.
- Butler J. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd Edition. 2005. Elsevier.
- Caragine T, Currie K, O'Connor C, Budimlija Z. Low-Template DNA Testing. *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 2nd Edition. 2013. Academic Press.
- Caramelli D, Lago G. Advances in ancient DNA studies. *J Anthropol Sci.* 2006; 84: 65-83.
- Cardoso S, Etxeberria F, Alfonso-Sánchez MA, Pérez-Miranda AM, Odriozola A, Valverde L. et al. Contribution of forensic genetics to the recovery of historic memory of the Spanish Civil War. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2008; 1(1), 454–456.
- Castany, J. La Necròpolis Neolítica dell Iord (Castellar de la Ribera, Solsonès), in Gibaja J, Subirà M, Martín A, Mozota M, y Roig J (éd.): *Mirando a la Muerte: Las prácticas funerarias durante el neolítico en el noreste peninsular*, E-ditArx e Q6 Publicaciones Digitales. In Press
- Deguilloux MF, Pemonge MH, Rivollat M, Lefebvre A. Investigating the kinship between individuals deposited in exceptional Merovingian multiple burials through aDNA analysis: The case of Hérange burial 41 (Northeast France). *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2018; 20:784-790.
- INTERPOL. *Disaster Victim Identification Guide*. 2009.
- Donkervoort S, Dolan SM, Beckwith M, Northrup TP, Sozer, A. Enhancing accurate data collection in mass fatality kinship identifications: Lessons learned from Hurricane Katrina. *Forensic Sci Int: Genet.* 2008; 2(4), 354–362.
- Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 271(3):726-30.
- Eglinton G, Logan GA. Molecular preservation. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 1991; 333: 315–327.
- Emmons A, Davoren J, DeBruyn J, Mundorff A. Inter and intra-individual variation in skeletal DNA preservation in buried remains. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2020; 44(102193).
- Espinet A, Moya i Garra A, López J, Farjas B. Ofrenes o deixalles? El cas dels bovins (*Bos taurus*) en context funerari del jaciment del bronze ple deMinferri (Lleida, Catalunya). *MAM.* 2014; 6:53-112.
- Excoffier L, Lischer H. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010; 10(3): 564-567.
- Fernández E. Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la Cuenca Mediterránea. Tesis Doctorado. 2005. Universitat de Barcelona.

- Fernández E, Pérez-Pérez A, Gamba C, Prats E, Cuesta P, et al. (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.* 2014; 10(6): e1004401.
- Fontanals-Coll M, Eulàlia Subirà M, Díaz-Zorita M, Duboscq S , Gibaja J. Investigating palaeodietary and social differences between two differentiated sectors of a Neolithic community, La Bòbila Madurell-Can Gambús (north-east Iberian Peninsula). *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2015; 3: 160-170.
- Foster E, Jobling M, Taylor P, Donnelly P, de Knijff P, Mieremet R, et al. Jefferson fathered slave's last child. *Nature.* 1998; 396(6706):27-8.
- Friš E, Grdina S, Podovšovnik E, Zupanc T, Pajnič I. Comparison of DNA yield after long-term storage of Second World War bone samples. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2019; 7(1): 117-119.
- Gamba C, Fernández E, López-Parra AM, Arroyo-Pardo E. Statistical evaluation of pre-laboratory and laboratory factors that influence DNA recovery from archaeological material. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2011; 3(1): e109-e110.
- Gamba C. Aplicaciones del DNA antiguo a muestras humanas relaciones familiares y estudios poblacionales diacrónicos. Tesis de Doctorado 2012. Universidad Complutense de Madrid.
- García-Collado M. Food consumption patterns and social inequality in an early medieval rural community in the centre of the Iberian Peninsula. Social complexity in early medieval rural communities. The north-western Iberia archaeological record. 2016. Archaeopress Publishing Ltd.
- García O. Genealogía forense. Implicaciones sociales, éticas, legales y científicas. *Revista Española de Medicina Legal.* 2020; In Press.
- Garland S, Baker A, Phillott A, Skerratt L. BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *DAO.* 2010; 92:113-116.
- Gibaja J. Instrumentos líticos de las necrópolis neolíticas catalanas: comunidades de inicios del IV milenio Cal BC. *Complutum.* 2003: 55-72.
- Gibaja J. Prácticas funerarias durante el Neolítico en Cataluña. *Mainake.* 2004; 26: 9-27.
- Gibaja J, Subirà M, Martín, A, Roig, J. Mirando a la Muerte: Las prácticas funerarias durante el neolítico en el noreste peninsular. 2018. E-ditArx - Publicaciones Digitales. Vol. I, II, III.
- Gilgenkrantz S. Unambiguous identification of the remains of the Romanov family. *Med Sci (Paris).* 2009; 25(6-7):637-40.
- Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, et al. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet.* 1994;6(2):130-5.
- Gill P, Bleka Ø, Hansson O, Benschop C, Haned H. Low-template DNA. Chapter 4. *Forensic Practitioner's Guide to the Interpretation of Complex DNA Profiles.* 2020. Academic Press.

- Gleize Y, Mendisco F, Pemonge MH, Hubert C, Groppi A, Houix B, et al. Early Medieval Muslim Graves in France: First Archaeological, Anthropological and Palaeogenomic Evidence. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148583.
- Goedbloed M, Vermeulen M, Fang R, Lembring M, Wollstein A, et al. Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR® Yfiler® PCR amplification kit. *Int J Legal Med*. 2009; 123, 6: 471-482.
- Gomes C, Magalhães M, Amorim A, Alves C, Pinto N, Gusmão. How useful is your X in discerning pedigrees? *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser*. 2011; 3(1): e161-e162.
- Gomes C, Magalhães M, Alves C, Amorim A, Pinto N, Gusmão L. 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*. 2012 ;126(6):917-21.
- Gomes C, Fondevila M, Magaña-Loarte C, Fernández-Jiménez J, Fernández-Serrano J, Palomo-Díez S, et al. An unusual kinship case from the Spanish Civil War (1936–1939): Ancient versus degraded sample's investigation. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser*. 2019; 7(1): 690-691.
- González A, Cannet C, Zvéngorosky V, Geraut A, Koch G, Delabarde T, et al. The petrous bone: Ideal substrate in legal medicine? *Forensic Sci. Int. Genet*. 2020; 47: 102305.
- Goodwin W, Hadi S, Linacre A. *An introduction to forensic genetics*. 2007. 2nd Edition. Wiley.
- Graffelman J, Galván I, de Cid R, Barceló-i-Vidal C. *Multidimensional Scaling and Relatedness Research*. 2018. Preprint BioRxiv.
- Griffiths A, Wessler S, Lewontin R, Gelbart W, Suzuki D, Miller J. *Introduction to Genetic Analysis*, 8th Edition. 2005. W. H. Freeman and Company.
- Haimés E, Toom V. Hidden in full sight: kinship, science and the law in the aftermath of the Srebrenica genocide. *New Genet Soc*. 2014; 33(3): 277–294.
- Hansen H, Damgaard P, Margaryan A, Stenderup J, Lynnerup N, Willerslev E, et al. Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. *Plos One*. 2017. 12(1): e0170940.
- Harper N, Tung T. *Burial Treatment Based on Kinship? The Hellenistic–Roman and Venetian-Period Tombs in the Malloura Valley. Crossroads and Boundaries" The Archaeology of Past and Present in the Malloura Valley, Cyprus*. 2nd Edition. 2012. American Schools of Oriental Research.
- Hartman D, Benton L, Morenos L, Beyer J, Spiden M, Stock A. Examples of kinship analysis where Profiler Plus™ was not discriminatory enough for the identification of victims using DNA identification. *Forensic Sci Int*. 2011;205(1-3):64-8.
- Higgins D, Austin, J. Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. *Sci Justice*. 2013; 53(4), 433–441.
- Hummel S, Schultes T, Bramanti B, Herrmann B. Ancient DNA profiling by megaplex amplications. *Electrophoresis*. 1999; 20(8):1717-21.

