



## Artículo de revisión

# ADN antiguo y diversidad genética de *Homo neanderthalensis*

## Ancient DNA and genetic diversity of *Homo neanderthalensis*

Víctor F. Vásquez Sánchez<sup>1</sup> y Teresa Rosales Tham<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doctorando en Biología Celular y Genética. Universidad Autónoma de Madrid, España. <sup>2</sup>Laboratorio de Arqueobiología de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

### INTRODUCCIÓN

La nueva tecnología del ADN antiguo ha permitido desde hace 25 años, ir conociendo nuevos aspectos en la evolución de especies animales y vegetales. Uno de estos aspectos que ha ido develando las investigaciones con ADN antiguo, han sido aquellos relacionados con la evolución de la especie humana, en forma especial de un homínido que vivió en Europa hace medio millón de años, los neandertales.

Antes del uso de las poderosas herramientas de la genética y en especial del ADN antiguo, los aspectos evolutivos de diversas especies, se trataban básicamente desde el aspecto morfológico. Sin embargo ya sabemos que no podemos clarificar nuestra evolución estudiando únicamente el aspecto externo de los fósiles, sencillamente porque la cantidad de variación morfológica no es un indicador claro del tiempo evolutivo; pero la variación genética si lo es.

En este trabajo de revisión, tratamos de presentar de manera ordenada, todos los eventos y sucesos que han ocurrido con el estudio del ADN antiguo sobre restos óseos de neandertales, de seis localidades europeas. En total se discuten las evidencias de los nueve neandertales más citados en la literatura científica, y se presenta la información molecular, cronológica y geográfica, para poder entender este proceso evolutivo que empezó hace medio millón de años.

La importancia de esta revisión radica en presentar datos actualizados e interpretados desde la perspectiva cultural, tecnológica, cronológica, evolutiva, de la información molecular que proporciona el ADN antiguo en el conocimiento de un homínido cuyas poblaciones se extinguieron hace 30.000 años.

### ADN antiguo

ADN antiguo es definido como una masa o traza de ADN de un organismo muerto o partes de él, así como ADN extracorpóreo de organismos vivos, es decir se trata de ADN que esta sujeto a procesos autolíticos o diagenéticos<sup>8</sup>.

Por lo tanto, el termino ADN antiguo no esta estrictamente limitado a moléculas obtenidas de especímenes biológicos de cientos o miles de años de antigüedad, sino también a aquellas que están sujetas a procesos de degradación autolítica y biológicas, donde no hay la posibilidad de procesos de reparación, como ocurre en las células vivas.

Este tipo de ADN, como cualquier otra molécula orgánica, sufre un proceso inexorable de degradación con el tiempo tras la muerte de los organismos biológicos que lo portan. Sin embargo, las condiciones medioambientales pueden acelerar o retrasar muy

significativamente dicho proceso natural de biodegradación, contribuyendo así con posibilidades para mejorar su estudio.

Los restos antiguos de origen orgánico (especialmente restos animales y vegetales) pueden ser ahora analizados en el nivel molecular con las modernas tecnologías. Esto ha promovido el nacimiento de un nuevo campo de investigación usualmente conocido como *ADN antiguo*.

Los recientes desarrollos de la biología molecular, seguidos del desarrollo de nuevos enfoques para el estudio de macromoléculas de restos antiguos, hacen posible ahora los análisis genéticos del ADN antiguo aislado de fósiles, restos sub-fósiles, especímenes biológicos de museos, etc. con límites de edades que han sido calculadas en 100.000 años<sup>2</sup> a 130.000 años<sup>6</sup>.

El ADN de muestras antiguas, una vez ha sido extraído, no puede ser apropiadamente amplificado y analizado con metodologías comunes, porque estas moléculas están muy fragmentadas y químicamente alteradas, para lo cual se han innovado las tecnologías comunes y se han adecuado hacia una nueva tecnología aplicada al ADN antiguo.

Con la muerte de un organismo vivo, las enzimas inician la descomposición de sustancias orgánicas del cuerpo. Usualmente esta primera fase de descomposición es seguida por el decaimiento de tejidos blandos bajo la actividad de microorganismos (principalmente bacterias y hongos). En estados avanzados también pueden estar implicados organismos superiores tales como insectos y vertebrados. Este proceso lleva regularmente a la completa desaparición de los tejidos blandos; sólo persisten los elementos inorgánicos (exo o endoesqueleto y apéndices queratinosos como pelo y plumas).

En contraste con los tejidos blandos, las estructuras orgánicas en huesos y dientes persisten bajo condiciones normales de entierro. Esto puede ser explicado por la comparativa baja cantidad de agua y enzimas líticas en los tejidos duros. Sin embargo, una pregunta que surge de todo esto es: ¿cómo es posible que el ADN con varios miles de años de antigüedad se conserve de tal modo que pueda ser utilizado en nuestros análisis?