- Hummel S. Ancient DNA Typing. Methods, Strategies and Applications. 1st Edition. 2003. Springer.
- Jehaes E, Decorte R, Peneau A, Petrie JH, Boiry PA, Gilissen A, et al. Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette. *Eur J Hum Genet.* 1998;6(4):383-95.
- Johnson KM, Paul KS. Bioarchaeology and Kinship: Integrating Theory, Social Relatedness, and Biology in Ancient Family Research. *J Archaeol Res.* 2016; 24(1):75-123.
- Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet.* 2017; 136(5):621-635
- Keyser-Tracqui C, Crubézy E, Ludes B. Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2,000-Year-Old Necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia, *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 73:247–260.
- Kimura M, Ohta T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(6):2868-72.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980. 16:111-120.
- Knapp M, Clarke A, Horsburgh K, Matisoo-Smith E. Setting the stage - building and working in an ancient DNA laboratory. *Ann Anat.* 2012; 20;194(1):3-6.
- Kontopoulos I, Penkman K, McAllister G, Lynnerup N, Damgaard P, Hansen H, et al. Petrous bone diagenesis: a multi-analytical approach. *Palaeo3.* 2019. 518: 143-154.
- Kruskal J. Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika.* 1964; 29: 115–129.
- Le Roy M, Rivollat M, Mendisco F, Pemonge MH, Coutelier C, Couture C, et al. Distinct ancestries for similar funerary practices? A GIS analysis comparing funerary, osteological and aDNA data from the Middle Neolithic necropolis Gurgy “Les Noisats” (Yonne, France). *J Archaeol Sci.* 2016; 73: 45-54.
- Lessig R, Thiele K., Edelmann, J. Tsunami 2004 - experiences, challenges and strategies. *Int Congr Ser,* 2006; 1288, 747–749.
- Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993; 362(6422), 709–715.
- Maguire CN, Woodward M. DNA-based Kinship Analysis. *Profiles in DNA.* 2008; 11 (1) 4-6.
- Mahony J, Chong S, Jang D, Luinstra K, Faught M, Dalby D, et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol.* 1998; 36, 3122–3126.
- Marshall P, Stoljarova M, Schmedes S, King J, Budowle J. A high volume extraction and purification method for recovering DNA from human bone. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014; 12: 155-160.

- Marshall C, Taylor R, Sturk-Andreaggi K, Barritt-Ross S, Berg G, McMahon T. Mitochondrial DNA haplogrouping to assist with the identification of unknown service members from the World War II Battle of Tarawa. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2020; 47: 102291.
- Martín P, Albizuri S, Còlliga A, Gibaja. Offerings, feasting, and psychopomps in the north-east of the Iberian Peninsula: the role of animals in the Bòbila Madurell (Sant Quirze del Vallès, Barcelona) funerary ritual (late fifth millennium–early fourth millennium cal BC). *Archaeol Anthropol Sci.* 2019; 11(12):6615-66-37.
- Masclans A, Duboscq S, Achino K, Morell B, Gibaja J. Looking for sexual differences during the middle Neolithic in the northeast of the Iberian Peninsula. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2019; 26: 101858.
- Maynes M, Waltner A. *The Family A World History (New Oxford World History)* 2012. New York: Oxford University Press.
- McCormick M. Towards a molecular history of the Justinianic Plague. *Plague and the End of Antiquity. The Pandemic of 541-750.* 2007. Cambridge University Press, Cambridge.
- McCormick M. Tracking mass death during the fall of Rome's empire (I). *J. Roman Archaeol.* 2015; 28: 325-357.
- McKusick VA. Advisory statement by the panel on DNA testing of Abraham Lincoln's tissue. *Caduceus.* 1991;7(1):43-7.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol.* 1997; 35, 995–998.
- Montes L, Domingo R, González-Sampéris P, Sebastián M, Aranbarri J, Castaños P, García-Simón L, Alcolea M, Laborda R. Landscape, resources and people during the Mesolithic and Neolithic times in NE Iberia: The Arba de Biel Basin. *Quat. Int.* 2016; 403: 133-150.
- Mulligan C. Anthropological Applications of Ancient DNA: Problems and Prospects. *Am Antiquity.* 2006; 71(2): 365-380.
- Obal M, Pajnič I, Pogorelc B, Zupanc T. Different skeletal elements as a source of DNA for genetic identification of Second World War victims. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2019; 7(1).
- Olaisen B, Stenersen M, Mevåg B. Identification by DNA analysis of the victims of the August 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. *Nat Genet.* 1997; 15(4): 402–405.
- Oms F, Terradas X, Morell B, Gibaja J. Mesolithic-Neolithic transition in the northeast of Iberia: Chronology and socioeconomic dynamics. *Quat. Int.* 2018; 470-B:383-397.
- Palomo A, Gibaja J, Ortega D, Alonso N, Marín D, Moya A. La industria lítica tallada del asentamiento de Minferri (Juneda, Lleida) a finales del III/primer mitad del II milenio cal.BC. *CYPSELA.* 2012. 19.
- Palomo – Díez S. Caracterización genética de las poblaciones de las Edades del Cobre y del Bronce de la submeseta norte de la Península Ibérica. Tesis de Doctorado. 2015. Universidad Complutense de Madrid.

- Palomo – Díez S, Gomes C, López-Parra AM, Baeza-Richer C, Cuscó I, Raffone C, et al. Genetic identification of Spanish civil war victims. The state of the art in Catalonia (Northeastern Spain). *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2019; 7(1), 419–421.
- Pasternak J. An introduction to human molecular genetics: mechanisms of inherited diseases. 2nd Edition. 2005. John Wiley and Sons.
- Pereira J. *Análise de Dados Qualitativos. Estratégias Metodológicas Para as Ciências da Saúde, Humanas e Sociais.* 1ª Edição. 2004. Edusp.
- Pereira R, Pereira V, Gomes I, Tomas C, Morling N, Amorim A, et al. A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. *Int J Legal Med.* 2011; 126(1), 97–105.
- Pereira R, Pereira V, Gomes I, Tomas C, Morling N, Amorim A, Prata MJ, et al. A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. *Int J Legal Med.* 2012;126(1):97-105.
- Phillips C, Prieto L, Fondevila M, Salas A, Gómez-Tato A, Álvarez-Dios J, et al. Ancestry Analysis in the 11-M Madrid Bomb Attack Investigation. *PLoS ONE.* 2009; 4(8), e6583.
- Phillips C. The Golden State Killer investigation and the nascent field of forensic genealogy. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018; 36: 186-188.
- Phua C, Hasap L, Thanakiatkrai P, Kitpipit T. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2019; 7(1): 607-608.
- Pilli E, Vai S, Caruso M, D'Errico G, Berti A, Caramelli D. Neither femur nor tooth: Petrous bone for identifying archaeological bone samples via forensic approach. *Forensic Sci Int.* 2018; 283:144-149.
- Pinheiro MF. *Genética Forense - Perspectivas da Identificação Genética.* 2010. Edições Univ. Fernando Pessoa.
- Pinto, N, Gusmão, L, Amorim, A. Distinguishing kinship from genealogical likelihoods. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2009; 2(1), 453–454.
- Pinto N, Gusmão L, Amorim A. X-chromosome markers in kinship testing: a generalisation of the IBD approach identifying situations where their contribution is crucial. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(1):27-32.
- Piqué R, Romero S, Palomo A, Tarrús J, Terradas X, Bogdanovic I. The production and use of cordage at the early Neolithic site of La Draga (Banyoles, Spain). *Quat. Int.* 2018; 468-B: 262-270.
- Prieto JL, Tortosa C, Bedate A, Segura L, Abenza JM, Mariscal de Gante M. C. et al. The 11 March 2004 Madrid terrorist attacks: the importance of the mortuary organisation for identification of victims. A critical review. *Int J Legal Med.* 2007; 121(6), 517–522.
- Pruvost M, Grange T; Geigl E. Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotechniques.* 2005; 38(4):569-75.
- Puig P, Barceló A, Lahoz R, Niubó À, Jiménez J, Soler-López M, et al. Genetic identification of a war-evacuated child in search of his own identity for more than seventy years. *Forensic Sci Int.* 2019; 298: 312-315.

- Revelles J, Burjachs F, Morera N, Barceló J, Berrocal A, López-Bultó O, et al. Use of space and site formation processes in a Neolithic lakeside settlement. Pollen and non-pollen palynomorphs spatial analysis in La Draga (Banyoles, NE Iberia). *J Archaeol Sci.* 2017;81:101–115.
- Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc.* 2007; 2(7):1756-62.
- Rohland N, Siedel H, Hofreiter M. A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Mol Ecol Resour.* 2010; 10(4):677-83.
- Roig J, Coll J, Gibaja J, Chambon P, Villar V, Ruiz J, et al. La necrópolis de Can Gambús-1 (Sabadell, Barcelona). Nuevos conocimientos sobre las prácticas funerarias durante el Neolítico medio en el Noreste de la Península Ibérica. *Trabajos de Prehistoria.* 2010; 67(1): 59-84.
- Roig J, Coll J. Esquelets humans en sitges, pous i abocadors als assentaments rurals i vilatges de l'Antiguitat Tardana de Catalunya (segles V-VIII): Evidències arqueològiques de la presència d'esclaus i serfs. *Actes del IV Congrés d'Arqueologia Medieval i Moderna a Catalunya.* Tarragona. 2011; 75-82.
- Roig J. Necrópolis de época visigoda, ajuares funerarios y depósitos humanos anómalos de los s. V-VIII en la Tarraconense oriental (Cataluña): ¿indicadores de «etnicidad» y/o nivel económico? e indicios arqueológicos de desigualdad y exclusión social. *Identidad y etnicidad en Hispania: propuestas teóricas y cultura material en los siglos V-VIII.* 2015: 333-394
- Rojo-Guerra M, García-Martínez de Lagrán I, Royo-Guillén J. The beginning of the Neolithic in the mid-Ebro valley and in Iberia's Inland (Northern and Southern submeseta), Spain. *Quat. Int.* 2018; 470-B: 398-438.
- Rothe J, Nagy M. Comparison of two silica-based extraction methods for DNA isolation from bones. *Leg Med (Tokyo).* 2016; 22:36-41.
- Rott A, Pääffgen B, Haas-Gebhard B, Peters J, Harbeck M. Family graves? The genetics of collective burials in early medieval southern Germany on trial. *J Archaeol Sci.* 2018; 92: 103–115.
- Roustaei K, Gratuze B. Eastward expansion of the Neolithic from the Zagros: Obsidian provenience from Sang-e Chakhmaq, a late 8th-early 7th millennia BCE Neolithic site in northeast Iran. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2020; 29: 101969.
- Rovira M, Barceló-Álvarez J, Oms X, Remolins G, Subirà M, Chambon P, et al. Tracing the chronology of neolithic pit and stone box burials in North-eastern Iberia. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2018; 19:491–504.
- Schroeder H, Margaryan A, Szmyt M, Theulot B, Włodarczak P, Rasmussen S, et al. Unraveling ancestry, kinship, and violence in a Late Neolithic mass grave. *P Natl Acad Sci USA.* 2019; 116 (22).
- Scudder N, Robertson J, Kelty S, Walsh S, McNevin D. An international consideration of a standards-based approach to forensic genetic genealogy. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2019; 7(1): 512-514.