Es posible que estas reacciones han sido anuladas o disminuidas en gran medida en las muestras sub-fósiles conservadas en ambientes polares (mamut de hace 40.000 años encontrado en Siberia) y en ambientes desérticos (esqueletos humanos y semillas en sitios arqueológicos de la costa del Perú y de Egipto). En estos últimos ambientes la resistencia a la desnaturalización del ADN se debe a la deshidratación del material genético que reduce los ataques hidrolíticos. Todo ello, unido a la acción de las proteínas de unión ("*binding proteins*") y a posibles cambios en la configuración del ADN, puede permitir un mayor grado de conservación.

Son estas particulares condiciones en esta macromolécula, las que permiten el estudio del ADN antiguo, y ofrecen la posibilidad de investigar los cambios producidos en el material genético en el pasado, por incluso hasta 60.000 años, tal como lo demuestra el estudio sobre restos de neandertales<sup>5</sup> y así contribuir en el entendimiento de la evolución de las especies.

En los últimos 10 años los estudios de ADN antiguo en restos óseos de neandertales, ha permitido generar un volumen de información importante para el conocimiento de esta especie de homínido, sus características, diversidad genética, aspectos e incluso el grado de hibridación que tuvieron en algún momento de la evolución con los modernos humanos, antes de su extinción.

### **¿Quiénes fueron los Neandertales?**

El continente africano, ha sido siempre considerado como la cuna de la humanidad, y ahí surgieron los australopitecinos y formas afines, que fueron los primeros representantes de la familia *Hominidae*, hace aproximadamente unos cinco a seis millones de años<sup>9</sup>.

En diferentes momentos de la historia evolutiva humana, África ha sido una especie de bomba demográfica, de donde han ido saliendo diferentes especies de humanos, a diversas zonas periféricas de Europa y Asia, las cuales coincidían con períodos climáticos cálidos. Estas sucesivas salidas, tuvieron diferentes características, sugiriéndose que los primeros

*Homo* que salieron de África no fueron los más evolucionados, por el contrario llevaban consigo una industria lítica primitiva, que la que existía en aquel momento en diversas áreas de África, a diferencia de la última salida de África, donde los individuos humanos, presentaban grandes habilidades, que en pocos miles de años dejarían representaciones pictóricas en Europa, las cuales no pudieron encontrarse en su continente de origen<sup>4</sup>.

Según el registro fósil del género *Homo*, hace 1,4 millones de años, aparece en África una nueva industria lítica más evolucionada que la *oldowayense*, la cual fue denominada como *achelense*. Los útiles característicos de esta industria es el hacha de mano, en cuyo diseño se ha pensado utilizarla para descuartizar grandes presas. Estas hachas se expandieron por África, Europa y Asia, y mantuvieron inalteradas en su diseño durante un millón de años.

Este tipo de herramientas, indicaban que aquellos homínidos que lo utilizaban, estaban más adaptados para ser cazadores activos, a diferencia de sus predecesores carroñeros y herbívoros, lo que indicaba que tenían otro tipo de dieta, característica reflejada en la reducción del tamaño de los dientes, adaptación que indicaba que este nuevo homínido mordía y trituraba su comida.

El nuevo homínido que utilizó este tipo de herramientas y practicaba la cacería de animales, es conocido como *Homo ergaster*. Esta especie estaba diseñada para una vida activa en la sabana, y tenía una actividad craneana un poco por debajo de 1000 cc, y fue capaz de expandirse con éxito fuera de África.

Después de su salida de África, se han reportado evidencias de su presencia en el sudeste asiático, en la isla de Java, las cuales fueron denominadas como *Homo erectus*, pero en su aspecto son muy parecidas a las formas africanas, aunque algunos cráneos son notablemente más robustos. Es posible que esta característica sea debido a que Java actuó como una especie de callejón sin salida evolutivo.

Posterior a *Homo erectus*, es probable que hubieran sucesivas salidas de África en períodos subsiguientes. A partir de 500.000 años y hasta la consolidación de la morfología neandertal, se han reportado en Europa un grupo de fósiles heterogéneo y de mayor capacidad craneana (1100 cc a 1300 cc), clasificados como *Homo heidelbergensis*. Estos fósiles europeos presentan una mezcla de rasgos similares a los de los anteriores *Homo erectus*, como la fuerte robustez de algunas estructuras craneales, y de rasgos que anuncian a los posteriores neandertales.

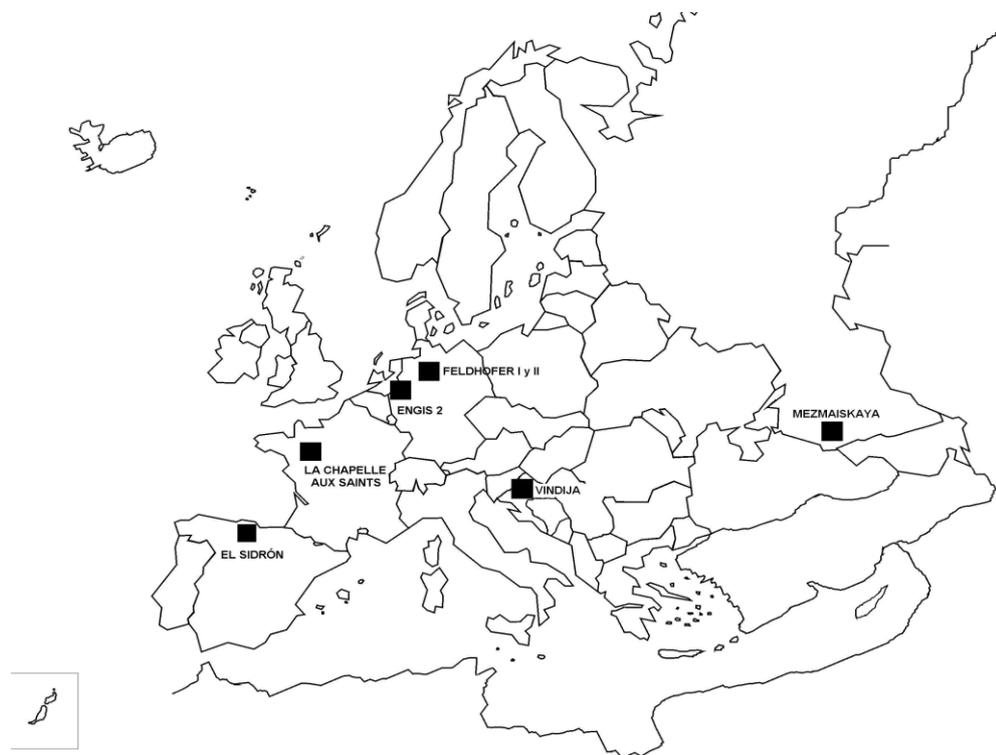
Estas poblaciones locales europeas de *Homo heidelbergensis* evolucionaron a ritmos diferentes, sometidas a condiciones climáticas que se fueron deteriorando progresivamente en Europa, y aisladas de las poblaciones africanas, que seguían otro camino evolutivo. Así a lo largo de la segunda mitad del Pleistoceno medio europeo, a partir de estas primeras poblaciones europeas y producto de un largo proceso evolutivo y aislamiento geográfico, aparecen en el escenario de la historia de la humanidad, un nuevo linaje humano conocido como *Homo neanderthalensis*, con todas las características que definen a los neandertales clásicos.

Por lo tanto los neandertales corresponden a una línea evolutiva específicamente europea, aunque su expansión geográfica llegase más allá de los límites del continente europeo, hasta el Próximo Oriente y Asia Central<sup>4</sup>. Datos moleculares sugieren que las primeras formas de Neandertal y de *Homo heidelbergensis*, se separaron poco después de hace 500.000 años<sup>1</sup>.

El fósil más conocido y que da el nombre a este grupo de homínidos, fue descubierto de forma casual en agosto de 1856 en la gruta de Feldhofer, cerca de Düsseldorf (Alemania), en el valle de Neander (Neander Thal en el lenguaje alemán antiguo). Posteriormente y con el hallazgo de los fósiles de Spy (Bélgica), en 1886, los restos de los neandertales fueron reconocidos como un nuevo complejo morfológico especializado, el neandertal.

A partir de 230.000 años, todos los restos que son hallados en Europa, son exclusivamente neandertales, y a finales del siglo XIX los fósiles de neandertales ya eran generalmente considerados como representantes de una especie humana extinguida. A partir de estas fechas no sólo hay neandertales en el límite geográfico de Europa, su distribución se extiende hasta Oriente Próximo y Medio, donde se han encontrado en

Israel, Siria e Irak, y también el oeste de Asia, en Uzbekistán, donde se encontró un esqueleto infantil, denominado Teshik-Tash<sup>9</sup> (Figura N° 1).



**Fig. 1.** Distribución geográfica de los principales sitios de Europa y Oriente Próximo con sitios neandertales.

Por otro lado, alrededor de 250.000 años apareció en África una industria lítica diferente, que poco a poco sustituye a la *achelense*, esta nueva industria lítica se conoce como *musteriense*. Esta tradición tecnológica se basa en la obtención final de un útil muy afilado y de forma triangular, el cual se constituiría como el símbolo tecnológico de los neandertales hasta su desaparición.

Los neandertales permanecieron en Europa como sus habitantes exclusivos durante 200.000 años, sobreviviendo a varios máximos glaciares y a períodos de gran inestabilidad climática, hasta que hace 40.000 años, empezaron a llegar otros grupos de África, los humanos modernos o cromañones, con lo cual el nuevo escenario comenzaría a cambiar la historia de los neandertales y su desenlace final.

### **Diversidad Genética de los Neandertales**

Hasta el año 1987, los estudios de la evolución humana estaban limitados a los análisis de los restos óseos, como evidencias del proceso evolutivo. Con el desarrollo de las técnicas genético-moleculares, y en especial con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), se abrió una nueva disciplina para el análisis de estos restos, la genética y una en especial, el ADN antiguo.