- Shapiro R. Damage to DNA caused by hydrolysis. *Chromosome Damage and Repair*. 1981: 3–12.
- Shutler GG, Gagnon P, Verret G, Kalyn H, Korkosh, S., Johnston, E. et al. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J Forensic Sci*. 1999; 44, 623–626.
- Siriboonpiputtana T, Rinthachai T, Shotivaranon J, Peonim V, Rerkamnuaychoke B. Forensic genetic analysis of bone remain samples. *Forensic Sci Int*. 2018; 284:167-175.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*. 2003; 423, 825–837.
- Slatkin, M. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*. 1993; 47, 264–279.
- Snoeck C, Jones C, Pouncett J, Goderis S, Claeys P, Mattielli N, et al. Isotopic evidence for changing mobility and landscape use patterns between the Neolithic and Early Bronze Age in western Ireland. *J. Archaeol. Sci. Rep*. 2020; 30: 102214.
- Stojanowski C, Schillaci M. Phenotypic Approaches for Understanding Patterns of Intracemetery Biological Variation. *Am J Phys Anthropol*. 2006: 43. 49-88.
- Stone AC, Starrs JE, Stoneking M. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci*. 2001; 46(1):173-6.
- Syndercombe Court D. Forensic genealogy: Some serious concerns. *Forensic Sci. Int. Genet*. 2018; 36: 203-204.
- Szécsényi-Nagy A, Roth C, Brandt G, Rihuete-Herrada C, Tejedor-Rodríguez C, Held P, et al. The maternal genetic make-up of the Iberian Peninsula between the Neolithic and the Early Bronze Age. *Sci Rep*. 2017; 7, 15644.
- Szibor R. X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1(2):93-9.
- Tajima F, Nei M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol Biol Evol* 1984; 1:269-285.
- Tamarin R. *Principles of Genetics*. 6th Edition. 1998. W C B/McGraw-Hill.
- Tamura F, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 1993; 10:512-526.
- Thompson W, Ford S, Doom T, Raymer M, Krane D. Evaluating forensic DNA evidence: Essential elements of a competent defense review: Part 2. *The Champion*. 2003; 27 (16), 16-25.
- Thomson J, Clayton T, Cleary J, Gleeson M, Kennett D, Leonard M, et al. The effectiveness of forensic genealogy techniques in The united kingdom – an experimental assessment. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser*. 2019; 7(1):765-767.
- Tsai YL, Olson BH. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl Environ Microb*, 1992; 58(7): 2292–2295.

- Valera A, Žalaitė I, Maurer A, Grimes V, Silva A, Ribeiro S, et al. Addressing human mobility in Iberian Neolithic and Chalcolithic ditched enclosures: The case of Perdigões (South Portugal). *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2020; 30, 102264.
- Vigil-Escalera A. Comunidad política aldeana y exclusión. Una revisión de las formas de inhumación altomedievales (ss. V-VIII d.C.). *Reti Medievali Rivista.* 2013; 14(1), 1-42.
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(4):854–862.
- Wickenheiser R. Forensic genealogy, bioethics and the Golden State Killer case. *Forensic Science International: Synergy.* 2019; 1:114-125.
- Willerslev, E, Cooper A. “Ancient DNA”. *Proceedings of the Royal Society of London. Proc Biol Sci.* 2005; 272 (1558): 3–16.
- Winter-Schuh C, Kay Schmütz, Eberle N, Makarewicz C. Restricted pasturing of domesticated cattle at a Late Neolithic settlement in Central Germany. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2018; 22: 285-297.
- Worley F, Madgwick R, Pelling R, Marshall P, Evans J, Lamb A, et al. Understanding Middle Neolithic food and farming in and around the Stonehenge World Heritage Site: An integrated approach. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 2019; 26: 101838.
- Wright, S. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 1951; 15, 323–354.

Investigación de Parentesco Biológico en Muestras Críticas
Utilidad en casos de investigación Histórica, Antropológica y/o Forense

∞ **Material Suplementario**

❖ ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO

A: **Estudio Diacrónico**

1. Individuos utilizados para el análisis AMOVA:

c) Castilla la Mancha

❖ "CobBron": N=25

Individuos {I6630; I6629; I6628; I6626; I6622; I6617; I6613; I6612; I6610; I6609; I6608; I6605; I6604; I6596; I6588; I6587; I6585; I6584; I6543; I6539; I6475; I6472; I6471; I4247; I4245} (Olalde et al. 2018)

❖ "Mediev":N=8

Individuos {19UC; 20UC; 22UC; 23UC; 24UC; 27UC; 31I; 31II} (individuos del artículo 7)

❖ "Actual": N=50

Individuos {1827; 2794; 48; 2902; 2337; 1960; 3173; 3548; 277; 330; 2156; 318; 3282; 3589; 2940; 2561; 1496; 936; 2146; 2774; 2163; 2286; 3338; 846; 2331; 2416; 3445; 2414; 1321; 1702; 3251; 1451; 2176; 2217; 1366;; 2888; 131; 382; 577; 889; 1293; 1655; 1697; 1750; 2044; 2159; 2346; 2564; 2992; 3053} (Barral Arca et al., 2016)

d): Cataluña:

❖ "Neol":N=23

Individuos {543; 569; 1417; 1688; 1534; 150; 306; 265 ; 256; 583; 232; 246; 261; 1858; 1843; 252;1864} (estudio no publicado de Can Gambús-1, individuos publicados en el artículo 4)

❖ "CobBron":N=22

Individuos {1PC; 2PC; 3PC; 5213; 5264; 5307; 5310; 5312; 5338; 5339; 5349; 5352; I1553; I0826; I0825; I0823; I0263; I0262; I0261; I0260; I0258; I0257} (individuos incluidos en el artículo 6, individuos del estudio no publicado de Minferri; individuos de la Edad del Cobre publicados en Olalde et al. 2018).

❖ "Mediev":N=21

Individuos {3044 ; 2088; 3091; 3036; 3027; 3094; 3077; 3057; I-37; II-3; I-39; II-3; I-39; II-3; 370 ; 391; 94; 373; 381; 395; 254} (individuos incluidos en los estudios no publicados de Galligants y de Can Gambús Medieval)

❖ "Actual":N=50

Individuos {2427; 2989; 2272; 2551; 1640; 2092; 1799; 2706; 1914; 2601; 763; 1525; 2877; 2584; 1302; 1439; 1386; 377; 2757; 3337; 3353; 2836; 2185; 2578; 2475; 2841; 2933; 3054; 3269; 1781; 2020; 1851; 2993; 3115; 3546; 1668; 2965; 1569; 1861; 1330; 2031; 3285; 1675; 2074; 1874; 2375; 2751; 1767; 2636; 2996} Barral Arca et al., 2016)

B: Estudio sincrónico.