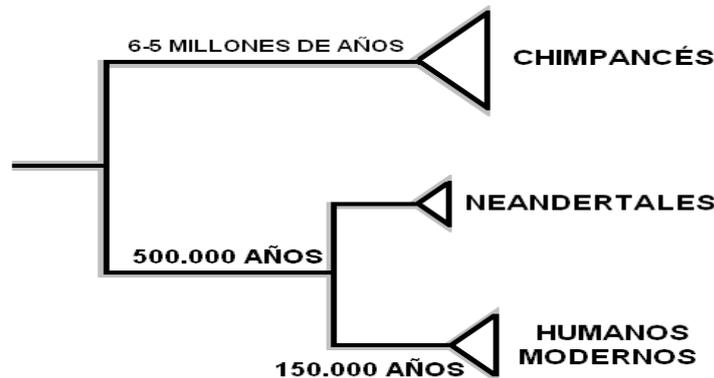
Nuestros genes provienen de progenitores, y así generación tras generación. Esto implica, que si analizamos la variación genética de las poblaciones actuales, podremos inferir cómo se han generado estas variaciones y cuales son sus orígenes. Se trata de una inferencia compleja, porque hay diversos procesos evolutivos y demográficos que pueden modelar y

modificar esta variación, siendo que las poblaciones se pueden expandir, contraer, mezclar o fragmentarse.

Pero tenemos la ventaja que el genotipaje de los humanos modernos es absolutamente objetivo y nos informa del genotipo, de la variación genética no influida por factores externos, como el clima o la dieta, que en cambio si influyen en la morfología y el aspecto externo de los individuos. En este contexto, nuestro material genético es en realidad un fósil químico que conserva la información de nuestros antepasados, lo que implica que cuando secuenciamos un gen, estamos contemplando algo que nos informa del pasado, al igual que una herramienta de piedra o un esqueleto fosilizado.

En el mismo año de 1987, un equipo de Alan Wilson, estudia el ADN mitocondrial de una muestra de mujeres modernas, para intentar comprender el origen de nuestra especie. Los resultados del estudio indicaron que nuestra especie, a pesar de la gran dispersión geográfica y de su gran variación física externa, era extraordinariamente homogénea desde un punto de vista genético<sup>15</sup>. Comparando esta información con nuestro pariente vivo más cercano, el chimpancé, este presenta mas variación en su ADN mitocondrial, incluso hasta diez veces más.

El motivo de esta baja diversidad, era que sencillamente nuestra especie era mucho más reciente en el tiempo de lo que se creía previamente. Los chimpancés se separaron del linaje humano hace aproximadamente seis millones de años, durante los cuales han ido acumulando mutaciones en su ADN mitocondrial y no han sufrido grandes bajas demográficas, lo cual hubiera disminuido su diversidad. Por el contrario, *Homo sapiens* surgió en África hace aproximadamente 200.000 años, a partir de un grupo relativamente pequeño de individuos que posteriormente ha ido aumentando hasta alcanzar los 6.000 millones de hombres modernos (Figura N° 2).



**Fig. 2.** Árbol filogenético que muestra la relación evolutiva entre los chimpancés, los neandertales y los humanos modernos.

Esta variación actual se remonta a hace sólo unos miles de años, lo cual significa que estas poblaciones modernas fueron sustituyendo a las poblaciones arcaicas locales de Eurasia, que eran mucho más antiguas. Si no se hubieran reemplazado y hubiera ocurrido una mezcla con ellas (hipótesis multiregional o de continuidad regional), la variación genética que encontraríamos en la humanidad actual en los diferentes continentes debería remontarse hasta hace un millón de años o más.

Los neandertales fueron los primeros humanos que habitaron Europa, pero también en el sudeste de Asia había también otras poblaciones arcaicas, probablemente derivadas de los lejanos *Homo erectus* que salieron de África hace casi dos millones de años.

La historia de los estudios genéticos a partir de restos fósiles de neandertales, comienza en 1997, en este año se logra por primera vez, la recuperación de ADN mitocondrial a partir de huesos del valle de Neander en el sitio de Feldhofer, recuperados en 1856<sup>7</sup>.

El análisis preliminar de un fragmento de húmero de neandertal de Feldhofer, reveló que el índice de racemización del ácido aspártico era de 0,11, muy cerca del valor de 0,10 que

se ha establecido como indicador límite de conservación hipotética del ADN antiguo, y lejos del valor 0,50 en el cual se llega a un equilibrio por degradación completa de los aminoácidos.

Obviamente y hasta antes de realizar estos estudios, no se conocía como era la secuencia de ADN de neandertal, y únicamente se disponía de información sobre las secuencias actuales de humanos modernos (Secuencia de Referencia Moderna de la Universidad de Cambridge). Por lo tanto para estos estudios se utilizaron cebadores de la región control del ADN mitocondrial humano, basados en la secuencia de referencia, y así obtener productos de la PCR. Estos fueron clonados y secuenciados, obteniéndose un patrón de secuencias característico, muy diferentes a las secuencias actuales.

Las cuatro amplificaciones realizadas (PCR1-PCR2-PCR3-PCR4) y sus diferentes clones obtenidas, fueron clonadas en bacterias y secuenciadas entre las posiciones 16219 y 16279 de la secuencia de referencia. Los resultados indicaron dos patrones de secuencias, uno mayoritario y uno minoritario. Las secuencias minoritarias son parecidas entre si y completamente diferentes de las mayoritarias; al mismo tiempo, son secuencias que pueden encontrarse entre los humanos modernos.

El análisis de las secuencias mayoritarias indicaba que se trataban de secuencias desconocidas entre los humanos actuales, diferenciándose de las de referencia en ocho cambios en un segmento de sólo 60 nucleótidos, incluyendo la inserción de una adenina entre la timina de la posición 16263 y la citosina de la posición 16264, no descrita en humanos actuales. En conclusión, las secuencias mayoritarias pertenecían al ADN original de la muestra de neandertal, mientras que las minoritarias correspondían al ADN de algunos de los centenares de investigadores que estudiaron y manipularon los restos durante 150 años<sup>9</sup>.

La evidencia de que las secuencias mayoritarias aparezcan reiterativamente en amplificaciones diferentes apoya la autenticidad del ADN neandertal, porque si estas fueran contaminaciones o artefactos, no esperaríamos que éstas se reprodujeran sistemáticamente en diferentes amplificaciones. Por otro lado estos resultados fueron confirmados con una replicación independiente en un laboratorio de Pensilvania con un fragmento de la misma secuencia de PCR4 y a partir de un fragmento del mismo hueso.

Los investigadores de Pensilvania tuvieron la ventaja, que a partir de las secuencias obtenidas por Krings sobre el ADN neandertal, diseñar cebadores específicos para neandertal, lo cual suponía obtener productos mayoritariamente neandertal. Las interpretaciones de estos resultados indicaban que en el nivel cuantitativo, la secuencia de neandertal es muy diferente de los humanos actuales, y en el nivel cualitativo, teniendo en cuenta la dimensión genealógica, se observaba que era diferente de cualquier otra, pero que tendía a compartir algunas posiciones con algunas secuencias africanas; por el contrario, era radicalmente diferente de las coetáneas secuencias europeas. Esto concuerda con la teoría fuera de África, puesto que, si los neandertales eran un linaje paralelo al de los cromañones, ambos tenían que tener un origen común ancestral en África.

Con estas secuencias se obtuvo un árbol filogenético donde se pudo estimar los dos linajes genéticos (neandertales y humanos modernos), donde se refleja una antigüedad cercana a medio millón de años de divergencia evolutiva entre neandertales y humanos modernos (Figura N° 2). Esta fecha encaja bien con lo que se observa en el registro fósil europeo. La conclusión final del estudio de Krings, era que los neandertales no habían contribuido con ADN mitocondrial a los humanos antes de extinguirse<sup>7</sup>.

El segundo individuo neandertal que fue estudiado mediante su ADN antiguo, fueron los restos de un neandertal recién nacido, descubierto en la cueva de Mezmaiskaya, en el Cáucaso. El niño neandertal de Mezmaiskaya no había completado la formación de la corona dentaria de su segundo molar de leche, y por tanto, indicaba que debía tratarse de un feto de unos siete meses o de un recién nacido de dos meses como máximo. Los fechados radiocarbónicos sobre el colágeno de los huesos, indicaban 29.195 años antes del presente, lo que implicaba que se trataba de los últimos neandertales.

El estudio molecular se hizo a partir de dos pequeños fragmentos de costilla, de los cuales se pudieron recuperar 345 nucleótidos de la región control del ADN mitocondrial. La

secuencia obtenida no era exactamente similar a la de Feldhofer, lo cual era lógico, si tenemos en cuenta que ambos neandertales distaban uno de otro en más de 2.500 km y estaban probablemente separados en el tiempo por algunos miles de años.

El ADN antiguo del neandertal de Mezmaiskaya difería con la secuencia de referencia humana en 22 nucleótidos y con la de Feldhofer en 12 nucleótidos, lo que representa un 3,48% de divergencia del neandertal de Feldhofer, y los cambios de ADN con más significado filogenético, que no habían sido descritas en secuencias humanas modernas, pero seguían manteniéndose en el ADN del neandertal de Mezmaiskaya.

Lo más notable de estas sustituciones exclusivamente neandertales seguía siendo la típica inserción de una adenina después de la posición de referencia 16263, y el análisis filogenético situaba a los dos neandertales (Feldhofer y Mezmaiskaya) en un clado muy diferente a los modernos humanos, sugiriendo nuevamente que su ADN mitocondrial no había contribuido en el *pool* del ADN mitocondrial humano<sup>11</sup>.