Se compararon los yacimientos estudiados en la presente tesis con todos los yacimientos del mismo periodo histórico presente en la base de datos AmtDB. En este caso concreto, no se especifican los individuos seleccionados de cada publicación, ya que se han analizados todos cuyas secuencias estaban en formato *.fa*.

a) Neolítico:

- ❖ "EspNOR": N=6 (Gonzalez-Fortes et al. 2019)
- ❖ "EspCANGAMB": N=17
- ❖ "Alem": N=19 (Haak et al. 2015, Lipson et al. 2017)
- ❖ " SCOTL": N=34 (Olalde et al. 2018)
- ❖ "UK_ENGL":N=14 (Olalde et al. 2018)

b) Cobre_ Bronce:

- ❖ "AlemOBKR": N=23 (Knipper et al. 2017)
- ❖ "AlemHUGO": N=9 (Knipper et al. 2017)
- ❖ "EspMINF": N=9
- ❖ "UkSCOT": N=22 (Olalde et al., 2018)
- ❖ "UkENG": N=78 (Olalde et al., 2018)
- ❖ "Portg": N=5 (Olalde et al., 2018)

- ❖ “Spain”: N=27 (Olalde et al., 2018)
- ❖ “Hung”: N=6 (Olalde et al., 2018)

c) Medieval

- ❖ "AlemAED": N=10 (Veeramah et al. 2018)
- ❖ "EspUCED": N=8
- ❖ "EspGALLIG": N=8
- ❖ "EspCANGAMB": N=13
- ❖ "ItCL": N=16 (Amorim et al. 2018)
- ❖ "ItLICOL": N=23 (Vai et al. 2019)

❖ DISCUSIÓN

OBJETIVO 2.

Figura Mat.Sup.1.

A: Localización de las falanges proximales (color verde)

(Fuente: www.kenhub.com, Human Anatomy)



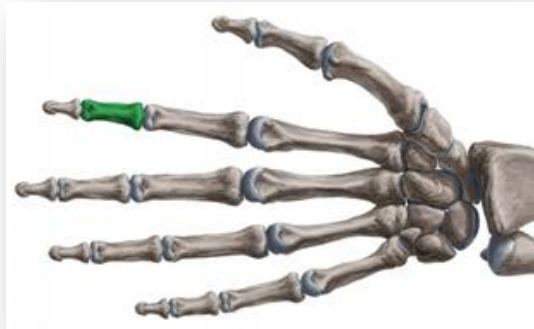
B: Falange proximal estudiada, publicada en el **artículo 8.**



Figura Mat.Sup.2.

A: Localización de las falanges medias (color verde)

(Fuente: www.kenhub.com, Human Anatomy)



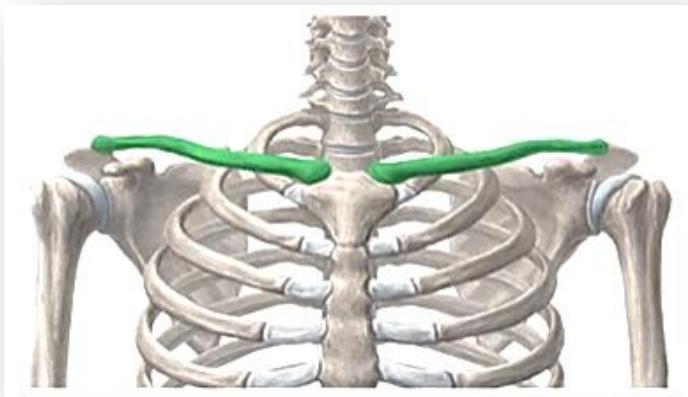
B: Falanges medias estudiadas, publicadas en el **artículo 8.**



Figura Mat.Sup.3.

A: Localización de la clavícula (color verde)

(Fuente: www.kenhub.com, Human Anatomy)

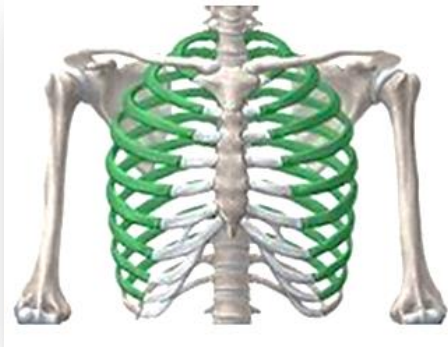


B: Clavícula estudiada en el **artículo 5**



Figura Mat.Sup.4.

A: Localización de las costillas (color verde)
(Fuente: www.kenhub.com, Human Anatomy)



B: Costilla estudiada en el artículo 5.



Figura Mat.Sup.5.

A: Localización de las vértebras y tibia (color verde)
(Fuente: www.kenhub.com, Human Anatomy)



B: posible vertebra y tibia estudiadas en los artículos 6 y 7.



OBJETIVO 10.

Figura Mat.Sup.6. Localización de los tres yacimientos neolíticos analizados (El Llord (Lleida, España), Can Gambús-1(Sabadell, España) y La Feixa de Moro (Juberri, Andorra)). Fuente: *Google maps*.

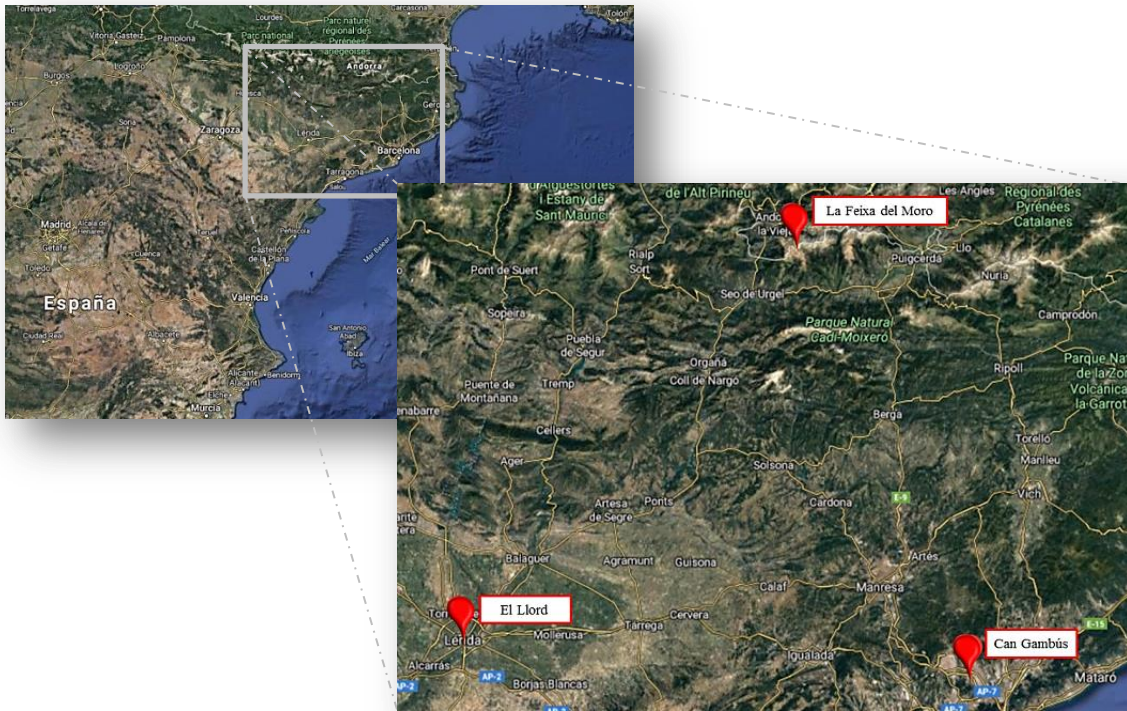
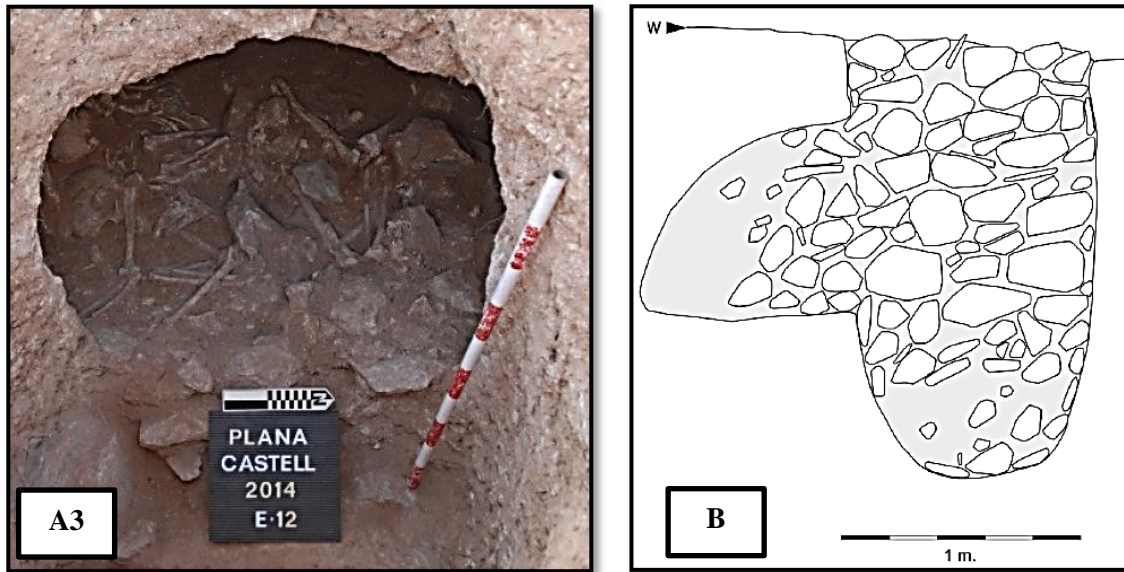


Figura Mat.Sup. 7. Yacimiento arqueológico de Plana del Castell (Cerdanyola del Vallès (Vallès Occidental, Barcelona, España), estudiado en el artículo 2. A1, A2 y A3- Entrada del hipogeo funerario; B- Esquema del enterramiento en perspectiva, donde se visualiza la fosa anexa.





C- Esquema de la disposición de los individuos documentados (**artículo 2**). Se han estudiado los individuos 1 (1PC, en el Artículo 6), 2 (2PC) y A (3PC). Fuente: Guardiola et al., 2017.

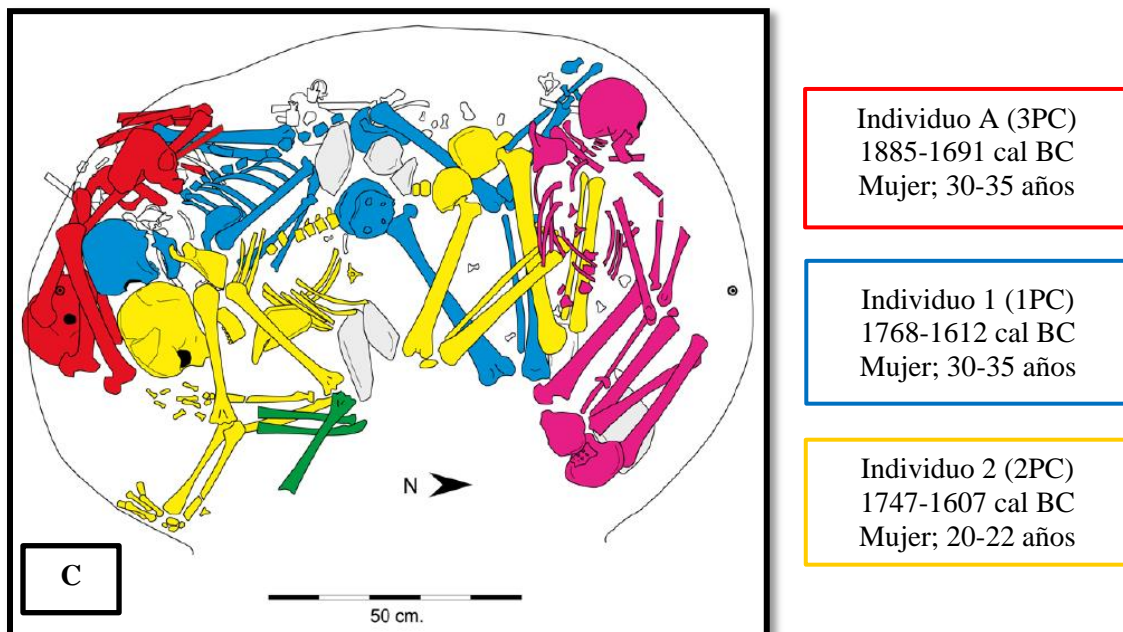


Figura Mat.Sup. 8. Localización del yacimiento arqueológico de Minferri (Juneda, Lleida, Cataluña, España) y Plana del Castell (Cerdanyola del Vallès (Vallès Occidental, Barcelona, España). Fuente: Google maps.