La diversidad de restos de los neandertales, sigue aumentando con el hallazgo de restos fragmentarios en el sitio de Vindija, en Croacia. Los restos óseos estaban muy fragmentados, y muestran señales de golpes, fracturas y cortes. Están datados entre 100.000 y 120.000 años, consistiendo en al menos seis individuos. Las marcas de los cortes corresponden a manipulaciones llevadas a cabo para desmembrar los cuerpos, separar la carne de los huesos y acceder a la médula y al cerebro.

Un fragmento de húmero de un neandertal de Vindija datado en 42.000 años, fue sometido a estudios de su ADN antiguo, del cual se pudo recuperar 357 nucleótidos de la región hipervariable 1 del ADN mitocondrial y 288 nucleótidos de la región 2. La secuencia de nucleótidos del tercer neandertal en Vindija, era muy parecida a los otros dos neandertales (Feldhofer y Mezmaiskaya). Vindija difería de Feldhofer en nueve nucleótidos, y con respecto a Mezmaiskaya, en siete nucleótidos.

Este hecho de disponer de tres secuencias llevó a empezar a estimar la diversidad genética neandertal. La diversidad como concepto relativo, significa que para proponer que un grupo, una población o una especie es muy o poco diversa, debemos tener algo con que compararla. En este caso se hizo una comparación de los tres neandertales disponibles, 5.530 humanos modernos, 359 chimpancés y 28 gorilas. El valor obtenido para los tres neandertales fue de 3,73%. Mucho menor que para los chimpancés (14,82%) y para los gorilas (18,57%).

Esto implicaba que los neandertales eran un grupo genéticamente muy homogéneo, semejante en este aspecto a los humanos modernos, y que difícilmente se podría encontrar una secuencia neandertal tan diferente a las ya existentes como para que pueda semejarse más a una secuencia moderna. Aunque en ese momento solo había tres secuencias de ADN neandertal, las muestras de donde provenían los restos, estaban muy dispersas por el continente y separadas por miles de años<sup>3</sup>.

Un cuarto neandertal es hallado nuevamente en Feldhofer, denominándose Feldhofer 2. Se trataba de 24 fragmentos óseos, un fragmento de fémur izquierdo, encajaba bien en el hueso de Feldhofer 1. La datación cronológica de ambas muestras dieron fechas muy parecidas, en aproximadamente 40.000 años.

Las secuencias obtenidas del ADN de Feldhofer 2, es muy parecida a las anteriores muestras, y se diferencia únicamente por un nucleótido de la secuencia de Vindija, mientras que se diferencia por al menos tres nucleótidos de Feldhofer 1. Las diferencias con las muestras de Mezmaiskaya son por seis nucleótidos, y con los humanos modernos son mucho más acentuadas, 23 diferencias con la secuencia de referencia y 17 con la secuencia humana más próxima<sup>13</sup>.

Por lo tanto la secuencia de Feldhofer 2 es más parecida a la de Vindija, que está en Croacia, que a la de Feldhofer 1, que esta en el mismo yacimiento. Esto implica que ambos neandertales provienen de linajes mitocondriales diferentes, y no están relacionados maternalmente.

En los inicios del 2004 se publicaron las secuencias de cuatro neandertales más, es decir, el quinto, sexto, séptimo y octavo neandertal. En tres de ellos, se pudieron recuperar dos pequeños fragmentos de 72 y 31 nucleótidos, mientras que en el cuarto, procedente del

yacimiento Vindija, se obtuvo la secuencia completa de la región de control del ADN mitocondrial.

El objetivo principal del estudio fue averiguar la posibilidad de hibridación entre neandertales y cromañones. De una muestra de 24 neandertales de toda Europa y 40 cromañones, se hizo la selección de los cuatro primeros, dos de Vindija (Vindija 80 y Vindija 77), uno de Engis 2 (Bélgica) y uno de La Chapelle-aux-Saints (Francia). Los cromañones incluían cinco muestras de Francia, que incluían el espécimen francés que dio nombre al grupo, Cro-Magnon.

No se pudo recuperar ningún dato positivo de las cinco muestras de cromañones, lo cual indicaba que el ADN de los cromañones era diferente al de los neandertales, lo cual no permitía la amplificación del fragmento diagnóstico de éstos. La fragmentación del material genético de los neandertales analizados, hizo imposible recuperar nada más que el fragmento de 31 nucleótidos y otro de 72 nucleótidos (entre las posiciones 16022 y 16095), con excepción de la muestra Vindija 80, que es la mejor conservada en el nivel bioquímico.

Curiosamente las secuencias obtenidas en ambas muestras del mismo yacimiento (Vindija 75 y 80) resultaron ser idénticas, lo cual podría indicar que se trata de dos fragmentos óseos del mismo individuo, o que eran dos individuos diferentes estrechamente emparentados por línea materna (posibles hermanos).

El fragmento recuperado en los cuatro neandertales demostró la existencia de una sustitución en la posición 16258 que es altamente variable en este grupo de humanos. Así tenemos que la mitad de ellos presenta una guanina (G) en dicha posición, mientras que la otra mitad muestra una adenina (A)<sup>14</sup>.