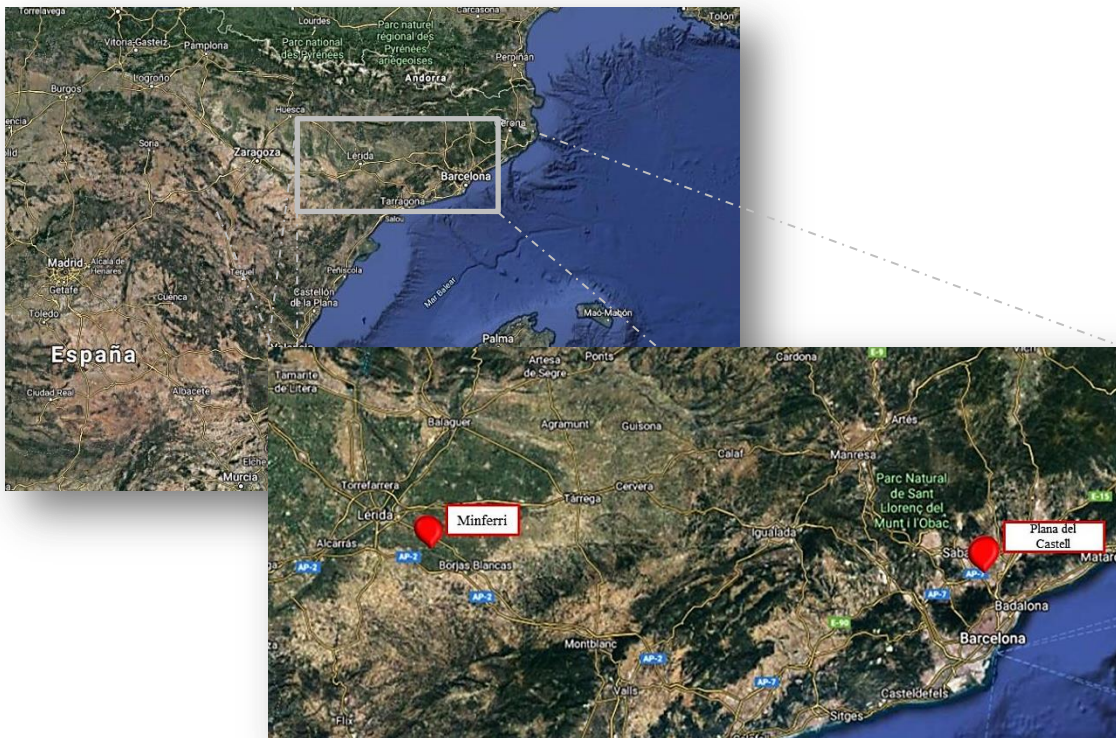


Figura Mat.Sup. 9. Localización del yacimiento arqueológico de Galliaents (Girona, Cataluña, España). Fuente: Google maps.

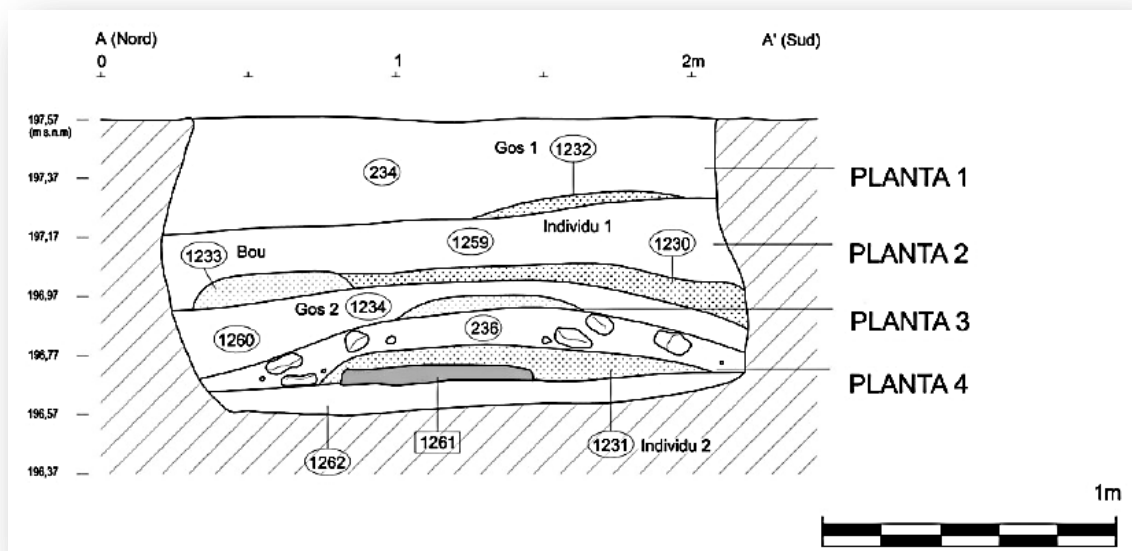


Figura Mat.Sup.10. Localización del yacimiento arqueológico de Can Gambús-1 (Sabadel, Cataluña, España). Fuente: Google maps.



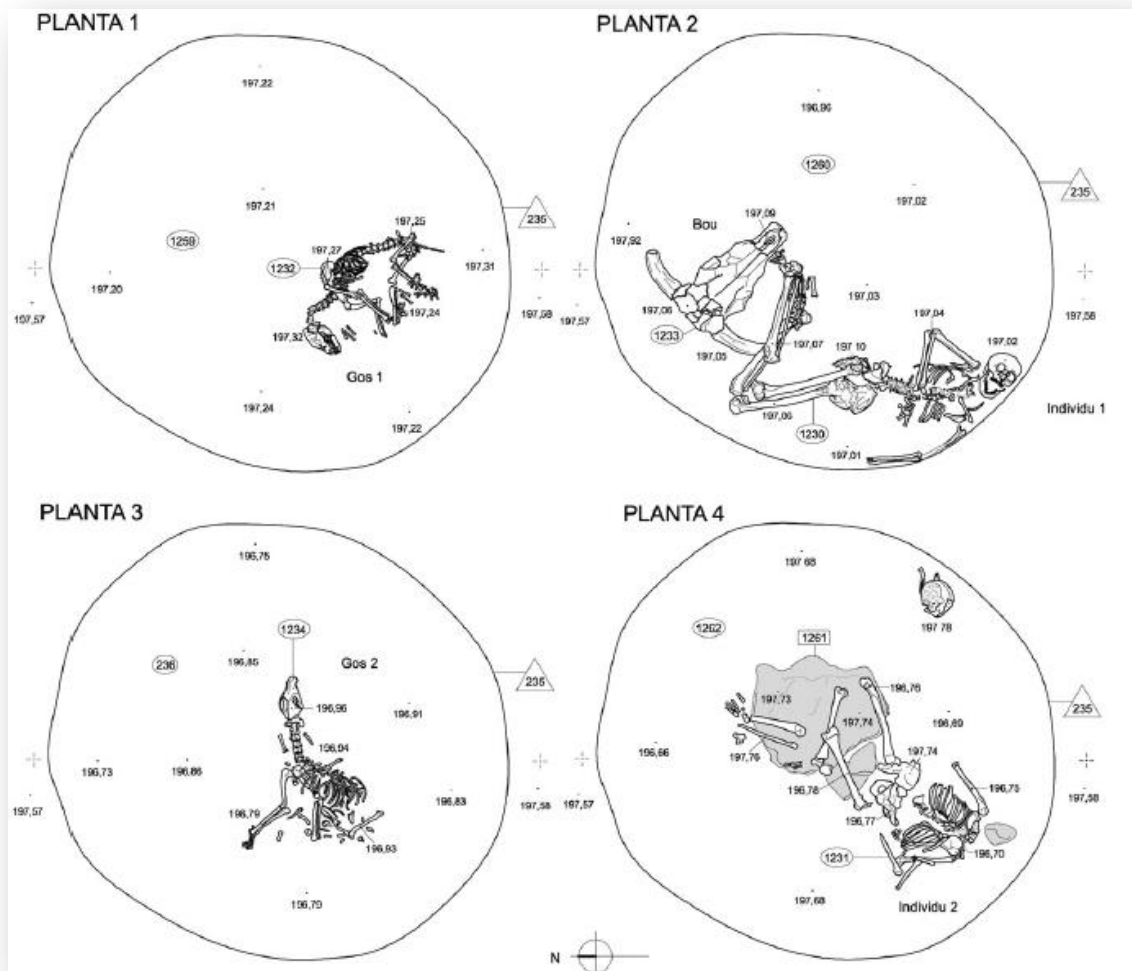
Figura Mat.Sup.11. Posición del individuo E94 en el pozo.

A: Visualización esquemática del pozo donde se encuentra el individuo E94. Fuente: Roig et al., 2011.



B: Visualización esquemática del pozo donde se encuentra el individuo E94.

Fuente: Roig et al., 2011.

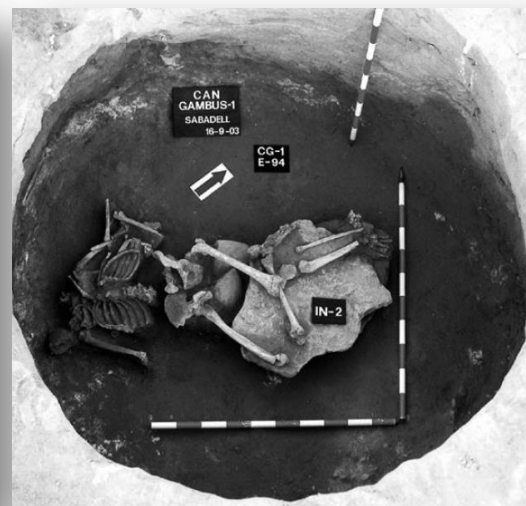
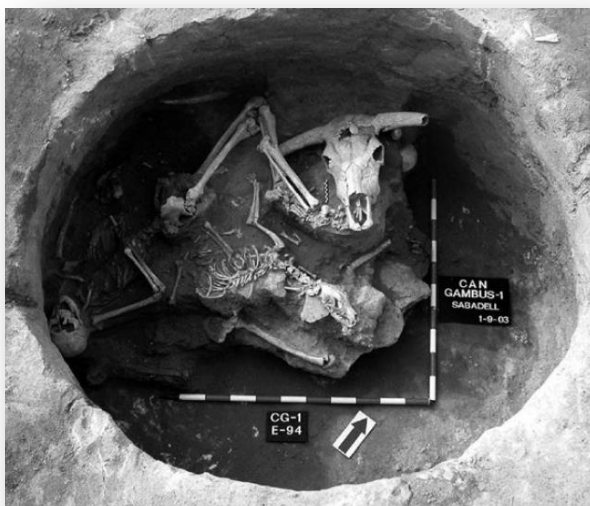


C1: Silo E94 con el individuo 1, el cráneo de buey y el perro.

Fuente: Jordi Roig i Joan M. Coll, 2008

C2: Silo E94 con el individuo 2, lanzado al fondo del pozo.

Fuente: Jordi Roig i Joan M. Coll, 2008



C3: Vista del individuo E374-I lanzado boca abajo dentro del pozo.

Fuente: Jordi Roig i Joan M. Coll, 2008

C4: Vista del individuo E374-II lanzado dentro del pozo junto con dos perros

Fuente: Jordi Roig i Joan M. Coll, 2008



Figura Mat.Sup.12. Localización del yacimiento arqueológico de Uceda (Castilla la Mancha, España).

Fuente: Google maps.



Referencias bibliográficas del Material Suplementario:

- Amorim C, Vai S, Posth C, Modi A, Koncz I, Hakenbeck S, et al. Understanding 6th-century barbarian social organization and migration through paleogenomics *Nat Commun.* 2018; 9- 3547.
- González-Fortes G, Tassi F, Trucchi E, Henneberger K, Paijmans J, Díez-del-Molino D, et al. A western route of prehistoric human migration from Africa into the Iberian Peninsula. *P ROY SOC B-BIOL SCI.* 2019; 286(1895), 20182288.
- Haak W, Lazaridis I, Patterson N, Rohland N, Mallick S, Llamas B, et al. Massive migration from the steppe was a source for Indo-European languages in Europe. *Nature.* 2015; 522(7555), 207–211.
- Knipper C, Mittnik A, Massy K, Kocumaka C, Kucukkalipci I, Maus M, et al. Female exogamy and gene pool diversification at the transition from the Final Neolithic to the Early Bronze Age in central Europe. *P Natl Acad Sci.* 2017; 114 (38) 10083-10088.
- Lipson M, Szécsényi-Nagy A, Mallick S, Pósa A, Stégmár B, Keerl V, et al. Parallel palaeogenomic transects reveal complex genetic history of early European farmers. *Nature.* 2017; 551(7680), 368–372.
- Olalde I, Brace S, Allentoft M, Armit I, Kristiansen K, Booth T, et al. The Beaker phenomenon and the genomic transformation of northwest Europe. *Nature.* 2018; 555(7695), 190–196.
- Vai S, Brunelli A, Modi A, Tassi F, Vergata C, Pilli E, et al. A genetic perspective on Longobard-Era migrations. *Eur J Hum Genet.* 2019; 27: 647–656.
- Veeramah K, Rott A, Groß M, van Dorp L, López S, Kirsanow K, et al. Population genomic analysis of elongated skulls reveals extensive female-biased immigration in Early Medieval Bavaria. *P Natl Acad Sci.* 2018; 115 (13) 3494-349.



Cláudia F. Lopes Gomes

Madrid, 2020