Esta sustitución se halla presente y ausente en un mismo yacimiento, Feldhofer, lo cual indica que era variable dentro de un mismo grupo de neandertales (Tabla N° 1).

**Tabla 1.** Secuencias obtenidas de 9 restos de Neandertal, utilizando cebadores neandertal, los casilleros en blanco indican la identidad con la secuencia de referencia humana. Las cinco secuencias de la parte superior son las obtenidas en el estudio de Serre *et al.*, (2004) y Lalueza *et al.*, (2005). Las cuatro secuencias del inferior de la tabla son de los estudios previos.

Cambridge Secuencia de Referencia	T	C	A	C	A	C	A	T	C	A	A	C	T	G	C	A	A	C	T	C	C	A	A	A	G	C	C	A	C	C	C
Vindija 80			T											A													A	G			
Vindija 77			T											A													A	G			
Engis 2			T											A													A				
La Chapelle aux Saints			T											A													A				
El Sidrón 441			T											A													A	G			
Feldhofer			T											A													A	G			
Mezmaiskaya			T											A													A				
Vindija 75			T											A													A	G			
Feldhofer 2			T											A													A				

C= Secuencia 16234 G= Secuencia 16244 C= Secuencia 16256

El noveno neandertal fue recuperado de la cueva El Sidrón, en Asturias (España). A partir de siete muestras, mayoritariamente de dientes, se pudo aislar una secuencia de 31 nucleótidos de neandertal, la cual presentaba cambios en las posiciones 16234, 16244, 16256 y 16258; combinaciones que solo se hallan presentes en neandertales. Además esta secuencia de la muestra 441 de la cueva El Sidrón, tenía las sustituciones que la hacían idéntica a otros cuatro neandertales, Feldhofer 1 y los tres especímenes de Vindija; el resto de muestras de neandertal, no poseían<sup>10</sup>.

Los datos obtenidos del Sidrón indican que la secuencia es la primera que proviene de uno de los extremos del rango de distribución de los neandertales y situado a mayor latitud sur de todos los estudiados con éxito. El dato genético obtenido de un neandertal de la península Ibérica, implicaba que los neandertales eran efectivamente homogéneos como presentaban los anteriores resultados.

Hasta los estudios de los especímenes del Sidrón, todo se había conducido mediante el análisis del ADN mitocondrial, y se tenía secuencias comprobadas de ADN endógeno neandertal. Las evidencias indicaban que los neandertales no se habrían hibridado con los cromañones, y por lo tanto se habrían extinguido sin dejar rastros en el genoma de los humanos modernos, lo cual incluso llegó a publicar artículos como *No Sex Please, We're Neandertals*, en la revista *Science* donde se indicaba que la hibridación no había ocurrido, incluso tras revisar una secuencia de 65.000 nucleótidos<sup>12</sup>.

Sin embargo en el 7 de mayo del presente año, el grupo de Svante Pääbo, publicaba en la revista *Science*, el borrador completo del genoma mitocondrial neandertal y secuencias de ADN nuclear de origen neandertal.

Los 3 mil millones de nucleótidos recuperados de los huesos de tres mujeres neandertales que vivieron en Croacia hace 38.000 años, comparados con los genomas completos de cinco humanos modernos de diferentes partes del mundo, se lograron encontrar que tanto los europeos y los asiáticos tenían una cuota de 1% a 4% que compartían con el ADN nuclear de los neandertales. Sin embargo esta cuota no era compartida con los africanos modernos<sup>5</sup>.

Esto sugería que los primeros humanos modernos se habían cruzado con los neandertales, después que estos salieran de África, y antes que se extendieran por Asia y Europa. Por lo tanto, este nuevo estudio indicaba que los neandertales no estaban extinguidos totalmente, y hay en nuestro genoma entre un 1% a 4% de secuencias neandertales.

## CONCLUSIONES

- Las afinidades genéticas de los primeros humanos modernos de Europa y los ocupantes anteriores homínidos de la zona, los neandertales, ha seguido siendo un tema de mucho debate en los últimos 13 años. Hasta la obtención de la primera secuencia neandertal con el espécimen de Feldhofer, se ha seguido sucediendo una serie de acontecimientos a la luz de la tecnología del ADN antiguo y este resultado pionero.
- Las secuencias de los nueve neandertales estudiados, previo al trabajo de Green<sup>5</sup>, indicaban que la diversidad de los neandertales era restringida, por lo que era poco probable que un linaje neandertal obtenido a partir de ADN mitocondrial fuera lo suficientemente divergente para representar un linaje ancestral de los modernos europeos. Además las secuencias del ADN mitocondrial neandertal, no tenían evidencias de procesos de hibridación con otra especie de homínido.
- Con la publicación del genoma completo del ADN mitocondrial de neandertal y de secuencias de ADN nuclear, no sólo se ha demostrado que los neandertales y los humanos modernos comparten 1% a 4% en sus genomas, sino también se han detectado diferencias interesantes en los genes implicados en el metabolismo, color de la piel, morfología del esqueleto y el desarrollo cognitivo.
- El descubrimiento de la hibridación en el genoma nuclear neandertal, ha sorprendido a los investigadores, porque los neandertales no convivieron con los últimos humanos salidos de África, entre 30.000 y 80.000 años, y tampoco había rastros de esta mezcla en el genoma del ADN mitocondrial de los nueve neandertales estudiados, lo que implicaba que este cruce se realizó muy temprano, en Oriente Próximo, antes de extenderse por Eurasia y apenas los últimos humanos salieron de África.
- El debate sobre la humanidad de los neandertales es producto del significado de la variación y de la diferencia, e influye en la visión que tenemos de nosotros mismos

y de las diferencias respecto a otras poblaciones humanas actuales. Así tenemos que si los neandertales fueron nuestros antepasados, entonces las diferencias entre grupos humanos actuales son muy profundas y evolutivamente significativas.

- La extinción de este grupo humano ha tenido diversas hipótesis, pero esta comprobado que el aislamiento geográfico en los grupos humanos produce a largo plazo un empobrecimiento tecnológico, y es probable que estas diferencias culturales con los otros grupos humanos recién salidos de África, la inferioridad demográfica y la inestabilidad climática de hace 40.000 años, fueran determinantes en la desaparición de los neandertales.
- El hallazgo de 1% a 4% de secuencias neandertales en el genoma de humanos modernos, implica que una parte de ellos sobrevive aún en nosotros y por lo tanto ellos no están completamente extinguidos. Todo esto trae como consecuencia que *Homo neanderthalensis* pasará a ser nuevamente *Homo sapiens neanderthalensis*, es decir una subespecie como era considerada hace unas décadas. Sin embargo al existir intercambio genético al grado de afectar nuestro genoma actual, se esperaría porque tenían descendencia normal si se cruzaban, lo que indicaría que no son de especies diferentes.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Balter M. New Work may complicate history of Neandertals and H. sapiens. Science 2009; 326:224-225
2. Bertanpetit J. 2002. "DNA antiguo: una visión general". I Reunión de ADN antiguo en España. Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Toxicología de Madrid, Universidad del País Vasco, App Biosystem, Roche. 23-25 Enero, Madrid. 2002.
3. Briggs AW, Good JM, Green RE, Krause J, Maricic T, Stenzel U, Lalueza-Fox C, Rudan P, Brajković D, Kućan Z, Gušić I, Schmitz R, Doronichev VB, Golovanova LV, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A y Pääbo S. Targeted Retrieval and Analysis of Five Neandertal mtDNA Genomes. Science 2009; 235:318-321
4. Carbonell E. Homínidos: Las Primeras Ocupaciones de los Continentes. Ariel y Fundación Atapuerca. 780 p. 2005.
5. Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, et al. Sequence of the Neandertal Genome. Science 2010; 328:710-722
6. Kaestle, F. y A. Horsburgh. "Ancient DNA in Anthropology: methods, applications, and ethics". Yearbook of Physical Anthropology 2002; 45, pp. 92-130.
7. Krings M, Capelli C, Tschentscher F, Geisert H, Meyer S, von Haeseler A, Grossschmidt K, Possnert G, Paunovic M y Pääbo S. A view of Neandertal genetic diversity. Nature Genetics 2000; 26: 144-146
8. Herrmann B, Hummel S. Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. Springer-Verlag New York Inc. 1994.
9. Lalueza-Fox C. Genes de neandertal. Editorial Síntesis, S.A. Vallehermoso, Madrid. 2005.
10. Lalueza-Fox C, Sampietro ML, Caramelli D, Puder Y, Lari M, Calafell F, Martínez-Maza C, Bastir M, Fortea J, de la Rasilla M, Bertranpetit J y Rosas A. Neandertal Evolutionary Genetics: Mitochondrial DNA Data from the Iberian Peninsula. Mol Biol and Evol 2005; 22(4):1077-1081.
11. Ovchinnikov IV, Gotherstrom A, Romanovak GP, Kharitonov VM, Lidén K, Goodwin W. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. Nature 2000; 404:490-493.
12. Pennisi E. No sex please, we're Neanderthals. Science 2007; 316:967
13. Schmitz RW, Serre D, Bonani G, Feine S, Hillgruber F, Krainitzki H, Pääbo S y Smith FH. The Neandertal type site revisited: Interdisciplinary investigations of

skeletal remains from the Neander Valley, Germany. Proceed Nat Acad Scien USA 2002; 99:20 (13342–13347)

14. Serre D, Langaney A, Chech M, Teschler-Nicola M, Paunovicz M, Mennecier P, Hofreiter M, Possnert G y Pääbo S. No Evidence of Neandertal mtDNA Contribution to Early Modern Humans. Plos Biology 2004; 2:313-317
15. Wilson AC y RL Cann The recent African genesis pf humans. Scientific American 1992; 266:22-27

**Correspondencia:** Víctor Vásquez Sánchez

E-mail: