



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



IPHES^R

Institut Català de Paleoecologia
Humana i Evolució Social

Treball de final de màster:

Estudi genètic i espectroscòpic de la conservació d'ADNa de restes dentials humanes de la Cova dels Xaragalls (Vimbodí i Poblet, Tarragona)

Núria Puig Riera

Tutors professionals: Antonio Rodríguez-Hidalgo i Palmira Saladié

Tutor acadèmic: Santiago Garcia

Curs 2021 - 2022

Màster en Genètica, Física i Química Forense

Tarragona, setembre de 2022

Universitat Rovira i Virgili, Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social

Agraïments

En primer lloc, voldria agrair a l'Antonio i a la Palmira que confiessin en mi des del primer moment i que m'introduïssin en el món de l'arqueologia, tan desconegut però alhora captivador. M'han transmès la passió que tenen per la seva feina i els he d'agrair tot el que m'han ensenyat i el temps que han dedicat a resoldre'm els milers de dubtes i incerteses que s'han presentat durant aquests mesos. També els vull donar les gràcies per haver-me permès participar de les excavacions a Atapuerca i donar-me l'oportunitat de compartir temps amb tantíssims investigadors meravellosos.

Així mateix, voldria agrair a en Santi tots els suggeriments i les correccions; a la Ximena, els aclariments sobre la metodologia; i al Raúl, voldria donar-li les gràcies pel que han semblat hores infinites al laboratori revisant protocols i intentant solucionar els mals de cap que ens ha dut la PCR... I no puc oblidar-me de la Isa, a qui vull donar les gràcies per totes les aportacions en el treball pràctic, per estar sempre disposada a ajudar i per tots els consells que m'ha compartit.

A la Marina Lozano, per la seva col·laboració a l'hora d'escollir les dents a analitzar, i a Miguel Paredes, per ensenyar-me el funcionament del molturador criogènic. També a tot l'equip d'arqueòlegs de l'Institut Català de Paleoeologia Humana i Evolució Social que intervenen a la Cova dels Xaragalls.

I sobretot a l'Héctor, que m'ha deixat prendre el seu treball com a referència i m'ha ajudat a analitzar els espectres de l'ATR-FTIR. Vull donar-li les gràcies per trobar sempre un moment per divagar entre teories i hipòtesis i per tota la paciència que ha tingut. Aquest treball no hauria sigut possible sense ell.

Per acabar, agrair a la meva família i amics tot el suport incondicional durant aquests mesos.

Abreviatures

ADN: àcid desoxiribonucleic

ADNa: àcid desoxiribonucleic antic

ARN: àcid ribonucleic

ATR-FTIR: *Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

cal BP: *calibrated years Before Present*, escala temporal entesa com a data radiocarbònica convencional calibrada abans del 1950

e.c.: era comuna, equivalent sense matís religiós a després de Crist (dC)

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EPI: equip de protecció individual

HEPA: *High Efficiency Particle Arresting*

KBr-FTIR: *Potassium Bromide - Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

msnm: metres sobre nivell del mar

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

UTM: *Universal Transverse Mercator*, sistema de coordenades universal

wt%: *weight percentage*

Resum

L'ADN antic (ADNa) és útil per estudiar qüestions evolutives com el procés de neolitització o les relacions materno-filials als enterraments de la prehistòria recent. Però la seva extracció a partir de restes esquelètiques és complicada degut a la poca quantitat i a la mala conservació que presenta arran de la diagènesi òssia. A més a més, és un procés destructiu. Per tot això, és interessant fer un *pre-screening* de les mostres per predir si han conservat ADNa. L'espectroscòpia ATR-FTIR és una tècnica ràpida i mínimament destructiva que permet conèixer la composició orgànica i inorgànica de la mostra i, mitjançant el càlcul de paràmetres diagenètics, es pot relacionar la preservació de la matriu esquelètica amb la conservació d'ADNa. En aquest treball s'han estudiat 6 mostres dentals humanes de la Cova dels Xaragalls. S'ha extret ADNa provant diferents modificacions d'un protocol d'extracció d'ADN adaptat a restes esquelètiques per tal de trobar la que maximitzi la recuperació de material genètic. Després, s'ha relacionat la quantificació d'aquest ADNa amb la conservació de la matriu dental avaluada mitjançant ATR-FTIR. No ha sigut possible quantificar material genètic pur, perquè no s'ha conservat o perquè no s'ha pogut amplificar mitjançant la PCR per la presència de substàncies contaminants com àcids húmics o perquè l'ADNa està molt degradat estructuralment. Tampoc s'ha pogut concloure quina és la millor modificació del protocol d'extracció. Les restes presenten una bona preservació dels cristalls i del col·lagen que sembla que no es relaciona positivament amb la conservació d'ADNa. Es suggereix prestar especial atenció a l'enriquiment en grups carbonats, ja que es relaciona amb la degradació d'ADNa i, potser, en aquest context particular, fa que l'IRSF no sigui un bon paràmetre per avaluar la preservació orgànica de la mostra. També es destaca la importància d'estudiar cada mostra en el seu ambient de fossilització.

Paraules clau: ADN antic, ATR-FTIR, diagènesi òssia.

Abstract

Ancient DNA (aDNA) is useful in the investigation of evolutionary matters such as neolithization or maternal kinship in recent prehistory burials. But its extraction from skeletal remains is hard due to its low amount and bad conservation caused by bone diagenesis. Moreover, DNA extraction is a destructive process. For all these reasons, it's interesting to *pre-screen* the samples to predict if they may have preserved aDNA. ATR-FTIR spectroscopy is a quick and minimally destructive technique which enables the study of the organic and inorganic composition of the sample. Calculating some diagenetic parameters, it is possible to associate the skeletal matrix preservation to aDNA conservation. 6 human dental samples from Cova dels Xaragalls have been studied in this work. aDNA has been extracted using different modifications of a DNA extraction protocol adapted to skeletal remains to find the one which maximizes genetic material recuperation. Then, we have associated the aDNA quantification with the dental matrix conservation, which has been evaluated using ATR-FTIR. It hasn't been possible to quantify pure genetic material. This may be because there isn't any preserved DNA, or because PCR amplification hasn't been successful due to contaminant substances such as humic acids or because aDNA has structural damage. It has not been possible either to conclude which is the best extraction protocol modification. The studied remains have a good crystal and collagen preservation, which don't seem to be positively linked to aDNA conservation. We suggest to pay special attention to the samples' carbonate enrichment, as this is related to aDNA degradation and, maybe, in this particular context, to the fact that IRSF may not be a good parameter to assess the organic matrix conservation. We also underline the importance of studying each sample in its specific fossilization environment.

Keywords: ancient DNA, ATR-FTIR, bone diagenesis.

Índex de continguts

1. Introducció.....	1
1.1. L'ADN antic en la recerca del passat.....	1
1.2. Fonaments bàsics de l'ADN antic.....	6
1.3. Mètodes d'extracció	10
1.4. Preservació del material esquelètic: ATR-FTIR	11
2. Objectius.....	13
3. Materials i mètodes.....	14
3.1. Cova dels Xaragalls.....	14
3.2. Mostres	15
3.3. Preparació de les mostres.....	16
3.4. Anàlisi ATR-FTIR.....	17
3.5. Extracció i quantificació d'ADN.....	18
4. Resultats	21
5. Discussió	25
6. Conclusions.....	32
7. Bibliografia.....	33
8. Annex.....	41

Índex de figures i taules

<i>Figura 1.</i> Cronologia de la prehistòria recent a la península Ibèrica incloent les principals línies d'investigació d'ADNa	5
<i>Figura 2.</i> Estructura de la dent.....	7
<i>Figura 3.</i> Estructura de l'ADN nuclear i mitocondrial. Enquadrat l'enllaç β -N-glicosídic i encerclat l'enllaç fosfodièster	9
<i>Figura 4.</i> Espectre ATR-FTIR d'una mostra d'os modern amb les assignacions corresponents de cada banda	12
<i>Figura 5.</i> Localització de la Cova dels Xaragalls (emmarcada) a la península Ibèrica (A) i mapa topogràfic de la Sala Gran (B).....	14
<i>Figura 6.</i> Boca A localitzada a l'exterior de la Cova dels Xaragalls.....	15
<i>Figura 7.</i> Interior de la Cova dels Xaragalls. Àrea de la quadrícula M a P/17-18	15
<i>Figura 8.</i> Espectre ATR-FTIR de les 6 mostres dentals analitzades	21
<i>Figura 9.</i> <i>Boxplot</i> de les diferents mesures per NanoDrop de la concentració d'ADN de cada extracte	41
<i>Figura 10.</i> Recta estàndard	41
<i>Figura 11.</i> <i>Boxplot</i> dels triplicats de la PCR quantitativa	42
<i>Taula 1.</i> Mostres seleccionades	16
<i>Taula 2.</i> Mostres datades per radiocarboni al laboratori comercial BetaAnalytics.....	16
<i>Taula 3.</i> Resum dels paràmetres usats en aquest treball	18
<i>Taula 4.</i> Condicions de predigestió.	19
<i>Taula 5.</i> Resum de la nomenclatura dels extractes obtinguts a partir de cada mostra exemplificada per la mostra aDNA1.....	19
<i>Taula 6.</i> Concentracions de la recta estàndard.....	20
<i>Taula 7.</i> Taula amb els resultats dels paràmetres diagenètics calculats (mean \pm SD).....	21
<i>Taula 8.</i> Taula amb els resultats dels paràmetres diagenètics de referència (mean \pm SD)	22
<i>Taula 9.</i> Resultats de la quantificació per NanoDrop (mean \pm SD)	23
<i>Taula 10.</i> Resultats de la quantificació per PCR quantitativa (mean \pm SD).....	24
<i>Taula 11.</i> ANOVA d'un factor	43

1. Introducció

1.1. L'ADN antic en la recerca del passat

La paleogenètica és la ciència que, de forma interdisciplinària amb l'arqueologia, la paleontologia i la biologia evolutiva, es dedica a estudiar l'ADN recuperat d'organismes antics (ADNa) amb la finalitat de comprendre qüestions diverses sobre el passat. Es començà a desenvolupar als anys vuitanta, en particular l'any 1984 quan l'equip de la Universitat de Berkeley de Russell Higuchi publicava per primer cop seqüències d'ADN antic. Concretament, es tractava de 2 fragments d'ADN mitocondrial recuperat a partir d'una mostra de múscul d'una Quagga (*Equus quagga*) de feia 140 anys, una espècie mamífera extinta, conservada en un museu (Higuchi et al., 1984). La recuperació de seqüències d'ADNa humà es feu esperar fins un any més tard. Fou el 1985 quan Svante Pääbo, a la Universitat d'Uppsala, seqüencià una petita part del genoma d'una mòmia egípcia conservada en un museu i datada per radiocarboni de l'any 2430 ± 120 cal BP (Pääbo, 1985).

Aquests primers treballs usaven la clonació molecular per amplificar el material genètic, que és el pas posterior a l'extracció d'ADN de les mostres i anterior a la seva seqüenciació. Es tracta d'una tècnica laboriosa que s'ha de desenvolupar durant diversos dies i que requereix cèl·lules vives i manipulació de l'ADN, per tant, és fàcil contaminar les mostres. De fet, s'ha qüestionat si els primers estudis d'ADNa realment van permetre recuperar informació genètica antiga o si es tractava de contaminació moderna. És per això que el descobriment de la PCR a mitjans dels anys vuitanta suposà un gran avenç en els estudis d'ADN antic. Encara que la seva alta sensibilitat facilita l'amplificació de les contaminacions per ADN modern i, a més a més, cal que el material genètic que es vulgui amplificar no presenti lesions que impedeixin l'acció dels enzims que regulen el procés, és una reacció in vitro que permet obtenir bilions de seqüències d'ADN en poques hores a partir de quantitats mínimes d'ADNa. Però el que es considera la tecnologia més transformadora en la història de la recerca de l'ADNa fou el desenvolupament de les tècniques de Next-Generation Sequencing (NGS), que possibiliten la seqüenciació i les anàlisis de milions de loci de fragments d'ADN ultracurts en paral·lel i en qüestió de minuts (Loog i Larson, 2019; Orlando et al., 2021; Pokines et al., 2021).

Els estudis d'ADNa han suposat una veritable revolució dins el camp de l'arqueologia i, en particular, la prehistòrica. La introducció de l'enfocament genètic ha permès analitzar els materials antics des d'un punt de vista microscòpic que ha possibilitat redefinir qüestions com els orígens i la mobilitat de poblacions. Conjuntament amb les anàlisis antropològiques i el context arqueològic de la cultura material, la genètica permet desenvolupar una nova prehistòria que es nodreix de la perspectiva de diferents ciències transversals. Encara falta investigar molt sobre les condicions en les quals es preserva millor l'ADN antic i quines són les mostres i metodologies més adequades per recuperar-lo, però, a mesura que avancin les investigacions, la paleogenètica ajudarà a redefinir l'arqueologia moderna (Kristiansen, 2014).

Una de les principals vies d'investigació sobre prehistòria i evolució humana que s'ha vist enriquida per l'aplicació de les tècniques genètiques a les restes arqueològiques és el rastreig de l'ascendència dels europeus moderns a partir de l'estudi comparatiu dels haplogrups mitocondrials antics i contemporanis. D'aquesta forma, s'ha observat que en major o menor grau, segons la regió, els caucàsics moderns presenten genètica de poblacions caçadores-recol·lectores mesolítiques, poblacions grangeres neolítiques i poblacions de les estepes orientals (Rojo Guerra et al., 2018). En particular, l'estudi de l'origen i l'expansió de la Revolució Neolítica és un dels camps de major interès en l'arqueologia prehistòrica.

S'entén com a Revolució Neolítica el procés que modificà la història de la humanitat en introduir el canvi d'una societat a petita escala amb economia depredadora a una societat a gran escala amb economia productora. Les primeres poblacions neolítiques sembla que aparegueren al Creixent Fèrtil al voltant de l'any 12.000 cal BP, des d'on s'hipotetitzava que s'estengueren fins a la resta de l'Anatòlia i l'actual Europa durant 3000 anys. Aquesta neolitització implicà el canvi d'una forma de vida nòmada a una vida sedentària impulsada pel desenvolupament de l'agricultura i un augment de la mida poblacional. Es tracta d'un procés molt interessant des del punt de vista genètic, ja que l'expansió a nous territoris, el cultiu de plantes i la domesticació animal implicaren l'exposició a malalties zoonòtiques i un canvi d'alimentació que exerciren una sèrie de pressions evolutives sobre l'ésser humà i que modificaren la seva genètica. Per exemple, s'ha vist com s'afavorí la persistència de certs al·lels que permetien la digestió de la

lactosa i el metabolisme dels àcids grassos) (Allentoft et al., 2022; Archibald, 2018; Fernández et al., 2014; Loog i Larson, 2019).

Clàssicament, s'han formulat 2 vies per explicar l'expansió dels primers grangers neolítics: un model de difusió cultural i un model de difusió dèmica. Segons el primer, hi hagué una continuïtat genètica amb els caçadors-recol·lectors mesolítics que adoptaren el model de vida neolític sense que hi hagués interacció reproductiva amb els grangers provinents de l'Orient Pròxim. D'acord amb el segon, hi hagué una substitució genètica dels mesolítics pel moviment i l'assentament dels primers grangers a la resta de territoris (Allentoft et al., 2022; Fernández et al., 2014; Sampietro et al., 2007).

S'ha vist que l'haplogrup mitocondrial N1a és característic dels primers grangers de l'Europa central i la seva baixa freqüència a les poblacions modernes donaria suport al model de difusió cultural al centre del continent (Haak et al., 2005). Pel que fa a la península Ibèrica, fa falta analitzar més mostres per conèixer les interaccions entre les poblacions locals i els grangers neolítics (Olalde et al., 2019), ja que de moment s'han trobat resultats contradictoris. Sampietro et al. (2007) defensen un model de difusió dèmica perquè els haplogrups trobats en poblacions neolítiques ibèriques no difereixen dels presents en les poblacions actuals. Però, d'altra banda, s'ha vist que l'haplogrup J és un marcador dels primers grangers neolítics de l'Orient Pròxim. L'absència d'aquest en algunes poblacions neolítiques de la Península sembla indicar que la neolitització no tingué un focus genèticament homogeni d'expansió des del Creixent Fèrtil, i alguns autors proposen una colonització per via marítima (Chandler et al., 2005; Gamba et al., 2012; Hervella et al., 2012). Aleshores, els avenços en les tècniques genètiques han permès qüestionar les teories clàssiques per crear models integracionistes conscients que aquest procés fou diferent segons la regió i que es produïren diferents graus d'interacció entre els grups mesolítics locals i els primers neolítics (veure *Figura 1*) (Rojo Guerra et al., 2018).

Una altra línia d'investigació rellevant és l'estudi de les relacions materno-filials entre individus. I és que el canvi a una vida sedentària implicà, entre altres coses, una reorganització de les relacions socials. A causa de l'augment poblacional dels assentaments neolítics i, en part, a l'aparició i generalització entre aquestes poblacions

de rituals funeraris d'enterrament, els arqueòlegs disposen d'importants quantitats de restes humanes d'aquesta etapa. Això s'evidencia en l'abundància d'enterraments col·lectius existents a l'Europa del Neolític final-Calcolític (5450-4250 cal BP) i del Bronze inicial (4250-3800 cal BP) que fan pensar que la comunitat prengué una major importància per damunt de l'individu. S'hipotetitzava sobre si les persones que s'inhumaven conjuntament eren familiars o pertanyien a un estatus social concret, i una forma d'abordar aquesta qüestió és mitjançant l'estudi dels haplogrups mitocondrials. Així és possible suposar que els individus que es trobaren en un mateix sepulcre i que compartien haplogrup presentaven algun tipus de relació biològica materno-filial (veure *Figura 1*) (Rojo Guerra et al., 2018).

La majoria d'estudis es centren en inhumacions col·lectives de l'Europa Central. Per exemple, a Alemanya s'han observat diferències en els rituals funeraris de diverses poblacions coetànies amb cultures materials diferents. Així doncs, en algunes poblacions es suggereix una relació materno-filial directa entre els individus inhumats conjuntament perquè tenen el mateix haplogrup (Haak et al., 2008), però, en altres, s'ha trobat que els individus no comparteixen ascendència materna (Lee et al., 2012). També s'han vist divergències dins de poblacions amb una mateixa cultura, i s'han trobat inhumacions en què els individus sí que estarien relacionats per via materna i altres en què no (Lee et al., 2014).

A Catalunya, durant la cronologia esmentada, també afluïa com a ritual d'inhumació prevalent l'enterrament múltiple successiu, i es pensa que s'enterraven junts els individus amb vincles familiars (Bosch i Argilagós et al., 2016; Rojo Guerra et al., 2018; Rovira Port, 1978). No hi ha gaires estudis locals, però un exemple és el cas de la Cova de Montanissell, a l'Alt Urgell, on s'analitzaren 8 esquelets humans d'un enterrament col·lectiu. L'anàlisi antropològica apuntava a una estructura familiar i l'estudi genètic no pogué descartar una relació biològica materno-filial d'algunes de les restes, ja que n'hi havia 4 que compartien el mateix haplogrup (Simón et al., 2011). Malgrat que fa falta estudiar més mostres per arribar a conclusions robustes, sembla que no es pot generalitzar i que cal tenir en compte la localització de cada assentament i la cultura que hi predominava en el moment de l'enterrament.



Figura 1. Cronologia de la prehistòria recent a la península Ibèrica incloent les principals línies d'investigació d'ADNa.

1.2. Fonaments bàsics de l'ADN antic

L'ADN antic és aquell material genètic recuperat de restes arqueològiques i paleontològiques d'organismes antics de fins fa 400.000-1.650.000 anys; des de mamuts fins a poblacions humanes extintes com els neandertals (Orlando et al., 2021). Generalment, s'empren com a font de l'ADN les restes esquelètiques (ossos i dents) perquè gràcies al seu elevat contingut mineral, són resistents als diferents processos post-mortem que poden induir la degradació del material genètic (Loog i Larson, 2019).

El teixit ossi està format per una part mineral (60-70 wt%), una part orgànica (20-30 wt%) i aigua (10 wt%), encara que els percentatges poden variar perquè aquest teixit està en constant remodelació, fins i tot després de la mort. La fracció mineral consisteix en cristalls de bioapatita ($\text{Ca}_{10-x}[(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x](\text{OH})_{2-x}\cdot n\text{H}_2\text{O}$), que és una forma menys cristal·lina i no estequiomètrica de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Pasteris et al., 2014). En aquesta, els grups fosfats (PO_4^{3-}) i hidroxils (OH^-) estan parcialment substituïts per grups carbonats (CO_3^{2-}), que també s'adsorbeixen a la superfície dels cristalls. Els grups carbonats, en tenir una càrrega i una geometria diferent dels constituents clàssics de la hidroxiapatita, modifiquen la seva estructura cristal·lina. En concret, disminueixen la mida dels cristalls fent-los més reactius i augmentant la seva solubilitat per facilitar la remodelació òssia (Schotsmans et al., 2017; Weiner, 2010). A més a més, els cristalls de bioapatita contenen diverses substitucions per àtoms de Na^+ , Mg^{2+} , F^- , Cl^- ... que ajuden a estabilitzar l'estructura en el seu medi fisiològic (Ellingham et al., 2016; Madupalli et al., 2017; Snoeck et al., 2014).

La matriu orgànica està conformada per col·lagen tipus I en un 90 wt% i per altres proteïnes no col·laginoses. Ambdues fraccions interactuen, de forma que els cristalls de bioapatita mineralitzen el col·lagen ubicant-se entre les seves fibril·les i endurint així la matriu orgànica (Campos et al., 2012; Weiner, 2010). Dins d'aquesta estructura tissular també s'hi engloben diversos tipus de cèl·lules (osteoblasts, osteòcits, osteoclasts) que participen de la formació i la reestructuració de l'os. Són aquestes cèl·lules les que contenen ADN, però també s'hipotetitza que, arran de la remodelació òssia, hi ha material genètic que s'allibera de les cèl·lules i que pot interactuar tant amb els cristalls de bioapatita com amb les fibres de col·lagen. Per tot això es creu que si la matriu òssia està ben conservada, l'ADN també ho estarà (Campos et al., 2012).

Per recuperar material genètic antic de restes humanes, són de particular interès l'os petrós i les dents. A causa de la seva localització anatòmica interna i la seva elevada densitat mineral, s'ha vist que són resistents i conserven millor el material genètic que no pas altres ossos. Diferents estudis han recuperat més ADN a i de més qualitat de mostres d'os petrós (Gamba et al., 2014; Hansen et al., 2017; Harney et al., 2021; Parker et al., 2020; Schotsmans et al., 2017), però és més recurrent l'anàlisi de les dents perquè abunden en els contextos arqueològics (Harney et al., 2021; White i Folkens, 2005).

La dent té la mateixa composició que l'os i a grans trets es diferencia en 2 teixits segons la proporció de matriu orgànica i inorgànica: l'esmalt i la dentina (veure *Figura 2*). L'esmalt és la capa més externa que recobreix la superfície coronària de la dent i és avascular i acel·lular, ja que està formada en un 99 wt% per components minerals i només un 1 wt% per components orgànics. Per aquest motiu, no serveix per extreure ADN, però protegeix el material genètic present a la dentina, que és el component majoritari de la dent. Malgrat que la dentina és un teixit mineralitzat en un 75 wt%, el 20 wt% és matriu orgànica i, a més a més, hi ha una capa de cèl·lules vives al voltant de la cavitat polpar que la converteix en un teixit cel·lular i idoni per l'extracció d'ADN (Schotsmans et al., 2017).

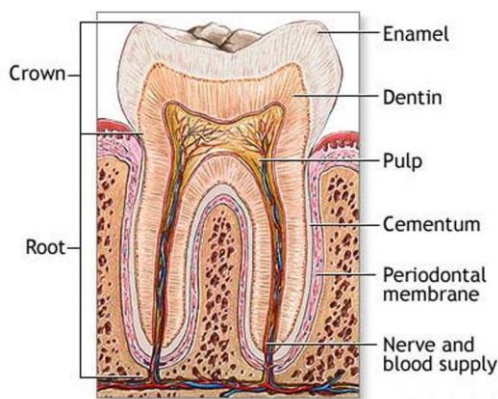


Figura 2. Estructura de la dent. Extreta de Sandholzer, 2010.

Per tant, la dent és una estructura molt mineralitzada i, en conseqüència, molt resistent als processos tafonòmics, que són aquells que alteren les restes esquelètiques d'ençà que l'individu mor fins que es produeix la seva troballa. Dins la tafonomia convé fer especial èmfasi en la diagènesi òssia, que es refereix als canvis químics i moleculars que pateixen les restes després de ser enterrades per tal d'estabilitzar-se dins el nou entorn (Pokines et al., 2021). Les condicions diagenètiques afecten la recuperació del material

genètic perquè, a més d'induir l'alteració de la matriu esquelètica i la degradació o modificació de l'ADN, poden introduir diverses substàncies amb efectes inhibidors en aquest procés (Barrio-Caballero, 2013; White i Folkens, 2005). Es tracta de situacions molt diverses i, a més a més, que depenen de les característiques de cada enterrament.

D'una banda, hi ha els factors ambientals com la temperatura, la humitat o el pH i les característiques del sòl (Kendall et al., 2018). La calor contribueix a la combustió del col·lagen orgànic. També s'han descrit les dificultats per recuperar material genètic en zones càlides del continent africà mentre que s'ha demostrat que l'ADNa presenta una millor conservació en ambients permagel (Schotsmans et al., 2017; Schwarz et al., 2009; White i Folkens, 2005). La humitat facilita la penetració de substàncies contaminants del sediment a les restes, mentre que l'acidesa del sòl contribueix a dissoldre la fracció mineral de la matriu esquelètica (Barrio-Caballero, 2013; Schotsmans et al., 2017). Finalment, el sòl pot contenir certes substàncies com els àcids húmics que s'ha vist que inhibeixen l'amplificació del material genètic (Matheson et al., 2010; Sidstedt et al., 2015; Sutlovic et al., 2008). Tenint en compte tots aquests aspectes, s'ha descrit que les coves són un ambient idoni per a la conservació del material genètic, ja que eviten les fluctuacions de temperatura i humitat, afavorint la persistència de l'ADNa (Haouchar et al., 2014).

D'altra banda, l'estructura molecular del material genètic pot modificar-se a causa de diferents factors. Per entendre aquest dany estructural, convé recordar l'estructura de l'ADN (veure *Figura 3*). Es tracta d'una molècula conformada per nucleòtids consistents en una desoxiribosa que s'uneix tant a una base nitrogenada mitjançant un enllaç β -N-glicosídic com a un grup fosfat. Aquestes bases són les purines (adenina, A i guanina, G) i les pirimidines (timina, T i citosina, C). Els diferents nucleòtids s'uneixen entre ells a través d'enllaços fosfodièster creant una cadena simple que al mateix temps s'uneix a una altra cadena polinucleotídica mitjançant ponts d'hidrogen entre les bases nitrogenades (A/T i C/G), constituint així l'estructura característica de doble hèlix. Es pot dir que l'ésser humà té dos tipus de genomes, ja que hi ha un ADN que es troba dins el nucli de les cèl·lules (ADN nuclear) i un altre que està dins les nombroses mitocondries que té cada cèl·lula (ADN mitocondrial). L'ADN nuclear és lineal i s'estructura en 46 cromosomes, conformant el 99,75 % del total del genoma humà. D'altra banda, l'ADN

mitocondrial té una estructura circular i tan sols constitueix el 0,25 % del total de la informació genètica (Archibald, 2018; Brown i Brown, 2011; Butler, 2005).

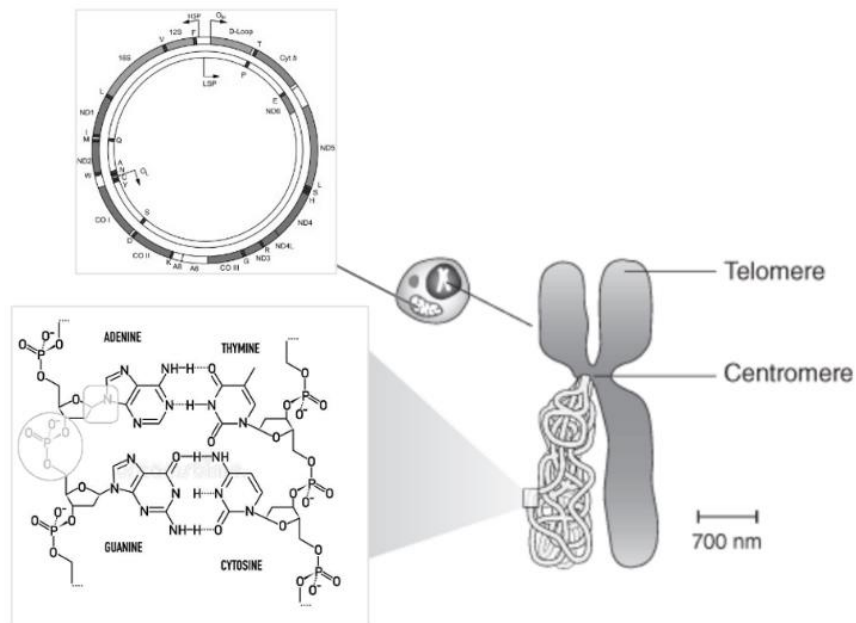


Figura 3. Estructura de l'ADN nuclear i mitocondrial. Enquadrat l'enllaç β -N-glicosídic i encerclat l'enllaç fosfodièster. Modificada d'Archibald, 2018.

Després de la mort, els mecanismes de reparació de l'ADN s'aturen i el material genètic queda exposat al dany oxidatiu i hidrolític induït pels radicals lliures (producte de les reaccions cel·lulars i de la llum ultraviolada), pels enzims que s'alliberen arran del trencament de les cèl·lules i per l'acció enzimàtica dels microorganismes, entre altres factors (Loog i Larson, 2019). El dany oxidatiu afecta sobretot les pirimidines que es converteixen en productes que impedeixen l'acció de les polimerases, de forma que no serà possible amplificar el material genètic. Una altra afectació de l'ADN és la fragmentació de les seves cadenes a causa del trencament de l'enllaç fosfodièster o per la depurinació hidrolítica que causa el trencament de l'enllaç β -N-glicosídic. Finalment, una altra característica de l'ADNa és l'elevat nombre de transicions C a T a causa de la desaminació hidrolítica de les C que es converteixen a uracils, una base nitrogenada present només a l'ARN (Dabney et al., 2013a; Orlando et al., 2021).

Aleshores, l'ADN antic està molt degradat en fragments curts i modificat a escala molecular. S'acostuma a treballar amb l'ADN mitocondrial per augmentar les possibilitats de recuperar material genètic, perquè cada cèl·lula conté diverses

mitocòndries i, per tant, diverses còpies d'aquest genoma mentre que només una del nuclear i, a més a més, el genoma mitocondrial és més resistent a la degradació (Butler, 2005; López Soto, 2020). També, com que es tracta d'un ADN que s'hereta exclusivament per via materna, permet estudiar les relacions filogenètiques a partir dels haplogrups mitocondrials, tenint un especial interès pels estudis sobre l'evolució (Loog i Larson, 2019).

De totes maneres i encara que costi més de recuperar, també hi ha nombroses investigacions que treballen amb ADN nuclear, el qual permet estudiar un ampli ventall de qüestions també relacionades amb els orígens i els hàbits de poblacions antigues, per tal de completar la informació que proporciona l'ADN mitocondrial. De fet, el material genètic nuclear humà més antic fou recuperat l'any 2016 d'un fèmur i d'un incisiu trobats al jaciment de la Sima de los Huesos de la serra d'Atapuerca, i permeté confirmar que els homínids d'aquest jaciment estaven relacionats amb els neandertals (Meyer et al., 2016).

1.3. Mètodes d'extracció

S'han descrit diversos mètodes d'extracció d'ADNa a partir de materials esquelètics, però la majoria segueixen els mateixos passos. Primer de tot es descontamina la mostra mitjançant neteges químiques, abrasió mecànica o irradiació amb llum ultraviolada. A continuació, es polvoritza el material de forma manual (amb un morter d'àngata) o automatitzada (amb un molí d'impactació electromagnètica). Finalment, es sotmet la pols òssia a una predigestió amb proteïnasa K i a una extracció mitjançant kits comercials basats en dissolvents orgànics (fenol: cloroform) o resines quelants (suspensió de sílice) (Barrio-Caballero, 2013).

Tots aquests processos s'han de realitzar en laboratoris especialitzats i esterilitzats mitjançant neteges químiques, filtres HEPA i radiació ultraviolada per evitar la contaminació amb material genètic modern, ja que la seva mínima presència emmascararia la poca quantitat d'ADNa que acostuma a estar present en les mostres arqueològiques. A més a més, convé minimitzar el risc de contaminació durant l'excavació, l'emmagatzematge i la manipulació de les mostres al laboratori usant els EPI

adequats (guants, mascareta), formant el personal i treballant en instal·lacions específiques per ADN (Loog i Larson, 2019; Orlando et al., 2021).

1.4. Preservació del material esquelètic: ATR-FTIR

Com que la recuperació d'ADN implica la polvorització de la mostra i, per tant, la seva destrucció, en els darrers anys s'ha intensificat la investigació de tècniques mínimament destructives que permetin avaluar si les restes arqueològiques conserven material genètic abans de sotmetre-les als protocols d'extracció (Leskovar et al., 2020). Malgrat que de moment hi ha pocs estudis que relacionin directament la preservació de la matriu òssia amb la conservació del material genètic, una de les tècniques més emprades per investigar l'estat de les mostres esquelètiques és l'espectroscòpia FTIR. Aquesta tècnica es basa en mesurar l'energia que absorbeixen els enllaços químics d'una mostra quan s'irradia amb un feix de llum infraroja. L'absorció indueix les vibracions fonamentals dels enllaços, que poden ser de tensió (ν) o de flexió (δ) i en mode simètric o asimètric. Analitzant l'espectre i calculant diferents paràmetres diagenètics (veure *Taula 3 a Anàlisis ATR-FTIR*), és possible conèixer i quantificar relativament la composició orgànica i inorgànica de les mostres. A més a més, és compatible amb l'ús d'altres tècniques com la difracció de raigs X i l'espectroscòpia Raman (Pal Chowdhury et al., 2021; Sponheimer i Lee-Thorp, 1999).

S'han descrit diferents tipus d'espectroscòpies FTIR per analitzar ossos i dents arqueològiques, però s'ha demostrat que els resultats obtinguts mitjançant la KBr-FTIR són comparables als que s'obtenen quan s'empra l'ATR-FTIR (Hollund, 2013). Com que la preparació de la mostra per l'espectroscòpia KBr és més costosa i menys reproduïble que per l'ATR, és preferible usar l'ATR-FTIR. Aquesta permet estudiar tant la fase mineral com l'orgànica dels materials esquelètics (veure *Figura 4*) a partir de molt poca quantitat de mostra, amb una preparació ràpida i mínimament destructiva, i permetent aconseguir resultats reproduïbles i comparables (Del Valle et al., 2022).

Alguns estudis han trobat que la majoria de les dents i dels ossos arqueològics que contenen material genètic amplificable presenten una bona preservació del col·lagen i una cristal·linitat disminuïda, similar a la dels ossos moderns (Kontopoulos et al., 2020; Scorrano et al., 2015; Sosa et al., 2013). Altres autors defensen que la cristal·linitat no

es correlaciona amb la preservació del material genètic (Schwarz et al., 2009) o que la conservació dels grups carbonats també és un bon predictor de la presència d'ADNa (Kontopoulos et al., 2020).

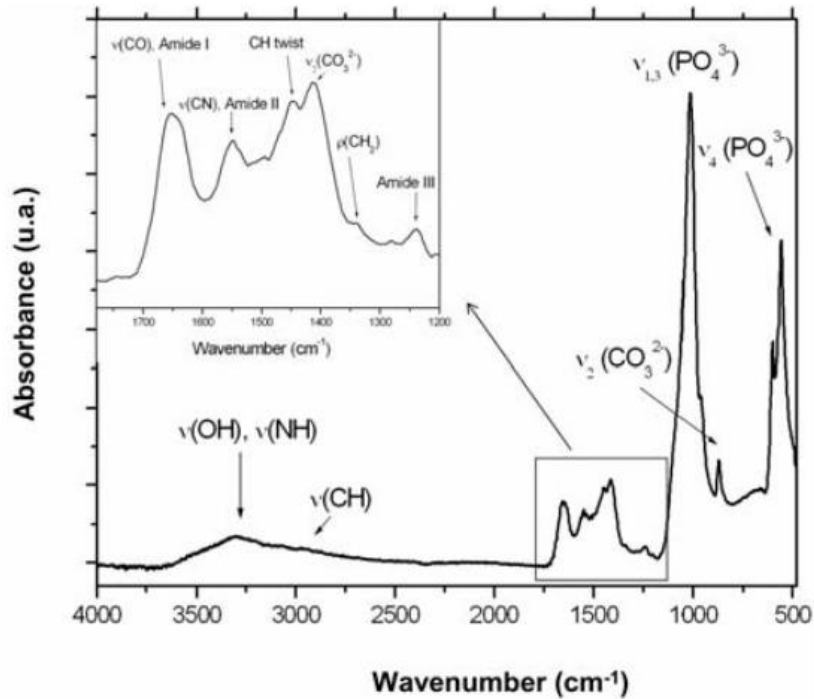


Figura 4. Espectre ATR-FTIR d'una mostra d'os modern amb les assignacions corresponents de cada banda. Extreta de Chadeaux et al., 2009.

Però la correlació entre els paràmetres diagenètics proposats per diversos autors i la preservació d'ADNa sembla que es veu debilitada quan s'avaluen mostres provinents de diferents contextos arqueològics (Leskovar et al., 2020). D'aquesta forma, com que cada mostra esquelètica i cada ambient presenten unes característiques particulars, es fa difícil crear un model predictiu basat en un conjunt concret de paràmetres. Per això, convé estudiar cada resta de forma individual i tenint en compte les característiques de l'entorn d'on s'ha recuperat (Del Valle Blanco, 2021).

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest estudi és recuperar ADN antic de 6 mostres dentals humanes de la Cova dels Xaragalls (Tarragona) de cronologia prehistòrica, aproximadament entre els anys 6950 i 3950 cal BP. Com que les tècniques d'extracció de material genètic antic més exitoses descrites en la bibliografia són destructives i segons l'estudi varia la forma de descontaminació, la tècnica de polvorització, la composició de la solució de predigestió i el kit d'extracció utilitzat, d'una banda, es pretén revisar els protocols existents per intentar trobar el que maximitzi la recuperació d'ADNa. D'altra banda, també arran de la naturalesa destructiva que té l'extracció de material genètic, interessa saber si les anàlisis dels espectres obtinguts per ATR-FTIR podrien ser d'utilitat per predir si les mostres dentals escollides conserven material genètic. Així, es podria concretar quins paràmetres són indicatius d'una bona preservació de les dents en aquest context arqueològic particular.

Per limitacions de recursos i temps no serà possible seqüenciar el material genètic que es pugui recuperar, però, si es pogués fer, seria d'interès amplificar i seqüenciar material genètic mitocondrial per fer una aproximació a com es produí la neolitització al nord-est de la península Ibèrica i per estudiar les relacions materno-filials entre les persones inhumades col·lectivament a la cova.

Per assolir aquests objectius convé dur a terme les següents activitats:

- Provar diferents modificacions d'un protocol d'extracció d'ADN per posar a punt un mètode que maximitzi l'extracció d'ADN de dents antigues amb el material i les condicions disponibles als laboratoris del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili.
- Extreure i quantificar ADN de 6 dents antigues.
- Avaluar els espectres obtinguts mitjançant ATR-FTIR per estudiar la conservació mineral i orgànica de 6 dents antigues mitjançant el càlcul de paràmetres diagenètics.
- Relacionar la preservació de la matriu orgànica i inorgànica de les dents amb la conservació d'ADN endogen segons els criteris proposats per la bibliografia disponible.

3. Materials i mètodes

3.1. Cova dels Xaragalls

La Cova dels Xaragalls (coordenades UTM 31N – ETRS89 337403.5E i 4581126.1N. 585 msnm) és una cova localitzada al terme municipal de Vimbodí i Poblet, a la comarca de la Conca de Barberà (Tarragona, Espanya) (veure *Figura 5A*). Es tracta d'un sistema càrstic obert en calcàries dolomítiques mesozoiques fracturades. Malgrat que és una cavitat que encara està essent excavada i estudiada, la datació per radiocarboni de carbons trobats als nivells 1, 3 i 5 de la boca D del jaciment han permès determinar que la cova fou ocupada durant l'Alta Edat Mitjana (S.V-X e.c.), el Bronze inicial-mig (4250-3150 cal BP) i el Neolític inicial (7960-5450 cal BP) respectivament. Aquestes datacions absolutes, conjuntament amb les característiques dels materials ceràmics i lítics que s'han trobat acompanyant diverses restes humanes, també han permès saber que la cova s'usà com una cavitat de sepulcre funerari col·lectiu durant el Calcolític final i l'Edat de Bronze (López-García et al., 2012; Vallverdú, 2019, 2020). Sembla que les restes humanes s'haurien dipositat sobre el sòl sense cobrir amb terra, un ritual funerari característic de la Catalunya de l'Edat del Bronze (Bosch i Argilagós et al., 2016). Les darreres intervencions a la cova s'han centrat en les boques C i D d'entrada a la Sala Gran de la cova (veure *Figura 5B*).

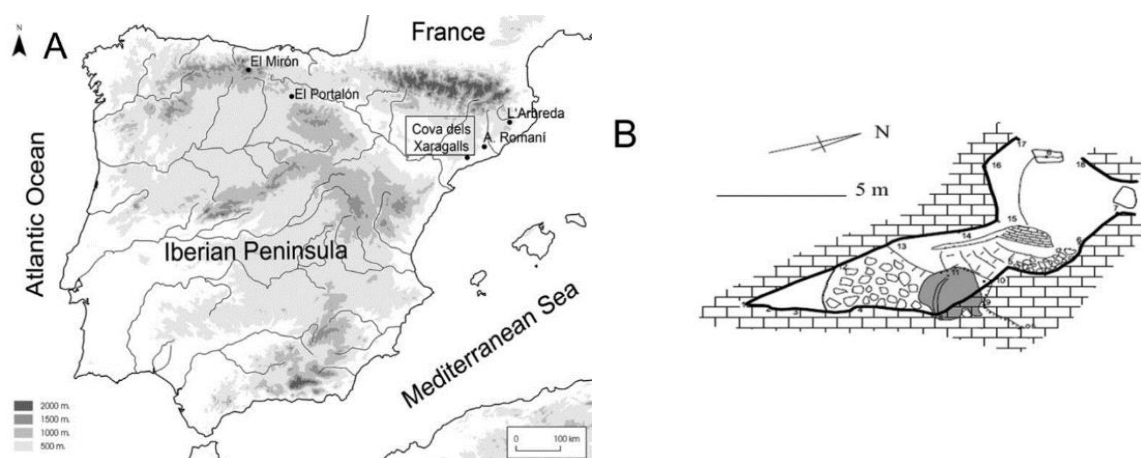


Figura 5. Localització de la Cova dels Xaragalls (emmarcada) a la península Ibèrica (A) i mapa topogràfic de la Sala Gran (B). Extreta de López-García et al., 2012.

Un altre aspecte a destacar d'aquesta cova és que, des de la seva primera documentació l'any 1928 per J. Serra Vilaró, ha patit diferents excavacions clandestines i espoliacions. Aquestes excavacions han alterat els seus sediments i l'estratigrafia, així com els materials arqueològics, i han causat que les diferents troballes que s'hi feren es trobin escampades per diversos museus i domicilis particulars (Soriano i Amorós, 2015; Vilaseca, 1954).

Actualment, la cova està sent intervinguda per l'equip d'investigació de l'Institut Català de Paleoecologia Humana i Evolució Social (IPHES) dirigit per Josep Vallverdú, Antonio Rodríguez-Hidalgo i Alfred Suesta. L'objectiu principal és documentar els nivells més antics d'ocupació i determinar si es poden descriure els dipòsits estratigràfics espoliats a la zona de l'entrada artificial de la cavitat (boca C-D). Els resultats obtinguts durant les campanyes realitzades en els darrers 10 anys indiquen la presència de dipòsits fossilífers plistocens, amb fauna quaternària a la Sala Principal, i la presència de dipòsits sepulcrales tan remoguts com *in situ* associats a materials i datacions del Neolític final, Calcolític i Bronze antic (veure *Figures 6 i 7*) (Vallverdú, 2020).



Figura 6. Boca A localitzada a l'exterior de la Cova dels Xaragalls. Autora: Roser Marsal.



Figura 7. Interior de la Cova dels Xaragalls. Àrea de la quadrícula M a P/17-18. Autora: Roser Marsal.

3.2. Mostres

S'han estudiat 6 peces dentals humanes corresponents a 6 individus de l'espècie *Homo sapiens* i recuperades per investigadors de l'IPHES d'un enterrament col·lectiu a la Cova dels Xaragalls, datat entre els anys 6950 i 3950 cal BP (veure *Taula 1*). Idealment, per assegurar que les dents pertanyen a individus diferents, s'hauria d'analitzar la mateixa peça dental en cada cas. Però en aquest enterrament no es disposa d'un nombre prou elevat de dents macroscòpicament ben conservades, així que es van escollir diferents

peces segons l'individu, però totes premolars. No obstant això, es tingueren en compte la lateralitat, l'estat d'erupció i l'estat de desgast de cada peça dental seleccionada per intentar minimitzar la possibilitat d'escollir 2 o més peces dentals pertanyents a un mateix individu. No es disposa d'una datació absoluta per radiocarboni d'aquestes 6 dents, però sí de 3 dents humanes recuperades del mateix context sepulcral (veure *Taula 2*). Aleshores, a partir d'aquestes datacions, del context cronoestratigràfic i dels materials arqueològics associats, es pot deduir que les mostres estudiades pertanyen a una cronologia que engloba el Calcolític final i l'Edat de Bronze inicial.

Sigla arqueològica	Nomenclatura científica	Element	Taxó
Limpieza pasillo entre salas Bocas C-A	aDNA1	Premolar 3 inferior esquerra	<i>Homo sapiens</i>
CX.21 N1 N18-59	aDNA2	Premolar 4 inferior dret	<i>Homo sapiens</i>
CX.19 N3 N18-7	aDNA3	Premolar 4 inferior dret	<i>Homo sapiens</i>
CX.19 N3	aDNA4	Premolar 3 inferior esquerra	<i>Homo sapiens</i>
CX.19 N4 P18	aDNA5	Premolar 4 superior esquerra	<i>Homo sapiens</i>
CX.19 N5 P18-17	aDNA6	Premolar 4 inferior esquerra	<i>Homo sapiens</i>

Taula 1. Mostres seleccionades. Abreviació del jaciment (CX), any d'excavació (2019 o 2021), nivell arqueològic (N1, N3, N4 o N5), quadre d'excavació (N18 o P18) i número de la resta.

Sigla arqueològica	Element	Taxó	Datació
CX.21 BocaC N6 P15-150	Dent	<i>Homo sapiens</i>	5052 - 4862 cal BP
CX.21 BocaC N6 P15-171	Dent	<i>Homo sapiens</i>	3082 - 2932 cal BP
CX Mu 1	Dent	<i>Homo sapiens</i>	4240 - 4080 cal BP

Taula 2. Mostres datades per radiocarboni al laboratori comercial BetaAnalytics. Datacions no publicades.

3.3. Preparació de les mostres

Per evitar contaminar el material arqueològic tots els procediments es realitzaren dins d'una cabina de flux laminar equipada amb filtres HEPA i il·luminació ultraviolada. Abans i després del seu ús, tant la cabina com els materials i reactius a usar, es netejaven amb lleixiu, etanol i aigua i s'irradiaven durant 20-30 minuts seguint les indicacions de Rohland i Hofreiter (2007a).

Les dents foren sotmeses a una neteja química i una abrasió mecànica d'acord amb les recomanacions de Barrio-Caballero (2013) i Paredes Herrera (2020). D'aquesta forma, primer de tot es rentaren successivament amb hipoclorit sòdic al 10 %, aigua bidestil·lada estèril i etanol al 70 %. No s'exposaren a radiació ultraviolada per evitar

danyar el material genètic. A continuació, utilitzant una eina dremel amb una punta de diamant abrasiva, es raspà la superfície per eliminar l'esmalt dentari i els contaminants que hi pogués haver a l'exterior i després es separà l'arrel de la corona, conservant l'arrel per avaluar la dentina interna.

Sota la supervisió del doctor Miguel Paredes Herrera als laboratoris del servei de biologia del departament de Barcelona de l'Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, es va polvoritzar l'arrel dentària usant un molturador criogènic 6770 Freezer Mill. Aquest és un pas necessari per augmentar la superfície disponible per sotmetre la dent als agents químics per extreure ADN més endavant (Barrio-Caballero, 2013). És preferible fer-ho de forma automatitzada i no amb un morter d'àgata perquè així s'obté una mida uniforme per totes les partícules. Les arrels es dipositaren dins de vials de molta conjuntament amb un impactador d'acer inoxidable i es van sotmetre a diferents cicles de refredament amb nitrogen líquid, per protegir el material genètic del dany tèrmic generat durant el procés de trituració. Seguidament, es van moldre les mostres durant 2 minuts a 30 Hz fins a aconseguir una pols fina i homogènia i es van transferir 200-300 mg d'aquesta pols a un tub Falcon estèril de 15 ml per aplicar el protocol d'extracció d'ADN. També es van separar aproximadament 10 mg de pols dental en tubs Eppendorf estèrils de 2 ml per analitzar-ho via ATR-FTIR.

3.4. Anàlisis ATR-FTIR

Per a les anàlisis de l'ATR-FTIR es va tamisar la pols dentària en sedassos per seleccionar les partícules amb un diàmetre de 20 μm o 50-60 μm seguint les recomanacions de Kontopoulos et al. (2018) per assegurar la reproductibilitat i la fiabilitat de les dades. Es va usar un espectròmetre Jasco FT/IR-6800 disponible al Servei de Recursos Científics i Tècnics de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona). S'ajustà a una resolució espacial de 2 cm^{-1} i s'acumularen 64 scans en el rang 4000-370 cm^{-1} , emprant menys d'1 mg de pols de mostra i prement-la a la superfície d'un cristall de diamant. Es feren 3 mesures per cada mostra per apreciar l'homogeneïtat de la composició i la reproductibilitat instrumental. També s'ajustà la línia base amb 2 punts per cada banda. La pressió de l'enclusa al cristall ATR s'ajustà de 0,5 a 0,9 $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$ per obtenir una absorbància de 0,5 per la banda $\nu_3\text{PO}_4$ al voltant de 1015 cm^{-1} i, d'aquesta forma, normalitzar tots els espectres (Lebon et al., 2016). Entre mesures es netejaven la placa de cristall i l'enclusa de pressió

amb alcohol isopropílic per evitar contaminacions. Els espectres obtinguts s'analitzaren mitjançant el programa Spectra Manager™ 2.15.00 (JASCO), calculant els paràmetres usats per Kontopoulos et al. (2019, 2020) per relacionar la preservació orgànica i inorgànica de les mostres dentals amb la presència d'ADN després de corregir la línia base. A més a més, s'ha utilitzat el FWHM, ja que sembla ser un bon indicador per avaluar l'estabilitat de la xarxa cristal·lina a través dels grups fosfats (veure *Taula 3*).

Paràmetre	Pics	Caracterització	Mode vibracional	Línia base	Referència
Aml/PO ₄	1640 cm ⁻¹ /1010 cm ⁻¹	Relació entre Amida I i fosfats	Amida I C=O ν ₃ (PO ₄)	1710 cm ⁻¹ - 1590 cm ⁻¹ 1150 cm ⁻¹ - 890 cm ⁻¹	(Trueman et al., 2004) (Sosa et al., 2013) (Lebon et al., 2016)
IRSF	(560 cm ⁻¹ + 600 cm ⁻¹) / 590 cm ⁻¹	Indicador de l'ordre i la mida de la xarxa cristal·lina	ν ₄ (PO ₄)	660/640 cm ⁻¹ 470/420 cm ⁻¹	(Weiner i Bar-Yosef, 1990)
C/P	1410 cm ⁻¹ /1010 cm ⁻¹	Relació entre carbonats i fosfats	ν ₃ (CO ₃) tipus B ν ₃ (PO ₄)	1590 cm ⁻¹ - 1290 cm ⁻¹ 1150 cm ⁻¹ - 890 cm ⁻¹	(Wright i Schwarcz, 1996)
Aml/C ₁	1640 cm ⁻¹ /1410 cm ⁻¹	Relació entre Amida I i carbonats B	Amida I C=O ν ₃ (CO ₃) tipus B	1720 cm ⁻¹ - 1590 cm ⁻¹ 1590 cm ⁻¹ - 1290 cm ⁻¹	(Kontopoulos et al., 2020)
Aml/C ₂	1640 cm ⁻¹ /872 cm ⁻¹	Relació entre Amida I i carbonats B	Amida I C=O ν ₂ (CO ₃) tipus B	1720 cm ⁻¹ - 1590 cm ⁻¹ 830 cm ⁻¹ - 890 cm ⁻¹	(Kontopoulos et al., 2020)
FWHM	1010 cm ⁻¹	Amplada a mitja alçada per ν ₃ (PO ₄)	ν ₃ (PO ₄)	1150 cm ⁻¹ - 890 cm ⁻¹	(Kimura-Suda i Ito, 2017) (Hollund, 2013)

Taula 3. Resum dels paràmetres usats en aquest treball. Modificada de Del Valle Blanco, 2021.

3.5. Extracció i quantificació d'ADN

L'extracció d'ADN es va fer seguint una adaptació del protocol DNA IQ™ System de Promega per a restes òssies mitjançant resina paramagnètica de sílice, ja que s'ha demostrat que les partícules de sílice són el millor mètode per recuperar quantitats amplificables d'ADN antic de forma ràpida, senzilla i adaptable a cada mostra (Rohland i Hofreiter, 2007b). Primer de tot, les mostres polvoritzades es sotmeteren a una predigestió durant 1 hora a 56 °C sota diferents condicions recollides a la *Taula 4*. Això es feu així per comparar resultats i trobar les millors condicions per maximitzar l'extracció d'ADN, ja que hi ha autors que recomanen afegir un quelant d'ions com l'EDTA per desmineralitzar l'os i assegurar l'alliberació de l'ADN de la matriu esquelètica (Calacal et al., 2021; Damgaard et al., 2015; Paredes Herrera, 2020). D'aquesta forma, totes les mostres es tractaren amb proteïnasa K 1 mg/ml diluïda en tampó PBS tal com

recomana el protocol seguit, però a algunes se'ls hi afegí calci 10 mM seguint les instruccions del distribuïdor de la proteïnasa K (ja que és un cofactor que estabilitza la proteïnasa a les altes temperatures que necessita per a treballar) i a d'altres se'ls afegí calci 10 mM i EDTA 0'5 M per desmineralitzar (Dabney et al., 2013b; Duijs i Sijen, 2020). Després es va reservar el pellet i es va tractar el sobrenedant amb un tampó de lisi i 15 µl de resina paramagnètica, es van fer 3 rentats amb un tampó de neteja i finalment una elució en un volum final de 40 µl. Paral·lelament, es feu un control negatiu d'extracció per a cada mostra (aDNA-).

Mostra	Tractament
aDNA1	Proteïnasa K + PBS
aDNA2	Proteïnasa K + PBS
aDNA3	Proteïnasa K + PBS + Ca ²⁺
aDNA4	Proteïnasa K + PBS + Ca ²⁺
aDNA5	Proteïnasa K + PBS + Ca ²⁺ + EDTA
aDNA6	Proteïnasa K + PBS + Ca ²⁺ + EDTA

Taula 4. Condicions de predigestió.

El pellet de cada mostra (aDNA_i) es sotmeté al mateix protocol d'extracció però fent una predigestió over-night amb rotació a 56 °C amb EDTA 0'5 M i proteïnasa K 0'25 mg/ml (Buzan et al., 2020; Jakubowska et al., 2012; Loreille et al., 2007; Rohland i Hofreiter, 2007a). Això es feu perquè, malgrat que el protocol seguit descarta el pellet, alguns estudis han demostrat que fent una re-extracció amb una digestió més llarga i agressiva és possible recuperar material genètic que haguera pogut quedar atrapat a la xarxa mineral que hagués resistit la primera predigestió (Damgaard et al., 2015; Der Sarkissian et al., 2014; Ginolhac et al., 2012).

Nomenclatura	Tractament
aDNA1	Extracció dentina
aDNA1-	Control negatiu d'extracció
aDNA1i	Re-extracció pellet

Taula 5. Resum de la nomenclatura dels extractes obtinguts a partir de cada mostra exemplificada per la mostra aDNA1.

A continuació, es va fer una primera quantificació dels extractes per espectrofotometria NanoDrop (Thermo Fisher Scientific NanoDrop ND-1000), ja que els àcids nucleics tenen una absorbància màxima de llum ultraviolada a 260 nm, de forma que com més llum absorbeixi la mostra, més quantitat de material genètic contindrà. Si l'absorbància de l'extracte a aquesta longitud d'ona és major que 0,1 es considera que els resultats

obtinguts són fiables. També són d'interès els paràmetres A260/A230 i A260/A280 que l'aparell calcula a partir de l'absorbància de la mostra a les longituds d'ona 230 nm, 260 nm i 280 nm i que són informatius sobre la seva puresa. Això és perquè a 230 nm hi poden absorbir substàncies orgàniques contaminants i a 280 nm hi absorbeixen les proteïnes. Es considera que l'extracte d'ADN és pur si les ràtios A260/A280 i A260/A230 es troben entre 1,70-2,00 i 2,00-2,20 respectivament (Cullen i Hirsch, 1998; Wilfinger et al., 1997).

Posteriorment, es quantificà el material mitjançant una PCR quantitativa a temps real. S'usà el kit Quantifiler® Human DNA Quantification Kit d'Applied Biosystems que utilitza primers per amplificar el gen nuclear hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*). Es van amplificar per triplicat tots els extractes i un control negatiu per assegurar que els resultats fossin vàlids i que no s'haguera produït contaminació. Per tal de fer la recta estàndard es van carregar per triplicat 8 dilucions seriades a partir d'un ADN estoc de concentració 200 ng/μL seguint el patró recollit a la *Taula 6* i el protocol descrit per Quantifiler® Human and Y Human Male DNA Quantification Kits.

Concentració estàndard (ng/μl)
50,000
16,700
5,560
1,850
0,620
0,210
0,068
0,023

Taula 6. Concentracions de la recta estàndard.

S'utilitzaren dues tècniques per a quantificar el material genètic perquè, mentre que l'espectrofotometria és una tècnica molt ràpida que ofereix informació addicional sobre la puresa de l'ADN, no permet amplificar de forma específica el material genètic humà i és menys sensible que la PCR quantitativa. I és que l'aparell NanoDrop emprat té un límit de detecció de 2 ng/μl mentre que el kit emprat per la PCR quantitativa permet detectar concentracions d'ADN inferiors a 16 pg/μl.

4. Resultats

A la *Figura 8* es poden observar els espectres ATR-FTIR de les dentines de les 6 peces dentals estudiades i a la *Taula 7* es recullen els diferents paràmetres diagenètics calculats per cada mostra. A la *Taula 8* s'hi recopilen els paràmetres calculats per Del Valle Blanco (2021) a partir de 3 dentines modernes (Ind.2, Ind.3 i Ind.4) i que s'han pres de referència perquè es consideren comparables als d'aquest treball, ja que es van calcular seguint el mateix protocol d'ATR-FTIR descrit anteriorment.

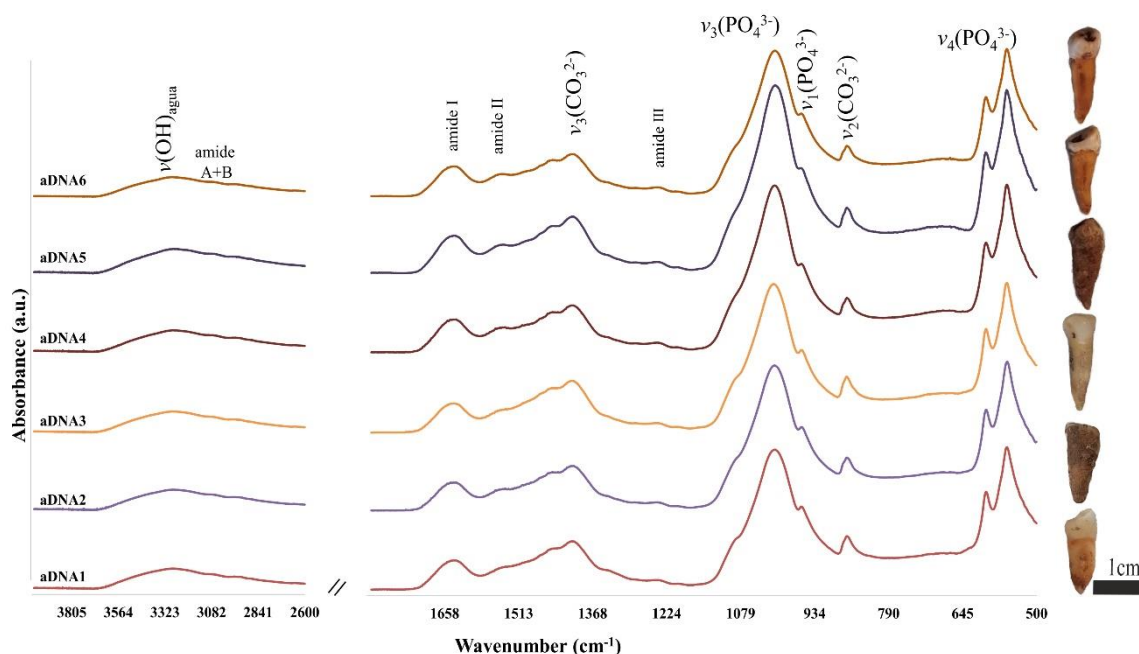


Figura 8. Espectre ATR-FTIR de les 6 mostres dentals analitzades.

Mostra	Aml/PO ₄	IRSF	C/P	Aml/C ₁	Aml/C ₂	FWHM	N. wt% estimat	Col. wt% estimat
aDNA1	0,113 ±0,002	3,797 ±0,023	0,311 ±0,005	0,555 ±0,008	1,129 ±0,012	85,551 ±1,290	2,64	14,46
aDNA2	0,101 ±0,000	3,824 ±0,004	0,279 ±0,001	0,513 ±0,063	1,066 ±0,150	86,983 ±0,073	2,39	13,11
aDNA3	0,110 ±0,008	3,823 ±0,092	0,344 ±0,022	0,500 ±0,007	1,037 ±0,072	87,634 ±1,642	2,58	14,15
aDNA4	0,106 ±0,006	3,632 ±0,034	0,256 ±0,021	0,644 ±0,011	1,347 ±0,012	86,837 ±3,242	2,49	13,65
aDNA5	0,102 ±0,001	3,576 ±0,045	0,263 ±0,002	0,600 ±0,001	1,279 ±0,016	86,855 ±1,488	2,41	13,23
aDNA6	0,107 ±0,000	3,634 ±0,009	0,252 ±0,005	0,664 ±0,017	1,406 ±0,009	84,296 ±0,134	2,52	13,81

Taula 7. Taula amb els resultats dels paràmetres diagenètics calculats (mean ± SD). Els percentatges de pes estimat de nitrogen (N.wt% estimat) i els percentatges de pes estimat de col·lagen (Col.wt% estimat) s'han calculat seguint el mètode descrit a Lebon et al. (2016): Nitrogen wt%= 20,6 Aml/PO₄ + 0,31; Col·lagen wt%= 113,13 Aml/PO₄ + 1,69.

Mostra	Aml/PO ₄	IRSF	C/P	Aml/C ₁	Aml/C ₂	FWHM	N. wt% estimat	Col. wt% estimat
Ind.2	0,129 ±0,013	3,321 ±0,035	0,222 ±0,030	0,928 ±0,017	1,821 ±0,090	110,038 ±0,065	2,97	16,29
Ind.3	0,140 ±0,007	3,333 ±0,038	0,189 ±0,001	0,958 ±0,017	1,656 ±0,162	96,428 ±0,033	3,19	17,49
Ind.4	0,137 ±0,001	3,327 ±0,041	0,205 ±0,030	0,950 ±0,015	1,943 ±0,116	96,457 ±0,086	3,12	17,14

Taula 8. Taula amb els resultats dels paràmetres diagenètics de referència (mean ± SD). Modificada de Del Valle Blanco, 2021.

Els valors del paràmetre Aml/PO₄ informen sobre la preservació de la matriu orgànica de la dent, ja que la banda Amida I és característica del col·lagen tipus I, la proteïna majoritària. Les dentines analitzades presenten valors entre 0,101 i 0,113, lleugerament disminuïts respecte dels valors de les de referència (0,129-0,140). De totes maneres, l'estimació del col·lagen es troba entre un 13,11 % i 14,46 % en pes, indicant una petita pèrdua d'aquesta proteïna si es compara amb les estimacions de les dentines modernes (16,29-17,49 %). Pel que fa al càlcul del percentatge en pes de nitrogen i, en vista de les estimacions de les dentines que es prenen com a referència (2,97-3,19 %), el contingut de nitrogen de les mostres antigues també es troba una mica disminuït (2,39-2,64 %).

L'IRSF (Infrared Splitting Factor) és un paràmetre informatiu sobre la cristal·linitat, és a dir, sobre l'ordre i la mida dels cristalls de bioapatita. Les dentines analitzades presenten un IRSF comprès entre 3,576 i 3,824, lleugerament augmentat respecte de l'IRSF de les modernes (3,321-3,333). Pel que fa al paràmetre C/P, ofereix informació sobre el contingut dels ions carbonats tipus B, que són aquells que substitueixen els ions fosfats de l'estructura cristal·lina. Les mostres antigues presenten valors compresos entre 0,252 i 0,344, que són majors que els de les dentines modernes de referència (0,189-0,222).

El FWHM (Full Width at Half Maximum) es calcula pel pic principal del contingut de fosfats v₃(PO₄) i és informatiu de l'estabilitat de la xarxa cristal·lina de la bioapatita. En el cas de les dentines analitzades (84,296-87,634) està disminuït respecte de les mostres modernes preses de referència (96,428-110,038). Finalment, els paràmetres Aml/C₁ i Aml/C₂ relacionen la matriu orgànica i inorgànica. Les dentines analitzades presenten valors disminuïts (0,500-0,664 i 1,037-1,406) respecte de les modernes (0,928-0,958 i 1,656-1,943).

Els resultats de la quantificació per espectrofotometria NanoDrop es recullen a la *Taula 9*. Els valors corresponen a la mitjana aritmètica de les diverses mesures preses per cada extracte, prèviament havent exclòs els *outliers* fent una anàlisi gràfica amb un *boxplot* mitjançant el programa R (veure *Annex, Figura 9*).

S'ha quantificat material genètic en tots els extractes, però no es pot assegurar que sigui aDNA pur. Això és perquè en cap de les mostres les dues ràtios A260/A280 i A260/A230 s'engloben dins els rangs d'absorbància considerats com a bons indicadors de la puresa del material genètic. A més a més, apareix quantificació als controls negatius d'extracció, i això és indicador de contaminació. També val a dir que en la majoria d'extractes l'absorbància a 260 nm es troba per sota dels 0,10 i, per tant, no es pot assegurar la fiabilitat dels resultats.

Mostra	A260/A280	A260/A230	A260 (nm)	Concentració (ng/μl)
aDNA1	1,13 ± 0,13	0,45 ± 0,14	0,08 ± 0,02	3,97 ± 1,25
aDNA1-	1,05 ± 0,08	0,29 ± 0,64	0,10 ± 0,05	4,88 ± 2,68
aDNA1i	5,61	0,04	0,17	8,30
aDNA2	1,22 ± 0,25	0,57 ± 0,03	0,10 ± 0,01	5,19 ± 0,27
aDNA2-	1,31 ± 0,11	0,70 ± 0,07	0,19 ± 0,12	9,47 ± 5,96
aDNA2i	1,16	0,14	0,06	3,07
aDNA3	0,38 ± 1,95	0,55 ± 0,31	0,09 ± 0,07	4,62 ± 3,59
aDNA3-	0,63 ± 1,09	0,53 ± 0,47	0,12 ± 0,09	6,06 ± 4,63
aDNA3i	1,33	0,17	0,08	4,13
aDNA4	1,37 ± 0,71	0,44 ± 0,23	0,05 ± 0,03	2,64 ± 1,29
aDNA4-	0,83 ± 0,64	0,48 ± 0,47	0,06 ± 0,06	2,98 ± 3,23
aDNA4i	1,81	0,06	0,07	3,30
aDNA5	1,36 ± 0,13	0,51 ± 0,01	0,09 ± 0,01	4,67 ± 0,48
aDNA5-	-4,48 ± 10,33	0,42 ± 0,56	0,07 ± 0,05	3,69 ± 2,51
aDNA5i	1,72	0,10	0,25	12,52
aDNA6	1,43 ± 0,12	0,45 ± 0,03	0,13 ± 0,01	6,50 ± 0,44
aDNA6-	1,68 ± 0,69	0,61 ± 0,18	0,07 ± 0,01	3,42 ± 0,75
aDNA6i	1,37	0,08	0,16	8,06

Taula 9. Resultats de la quantificació per NanoDrop (mean ± SD).

Els valors de la quantificació mitjançant PCR quantitativa es recullen a la *Taula 10* i corresponen a la mitjana aritmètica de la concentració dels triplicats de cada extracte, estimada a partir d'una recta estàndard amb pendent -3,0969 i $R^2 = 0,9981$ (veure *Annex, Figura 10*) i prèviament exclosos possibles *outliers* fent una anàlisi gràfica amb

boxplots mitjançant el programa R (veure *Annex, Figura 11*). Un test ANOVA d'un factor amb $p < 0,05$ indica que no hi ha diferències significatives entre les mitjanes aritmètiques d'ADN recuperat per cada extracte (veure *Annex, Taula 11*). Així, es pot afirmar que no s'observen diferències estadísticament significatives entre les concentracions d'ADNa dels diferents extractes.

No s'ha amplificat material genètic en els controls negatius de PCR (no reflectits a la *Taula 10*) i d'extracció (reflectits a la *Taula 10* com aDNA-), per tant, es pot afirmar que ni els reactius ni els extractes d'aDNA- estan contaminats per ADN. En la majoria d'extractes no s'ha aconseguit amplificar material genètic i convé tenir present que en els extractes on sí que s'ha aconseguit, només ha sigut possible fer-ho en un dels triplicats.

Mostra	Concentració (ng/μl)	Concentració (ng/mg os)
aDNA1	0,00016 ± 0,00028	0,04957 ± 0,02862
aDNA1-	0,00000	0,00000
aDNA1i	0,00000	0,00000
aDNA2	0,00000	0,00000
aDNA2-	0,00000	0,00000
aDNA2i	0,00000	0,00000
aDNA3	0,00005 ± 0,00009	0,00579 ± 0,00334
aDNA3-	0,00000	0,00000
aDNA3i	0,00104 ± 0,00180	0,11981 ± 0,06917
aDNA4	0,00043 ± 0,00074	0,07111 ± 0,04105
aDNA4-	0,00000	0,00000
aDNA4i	0,00936 ± 0,01621	1,55040 ± 0,89513
aDNA5	0,00000	0,00000
aDNA5-	0,00000	0,00000
aDNA5i	0,00000	0,00000
aDNA6	0,00000	0,00000
aDNA6-	0,00000	0,00000
aDNA6i	0,00000	0,00000

Taula 10. Resultats de la quantificació per PCR quantitativa (mean ± SD).

5. Discussió

Els estudis d'ADNa permeten profunditzar en els coneixements sobre l'evolució humana per investigar des de la composició genètica de l'*Homo sapiens* modern fins a les relacions entre les poblacions antigues. Però l'obtenció del material genètic antic a partir de restes esquelètiques implica la destrucció de la mostra i, a més a més, les possibilitats d'èxit es veuen reduïdes a causa dels processos de diagènesi òssia que poden afectar la supervivència de l'ADN. Per això, és interessant poder fer anàlisis de *pre-screening* que permetin seleccionar les mostres que hagin conservat millor el material genètic.

En aquest treball s'han calculat 6 paràmetres diagenètics per a 6 mostres dentals humanes de la Cova dels Xaragalls, de les quals també s'ha intentat extreure i quantificar ADNa per relacionar la preservació de la matriu esquelètica amb la del material genètic. A través dels paràmetres calculats a partir de les anàlisis d'ATR-FTIR, sembla que tant la matriu inorgànica com orgànica de les dentines estudiades de la Cova dels Xaragalls estan relativament ben preservades. L'estimació de col·lagen és menor respecte de les mostres modernes, indicant que hi ha certa pèrdua diagenètica d'aquesta proteïna, però que es segueix trobant dins dels límits de la bona preservació orgànica (Kontopoulos et al., 2019; Weiner i Bar-Yosef, 1990). D'acord amb Bocherens et al. (2005), que l'estimació del contingut de nitrogen en totes les mostres analitzades es trobi per sobre del 0,4 % també és indicatiu de la conservació de col·lagen, mentre que Lebon et al. (2016) estableixen el límit a 0,7 %. Per tant, malgrat la falta de consens entre autors deguda als diferents contextos estudiats, sembla que atenent a l'estimació de nitrogen, les mostres haurien de preservar col·lagen. Segons alguns autors (Kontopoulos et al. (2020), Sosa et al. (2013)) la preservació del col·lagen pot ser un bon indicador de la preservació d'ADN. Aleshores, si la supervivència d'aquesta proteïna és un bon predictor de la conservació d'ADN, com que totes les dentines presenten una estimació de col·lagen > 12 %, seguint els criteris proposats pels autors anteriors, les mostres podrien conservar material genètic amplificable.

Trueman et al. (2004, 2008) trobaren que la matriu orgànica es relaciona de forma inversa amb l'IRSF, ja que la deterioració de les fibres de col·lagen deixa espai per la recristal·lització de la bioapatita en cristalls d'una major mida. Les dentines arqueològiques presenten un creixement moderat dels cristalls respecte a les dentines

modernes, indicat per un augment modest de l'IRSF. Això era esperable a causa de la deterioració moderada de col·lagen que presenten, tal com s'ha mencionat anteriorment. Kontopoulos et al. (2020) han vist que, almenys en els jaciments que ells han estudiat, valors d'IRSF $\leq 3,7$ són indicadors d'una bona preservació inorgànica així com de la supervivència del material genètic. Però els IRSF de les dentines estudiades es troben molt propers al límit proposat per aquests autors, així que, tot i que presenten valors de bona preservació cristal·lina, aquest paràmetre podria indicar que les mostres arqueològiques de la Cova dels Xaragalls podrien presentar problemes en l'obtenció de quantitats amplificables d'ADNa.

La reducció dels valors del FWHM també ens informa d'un cert augment de la cristal·linitat per la pèrdua de grups fosfats de la xarxa cristal·lina, però, tal com s'ha indicat abans, els cristalls de bioapatita presenten una bona conservació (Hollund, 2013). A més a més, dins d'aquest paràmetre s'hi recull tota la informació dels grups fosfats principals continguts en la mostra dental, és a dir, també aquells relatius als enllaços fosfodièster. Per això, una disminució d'aquest índex pot relacionar-se amb el deteriorament d'aquests enllaços i la mala conservació de l'ADNa.

L'augment del paràmetre C/P que presenten les dentines antigues és causat per l'absorció d'ions carbonats tipus B i sol relacionar-se amb la deposició de calcita sobre les restes fòssils esquelètiques. En aquest cas, però, no s'ha registrat absorció a la banda a 712 cm^{-1} corresponent a la freqüència de vibració $\nu_4(\text{CO}_3)$ i relacionada amb la calcita, i això indica que s'ha produït una absorció d'ions carbonats exògens durant la fossilització (Sponheimer i Lee-Thorp, 1999). Aquests ions substitueixen els grups fosfats a la xarxa cristal·lina, però no es relacionen directament amb la deposició de calcita. Segons Kontopoulos et al. (2020) valors $\geq 0,13$ pel paràmetre C/P són bons indicadors de la preservació de l'ADN. De totes maneres, la relació és complexa i és que en el seu estudi, la majoria de mostres que preservaven ADN amplificable presentaven valors de C/P entre 0,13 i 0,25 (com les dentines modernes de referència), mentre que les mostres amb un índex C/P proper a 0,3 (com és el cas de les dentines arqueològiques d'aquest treball) presentaven menys conservació de l'ADN. Això sembla indicar que hi ha certa problemàtica en la conservació de l'ADNa relacionada amb l'augment dels grups carbonats. Seguint a Kontopoulos et al. (2019, 2020), Mrevlishvili i Svintradze (2005) i

Del Valle Blanco (2021), sembla que els grups carbonats tenen alguna relació amb la degradació de l'ADN, ja que en els seus treballs han observat una correlació del contingut d'ADN amb els índexs Aml/C₁, Aml/C₂ i C/P. Però aquesta relació actualment encara no està del tot clara.

Finalment, la disminució dels paràmetres Aml/C₁ i Aml/C₂ és compatible amb la lleugera degradació orgànica i l'enriquiment en carbonats B que indicaven els paràmetres anteriors, però segueixen trobant-se dins els rangs de la conservació de les peces dentals. Seguint els límits proposats per Kontopoulos et al. (2020), que totes les dentines analitzades presentin valors d'Aml/C₁ ≥ 0,1 i Aml/C₂ ≥ 0,2 és un bon indicador de la preservació de la matriu orgànica, donant suport als resultats que ens oferien els altres paràmetres diagenètics estudiats, almenys pel que fa a la preservació de proteïnes de la dent.

Aleshores, sembla que atenent a la bona preservació orgànica de les mostres, haurien de preservar material genètic mentre que, pel que fa a la cristal·linitat i al contingut de carbonats tipus B, la relació amb l'ADN no està tan clara. Per comprovar-ho, s'ha intentat extreure i quantificar material genètic comparant diverses modificacions del protocol DNA IQ™ System. Però en aquest punt s'han trobat diferents problemàtiques. L'espectrofotometria NanoDrop indica que els extractes d'ADNa no són purs i la PCR quantitativa només ha amplificat material genètic en un triplicat de 5 dels 18 extractes analitzats. Pel que fa a la comparació de les diferents modificacions del protocol d'extracció d'ADN, malgrat que s'ha fet una anàlisi ANOVA d'un factor que ja indica que no s'observen diferències estadísticament significatives en l'ADN recuperat segons les condicions de predigestió, com que no ha sigut possible quantificar de forma adequada ADNa per a tots els extractes, no es pot concloure si hi ha alguna condició que sigui millor que la resta o si la reextracció del pellet permet recuperar més material genètic que l'extracció normal.

En vista dels resultats de la quantificació per absorbància NanoDrop i tenint present que en la majoria de mostres les ràtios A260/A280 i A260/A230 estan per sota de l'esperat en material genètic pur, podríem hipotetitzar que les mostres estan contaminades per proteïnes (que presenten una absorbància màxima a 280 nm) o altres substàncies que absorbeixin a una longitud d'ona diferent que els àcids nucleics. Un d'aquests

contaminants són els àcids húmics, consistents a matèria orgànica que absorbeix en l'espectre ultraviolat. Malgrat que no hi ha consens acadèmic respecte a l'espectre d'absorció que tenen, la disminució dels coeficients A260/A230 sembla ser indicativa de la seva presència (Cullen i Hirsch, 1998; Zipper et al., 2003). També pot ser que la lectura d'absorbància s'hagués vist alterada per la presència de material genètic modern o perquè no es va descontaminar bé l'aparell entre lectures. De totes maneres, no es pot descartar que part de la quantificació pertanyi a la presència de material genètic antic. Pel que fa a la PCR quantitativa, que tan sols s'hagi amplificat material genètic en un dels triplicats en els extractes on s'ha obtingut quantificació sembla indicatiu de contaminació dels pouets amb material genètic modern durant la càrrega de la placa. Això és perquè és improbable que tan sols s'hagi quantificat ADN a en un dels triplicats si tots contenen el mateix volum provinent del mateix extracte i, a més a més, de forma visual es va assegurar que tots els pouets de la placa estiguessin carregats correctament.

Coneixent tot això, es poden formular 2 hipòtesis per explicar els resultats. La primera hipòtesi és que les dents hagin conservat material genètic antic, però que aquest, per contaminació o modificació química, no s'hagi pogut amplificar. La presència d'àcids húmics seria una explicació, ja que s'ha mencionat com aquests alteren la lectura espectrofotomètrica. Alguns estudis també han demostrat que es poden unir tant a l'ADN motlle com a l'ADN polimerasa impeding l'amplificació del material genètic (Matheson et al., 2010; Sutlovic et al., 2008). En els espectres d'ATR-FTIR els àcids húmics acostumen a presentar 2 pics característics: als 3450 cm^{-1} corresponent a les vibracions de tensió dels enllaços -OH i als 1640 cm^{-1} corresponent a les vibracions de tensió dels enllaços C=C de l'anell benzè i C=O dels aldehids i cetones (Niu et al., 2019; Stevenson i Goh, 1971). Aleshores, aquestes bandes presenten respectivament una superposició amb la banda corresponent a les vibracions dels enllaços -OH de l'aigua i a la banda corresponent a l'Amida I, però l'estudi dels espectres de les 6 mostres analitzades no sembla indicar la presència d'àcids húmics. A més a més, s'haurien d'haver eliminat durant el primer pas de neteja química i mecànica. De totes maneres, no es pot descartar que n'hagués quedat una mínima quantitat imperceptible per l'ATR-FTIR, que com totes les tècniques analítiques té un límit de detecció. Per això, seria interessant complementar les anàlisis d'ATR-FTIR amb tècniques més sensibles com la

micro-FTIR o la cromatografia, malgrat que la darrera és destructiva (Susic i Boto, 1989). Una altra possible explicació és que la modificació química de l'ADN inhibeixi l'amplificació del material genètic de les dents. I és que a causa de l'estrès oxidatiu, les pirimidines poden degradar-se en hidantoïnes que bloquegen l'activitat de l'ADN polimerasa (Fernández Domínguez, 2005; Redrejo-Rodríguez et al., 2011). Els espectres obtinguts tampoc semblen indicar la presència de bases modificades a l'ADN, però pot ser que sigui per manca de sensibilitat, ja que s'ha descrit que la millor tècnica per detectar-les és la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (Fernández Domínguez, 2005).

En qualsevol dels dos casos, com ja s'ha mencionat abans, l'amplificació d'ADN a algun dels triplicats de la PCR s'atribuiria a la contaminació dels pouets amb material genètic modern. Això indicaria dues coses. D'una banda, que part de la concentració obtinguda pel NanoDrop pot correspondre a ADNa i la resta a la interferència de contaminants. D'altra banda, que la inhibició de l'amplificació del material genètic antic s'hauria produït pel dany estructural de l'ADNa o per la presència dels àcids húmics. En el primer cas això justificaria que sí que es produeixi ampliació del material genètic modern contaminant no modificat. En el segon cas pot ser que els àcids húmics s'uneixin de forma específica a l'ADNa, però no al modern o que tinguin afinitat tant per l'ADN modern com per l'antic. Aleshores, l'alta concentració de material genètic modern respecte de l'antic i la presència d'una quantitat limitada d'àcids húmics permetrien que quedés alguna cadena d'ADN modern lliure d'àcids húmics i susceptible de ser amplificada. Pel que fa als paràmetres diagenètics estudiats, en aquest cas no es pot discutir la seva utilitat en la predicció de la conservació de material genètic, ja que si no és possible quantificar-lo no es pot saber si s'ha conservat o no.

La segona hipòtesi és que no s'hagi conservat ADNa. Això implicaria que la quantificació per NanoDrop es correspon a contaminacions de les mostres, a material genètic modern o a substàncies que contaminaven la instrumentació utilitzada. De la mateixa forma que en la hipòtesi anterior, l'amplificació d'ADN en algun dels triplicats indicaria que s'ha produït la contaminació dels pouets amb material genètic modern durant la preparació de la PCR quantitativa. Però en aquest supòsit sí que es pot discutir la utilitat dels

paràmetres diagenètics calculats en la predicció de la conservació del material genètic en les mostres estudiades.

A diferència del que proposen Sosa et al. (2013) i Kontopoulos et al. (2020), en aquest cas la conservació orgànica de col·lagen no es relacionaria positivament amb la preservació de l'ADN. Pel que fa als llimdars inorgànics suggerits pels mateixos Kontopoulos et al. (2020), sembla que ni l'augment del paràmetre C/P ni un IRSF $\leq 3,7$ prediuen correctament la presència de material genètic. Però ja s'ha introduït abans la problemàtica dels valors de C/P al voltant de 0,3 que presenten les dentines estudiades. En aquest supòsit, doncs, sí que semblaria que hi ha una relació entre l'enriquiment de les mostres en grups carbonats i la degradació de l'ADN tal com apuntaven Mrevlishvili i Svintradze (2005) i Del Valle Blanco (2021). Pel que fa a l'IRSF, podria ser que en les mostres de Xaragalls la cristal·linitat no sigui un bon indicador sobre la conservació de la matriu col·laginosa tal com proposaven Trueman et al. (2004). Això és perquè l'augment de grups carbonats en la bioapatita podria limitar el creixement dels seus cristalls a causa de la menor mida dels carbonats respecte dels fosfats, induint una sobrevaloració de l'estat de la matriu orgànica. Per tant, tal com ja apuntava Kontopoulos et al. (2019), podria ser que l'IRSF, de forma individual, no fos un bon paràmetre per avaluar la preservació de la matriu orgànica, ja que els cristalls presentarien poc creixement per l'abundància de grups carbonats, no perquè s'hagi conservat molt col·lagen.

Els resultats obtinguts són poc concloents, però convé recordar que l'ATR-FTIR és una tècnica que s'utilitza per fer un *pre-screening* orientatiu i que la bibliografia presa de referència per analitzar els paràmetres diagenètics es basa en estudis molt diversos, tant pel que fa al tipus de mostres esquelètiques com als contextos arqueològics avaluats. I és que, com ja apuntava Del Valle Blanco (2021), és molt important tenir present que cada mostra s'ha d'analitzar de forma particular en el seu context i que no és possible generalitzar.

De totes maneres, també convé tenir en compte que pot ser que el procés d'extracció d'ADN no hagi tingut èxit. De fet, el kit d'extracció usat en aquest estudi s'ha demostrat particularment útil en mostres òssies de fosses comunes dels anys noranta, però no en mostres esquelètiques arqueològiques recuperades de contextos de mala preservació (Andelinović et al., 2005). És possible que per a mostres antigues que es trobin sota

condicions diagenètiques especialment agressives sigui més adient utilitzar algun altre kit comercial. També cal contemplar la possibilitat que els extractes d'ADNa es degradessin durant la seva manipulació.

Sembla que Xaragalls presenta problemàtiques diagenètiques que ara mateix es desconeixen, però que impedeixen la recuperació d'ADN antic. Per descartar o confirmar la presència d'àcids húmics, en un futur es podrien fer anàlisis geoquímiques del sediment de la zona, que també permetrien conèixer en profunditat la seva composició i així ajudar a entendre com l'entorn afecta la diagènesi òssia de les mostres. En el cas que es confirmés l'existència d'àcids húmics, es proposen diferents solucions per augmentar les possibilitats de recuperar material genètic de peces esquelètiques d'aquesta cova. D'una banda, s'ha descrit exitosament la purificació d'extractes de material genètic mitjançant tècniques de cromatografia, però també s'ha vist que aquests passos de purificació causen certa pèrdua d'ADN (Matheson et al., 2010; Sidstedt et al., 2015). D'altra banda, Matheson et al. (2010) van demostrar que la pfu ADN polimerasa de l'arqueobacteri *Pyrococcus furiosus* es veu menys inhibida en presència d'àcids húmics que la taq ADN polimerasa usada en aquest estudi i produïda pel bacteri *Thermus aquaticus*. Per tant, el canvi de polimerasa també podria ser una solució. Finalment, altres autors suggereixen alternatives com augmentar la concentració de l'ADN polimerasa utilitzada o diluir l'extracte de material genètic (Sidstedt et al., 2015; Sutlovic et al., 2008; Zipper et al., 2003).

6. Conclusions

- No és possible descriure quina de les modificacions del mètode d'extracció és millor per recuperar ADN a causa de la impossibilitat de quantificar material genètic antic pur.
- Les restes dentàries de Xaragalls es caracteritzen per una bona preservació pel que fa a la cristal·linitat (IRSF, FWHM) i el contingut de col·lagen. De totes maneres, cal destacar l'enriquiment de les mostres en ions carbonats exògens. Per això es proposa prestar especial atenció al paràmetre C/P i als índexs que relacionen la matriu orgànica i els carbonats (A_{ml}/C_1 i A_{ml}/C_2) en les mostres de Xaragalls.
- No s'ha observat una relació clara entre la preservació de col·lagen tipus I, l'enriquiment de les mostres en carbonats, la cristal·linitat i el contingut d'ADN.
- En les mostres riques en grups carbonats de Xaragalls l'IRSF pot no ser un bon predictor de la preservació de la matriu orgànica.
- La tècnica ATR-FTIR permet avaluar la preservació orgànica i inorgànica de les mostres, però pot ser que no sigui la tècnica més sensible per detectar tant la presència d'àcids húmics en concentracions baixes com les modificacions en la seqüència de l'ADN. Es proposa complementar els estudis d'ATR-FTIR amb tècniques més sensibles com la cromatografia o la micro-FTIR.
- Es poden formular 2 hipòtesis:
 - No s'ha conservat l'ADN a les mostres. En aquest cas es pot teoritzar que, en el context arqueològic de la Cova dels Xaragalls, ni la conservació de col·lagen ni la preservació cristal·lina es relacionen de forma positiva amb la conservació de material genètic.
 - S'ha conservat ADN, però no s'ha pogut amplificar per presència d'àcids húmics o dany estructural de l'ADN.
- Cal estudiar cada context arqueològic individualment des d'una perspectiva de la diagènesi òssia, ja que s'ha vist com els paràmetres diagenètics proposats per la bibliografia existent no semblen directament aplicables a la Cova dels Xaragalls.
- Convé estudiar més mostres per extreure conclusions robustes.

7. Bibliografia

- Allentoft, M. E., Sikora, M., Refoyo-Martínez, A., Irving-Pease, E. K., Fischer, A., Barrie, W., Ingason, A., Stenderup, J., Sjögren, K.-G., Pearson, A., Mota, B., Paulsson, B. S., Halgren, A., Macleod, R., Jørkov, M. L. S., Demeter, F., Novosolov, M., Sørensen, L., Nielsen, P.-O., i Willerslev, E. (2022). *Population Genomics of Stone Age Eurasia*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2022.05.04.490594>
- Andelinović, S., Sutlovic, D., Ivkovic, I., Skaro, V., Ivkosić, A., Paic, F., Rezić, B., Definis-Gojanović, M., i Primorac, D. (2005). Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croatian medical journal*, 46, 530-539.
- Archibald, J. (2018). *Genomics: A Very Short Introduction*. Oxford: Oxford University Press.
- Barrio-Caballero, P. A. (2013). Revisión de métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos en el laboratorio forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 39(2), 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.reml.2012.11.002>
- Bocherens, H., Drucker, D., Billiou, D., i Moussa, I. (2005). Une nouvelle approche pour évaluer l'état de conservation de l'os et du collagène pour les mesures isotopiques (datation au radiocarbone, isotopes stables du carbone et de l'azote). *L'Anthropologie*, 109(3), 557-567. <https://doi.org/10.1016/j.anthro.2005.06.005>
- Bosch i Argilagós, J., Borrell, M., Garrido, A., i Museu d'Arqueologia de Catalunya. (Eds.). (2016). *La fi és el principi: Pràctiques funeràries a la Catalunya prehistòrica*. Museu d'Arqueologia de Catalunya, Arqueoxarxa, Departament de Cultura, Generalitat de Catalunya.
- Brown, T., i Brown, K. (2011). *Biomolecular Archaeology: An Introduction*. Hoboken, Nova Jersey: Wiley-Blackwell.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR markers* (2a ed). Cambridge, Estats Units: Elsevier Academic Press.
- Buzan, E., Potušek, S., Urzi, F., Pokorný, B., i Šprem, N. (2020). Genetic characterisation of wild ungulates: Successful isolation and analysis of DNA from widely available bones can be cheap, fast and easy. *ZooKeys*, 965, 141-156. <https://doi.org/10.3897/zookeys.965.54862>
- Calacal, G. C., Gallardo, B. G., Apaga, D. L. T., i De Ungria, M. C. A. (2021). Improved autosomal STR typing of degraded femur samples extracted using a custom demineralization buffer and DNA IQ™. *Forensic Science International: Synergy*, 3, 100131. <https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2020.100131>
- Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., i Gilbert, M. T. P. (2012). DNA in ancient bone – Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 194(1), 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.07.003>
- Chadefaux, C., Hô, A.-S. L., Bellot-Gurlet, L., i Reiche, I. (2009). Curve-Fitting Micro-ATR-FTIR Studies of the Amide I and II Bands of Type I Collagen In Archaeological Bone Materials. *E-Preservation Science*, 6, 129-137.
- Chandler, H., Sykes, B., i Zilhão, J. (2005). Using ancient DNA to examine genetic continuity at the Mesolithic-Neolithic transition in Portugal. A Arias, P., Ontañón, R., i García-Moncó, C. (Eds.) *Actas del III*

- Congreso del Neolítico en la Península Ibérica*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cantabria.
- Cullen, D. W., i Hirsch, P. R. (1998). Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(8), 983-993. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00001-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00001-7)
- Dabney, J., Meyer, M., i Pääbo, S. (2013a). Ancient DNA Damage. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), a012567. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012567>
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M.-T., Weihmann, A., Nickel, B., Valdiosera, C., García, N., Pääbo, S., Arsuaga, J.-L., i Meyer, M. (2013b). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(39), 15758-15763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314445110>
- Damgaard, P. B., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E., i Allentoft, M. E. (2015). Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Scientific Reports*, 5(1), 11184. <https://doi.org/10.1038/srep11184>
- Del Valle Blanco, H. (2021). *Evaluación de la preservación de ADN en restos óseos forenses y arqueológicos a través de espectroscopía* [Treball de Final de Màster, Universitat Rovira i Virgili]. A Repositori institucional URV
- Del Valle, H., Cáceres, I., Tornero, C., Burguet-Coca, A., Moclán, A., i Vergès, J. M. (2022). ATR-FTIR to distinguish Holocene fumier facies. A perspective from bone diagenesis at El Mirador cave (Sierra de Atapuerca, Spain). *Journal of Archaeological Science*, 141, 105582. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2022.105582>
- Der Sarkissian, C., Ermini, L., Jónsson, H., Alekseev, A. N., Crubezy, E., Shapiro, B., i Orlando, L. (2014). Shotgun microbial profiling of fossil remains. *Molecular Ecology*, 23(7), 1780-1798. <https://doi.org/10.1111/mec.12690>
- Duijs, F. E., i Sijen, T. (2020). A rapid and efficient method for DNA extraction from bone powder. *Forensic Science International: Reports*, 2, 100099. <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100099>
- Ellingham, S. T. D., Thompson, T. J. U., i Islam, M. (2016). The Effect of Soft Tissue on Temperature Estimation from Burnt Bone Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*, 61(1), 153-159. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12855>
- Fernández Domínguez, E. (2005). *Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea* [Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona]. A TDX (Tesis Doctorals en Xarxa).
- Fernández, E., Pérez-Pérez, A., Gamba, C., Prats, E., Cuesta, P., Anfruns, J., Molist, M., Arroyo-Pardo, E., i Turbón, D. (2014). Ancient DNA Analysis of 8000 B.C. Near Eastern Farmers Supports an Early Neolithic Pioneer Maritime Colonization of Mainland Europe through Cyprus and the Aegean Islands. *PLoS Genetics*, 10(6), e1004401. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004401>
- Gamba, C., Fernández, E., Tirado, M., Deguilloux, M. F., Pemonge, M. H., Utrilla, P., Edo, M., Molist, M., Rasteiro, R., Chikhi, L., i Arroyo-Pardo, E. (2012). Ancient DNA from an Early Neolithic Iberian population supports a pioneer colonization by first farmers. *Molecular Ecology*, 21(1), 45-56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05361.x>
- Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., McLaughlin, R. L., Gonzalez-Fortes, G.,

- Mattiangeli, V., Domboróczki, L., Kővári, I., Pap, I., Anders, A., Whittle, A., Dani, J., Raczky, P., Higham, T. F. G., Hofreiter, M., Bradley, D. G., i Pinhasi, R. (2014). Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications*, 5, 5257. <https://doi.org/10.1038/ncomms6257>
- Ginolhac, A., Vilstrup, J., Stenderup, J., Rasmussen, M., Stiller, M., Shapiro, B., Zazula, G., Froese, D., Steinmann, K. E., Thompson, J. F., AL-Rasheid, K. A., Gilbert, T. M., Willerslev, E., i Orlando, L. (2012). Improving the performance of true single molecule sequencing for ancient DNA. *BMC Genomics*, 13(1), 177. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-177>
- Haak, W., Brandt, G., Jong, H. N. de, Meyer, C., Ganslmeier, R., Heyd, V., Hawkesworth, C., Pike, A. W. G., Meller, H., i Alt, K. W. (2008). Ancient DNA, Strontium isotopes, and osteological analyses shed light on social and kinship organization of the Later Stone Age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(47), 18226-18231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807592105>
- Haak, W., Forster, P., Bramanti, B., Matsumura, S., Brandt, G., Tänzer, M., Villems, R., Renfrew, C., Gronenborn, D., Alt, K. W., i Burger, J. (2005). Ancient DNA from the First European Farmers in 7500-Year-Old Neolithic Sites. *Science, New Series*, 310(5750), 1016-1018. <https://doi.org/10.1126/science.1118725>
- Hansen, H. B., Damgaard, P. B., Margaryan, A., Stenderup, J., Lynnerup, N., Willerslev, E., i Allentoft, M. E. (2017). Comparing Ancient DNA Preservation in Petrous Bone and Tooth Cementum. *PLOS ONE*, 12(1), e0170940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170940>
- Haouchar, D., Haile, J., McDowell, M. C., Murray, D. C., White, N. E., Allcock, R. J. N., Phillips, M. J., Prideaux, G. J., i Bunce, M. (2014). Thorough assessment of DNA preservation from fossil bone and sediments excavated from a late Pleistocene–Holocene cave deposit on Kangaroo Island, South Australia. *Quaternary Science Reviews*, 84, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2013.11.007>
- Harney, É., Cheronet, O., Fernandes, D. M., Sirak, K., Mah, M., Bernardos, R., Adamski, N., Broomandkhoshbacht, N., Callan, K., Lawson, A. M., Oppenheimer, J., Stewardson, K., Zalzal, F., Anders, A., Candilio, F., Constantinescu, M., Coppa, A., Ciobanu, I., Dani, J., i Pinhasi, R. (2021). A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. *Genome Research*, 31(3), 472-483. <https://doi.org/10.1101/gr.267534.120>
- Hervella, M., Izagirre, N., Alonso, S., Fregel, R., Alonso, A., Cabrera, V. M., i de la Rúa, C. (2012). Ancient DNA from Hunter-Gatherer and Farmer Groups from Northern Spain Supports a Random Dispersion Model for the Neolithic Expansion into Europe. *PLoS ONE*, 7(4), e34417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034417>
- Higuchi, R., Bowman, B., Freiberger, M., Ryder, O. A., i Wilson, A. C. (1984). DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312(5991), 282-284. <https://doi.org/10.1038/312282a0>
- Hollund, H. I. (2013). *Diagenetic screening of bone samples: Tools to aid taphonomic and archaeometric investigations* [Tesi doctoral, Vrije Universiteit]. A Vrije Universiteit Amsterdam Research Portal
- Jakubowska, J., Maciejewska, A., i Pawłowski, R. (2012). Comparison of three methods of DNA extraction from human bones with different degrees of degradation. *International Journal of Legal*

- Medicine*, 126(1), 173-178.
<https://doi.org/10.1007/s00414-011-0590-5>
- Kendall, C., Eriksen, A. M. H., Kontopoulos, I., Collins, M. J., i Turner-Walker, G. (2018). Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 491, 21-37.
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2017.11.041>
- Kimura-Suda, H., i Ito, T. (2017). Bone quality characteristics obtained by Fourier transform infrared and Raman spectroscopic imaging. *Journal of Oral Biosciences*, 59(3), 142-145.
<https://doi.org/10.1016/j.job.2017.04.002>
- Kontopoulos, I., Penkman, K., McAllister, G. D., Lynnerup, N., Damgaard, P. B., Hansen, H. B., Allentoft, M. E., i Collins, M. J. (2019). Petrous bone diagenesis: A multi-analytical approach. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 518, 143-154.
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2019.01.005>
- Kontopoulos, I., Penkman, K., Mullin, V. E., Winkelbach, L., Unterländer, M., Scheu, A., Kreutzer, S., Hansen, H. B., Margaryan, A., Teasdale, M. D., Gehlen, B., Street, M., Lynnerup, N., Liritzis, I., Sampson, A., Papageorgopoulou, C., Allentoft, M. E., Burger, J., Bradley, D. G., i Collins, M. J. (2020). Screening archaeological bone for palaeogenetic and palaeoproteomic studies. *PLOS ONE*, 15(6), e0235146.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235146>
- Kontopoulos, I., Presslee, S., Penkman, K., i Collins, M. J. (2018). Preparation of bone powder for FTIR-ATR analysis: The particle size effect. *Vibrational Spectroscopy*, 99, 167-177.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2018.09.004>
- Kristiansen, K. (2014). Towards a New Paradigm? The Third Science Revolution and its Possible Consequences in Archaeology. *Current Swedish Archaeology*, 22(1), 11-34.
<https://doi.org/10.37718/CSA.2014.01>
- Lebon, M., Reiche, I., Gallet, X., Bellot-Gurlet, L., i Zazzo, A. (2016). Rapid Quantification of Bone Collagen Content by ATR-FTIR Spectroscopy. *Radiocarbon*, 58(1), 131-145.
<https://doi.org/10.1017/RDC.2015.11>
- Lee, E. J., Makarewicz, C., Renneberg, R., Harder, M., Krause-Kyora, B., Müller, S., Ostritz, S., Fehren-Schmitz, L., Schreiber, S., Müller, J., von Wurmb-Schwark, N., i Nebel, A. (2012). Emerging genetic patterns of the european neolithic: Perspectives from a late neolithic bell beaker burial site in Germany. *American Journal of Physical Anthropology*, 148(4), 571-579.
<https://doi.org/10.1002/ajpa.22074>
- Lee, E. J., Renneberg, R., Harder, M., Krause-Kyora, B., Rinne, C., Müller, J., Nebel, A., i von Wurmb-Schwark, N. (2014). Collective burials among agro-pastoral societies in later Neolithic Germany: Perspectives from ancient DNA. *Journal of Archaeological Science*, 51, 174-180.
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.08.037>
- Leskovar, T., Zupanič Pajnič, I., Geršak, Ž. M., Jerman, I., i Črešnar, M. (2020). ATR-FTIR spectroscopy combined with data manipulation as a pre-screening method to assess DNA preservation in skeletal remains. *Forensic Science International: Genetics*, 44, 102196.
<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102196>
- Loog, L., i Larson, G. (2019). Ancient DNA. A M. Richards i K. Britton (Eds.), *Archaeological Science: An Introduction* (1a ed., pp. 13-34). Cambridge, Regne Unit: Cambridge University Press.

- López-García, J. M., Blain, H.-A., Bennàsar, M., Euba, I., Bañuls, S., Bischoff, J., López-Ortega, E., Saladié, P., Uzquiano, P., i Vallverdú, J. (2012). A multiproxy reconstruction of the palaeoenvironment and palaeoclimate of the Late Pleistocene in northeastern Iberia: Cova dels Xaragalls, Vimbodí-Poblet, Paratge Natural de Poblet, Catalonia: Palaeoenvironment and palaeoclimate of the Late Pleistocene, NE Iberia. *Boreas*, 41(2), 235-249. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3885.2011.00234.x>
- López Soto, M. (2020). Análisis de ADN mitocondrial. A M. C., Crespillo Márquez, M. C. i P. A. Barrio Caballero, P.A. (Eds.). *Genética forense: Del laboratorio a los tribunales* (pp.241-268). Madrid: Ediciones Díaz de Santos
- Loreille, O. M., Diegoli, T. M., Irwin, J. A., Coble, M. D., i Parsons, T. J. (2007). High efficiency DNA extraction from bone by total demineralization. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 191-195. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.02.006>
- Madupalli, H., Pavan, B., i Tecklenburg, M. M. J. (2017). Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. *Journal of Solid State Chemistry*, 255, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.07.025>
- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., i Lehto, R. (2010). Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3, 38-45.
- Meyer, M., Arsuaga, J.-L., de Filippo, C., Nagel, S., Aximu-Petri, A., Nickel, B., Martínez, I., Gracia, A., de Castro, J. M. B., Carbonell, E., Viola, B., Kelso, J., Prüfer, K., i Pääbo, S. (2016). Nuclear DNA sequences from the Middle Pleistocene Sima de los Huesos hominins. *Nature*, 531(7595), 504-507. <https://doi.org/10.1038/nature17405>
- Mrevlishvili, G. M., i Svintradze, D. V. (2005). DNA as a matrix of collagen fibrils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36(5), 324-326. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.07.006>
- Niu, H., Yang, H., Tong, L., Zhong, S., i Liu, Y. (2019). Spectral study of humic substance extract from pressurized oxidizing slag of Carlin-typed gold deposit. *Journal of Physics: Conference Series*, 1347(1), 012027. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1347/1/012027>
- Olalde, I., Mallick, S., Patterson, N., Rohland, N., Villalba-Mouco, V., Silva, M., Dulias, K., Edwards, C. J., Gandini, F., Pala, M., Soares, P., Ferrando-Bernal, M., Adamski, N., Broomandkhoshbacht, N., Cheronet, O., Culleton, B. J., Fernandes, D., Lawson, A. M., Mah, M., i Reich, D. (2019). The genomic history of the Iberian Peninsula over the past 8000 years. *Science*, 363(6432), 1230-1234. <https://doi.org/10.1126/science.aav4040>
- Orlando, L., Allaby, R., Skoglund, P., Der Sarkissian, C., Stockhammer, P. W., Ávila-Arcos, M. C., Fu, Q., Krause, J., Willerslev, E., Stone, A. C., i Warinner, C. (2021). Ancient DNA analysis. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1), 14. <https://doi.org/10.1038/s43586-020-00011-0>
- Pääbo, S. (1985). Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*, 314(6012), 644-645. <https://doi.org/10.1038/314644a0>
- Pal Chowdhury, M., Choudhury, K. D., Bouchard, G. P., Riel-Salvatore, J., Negrino, F., Benazzi, S., Slimak, L., Frasier, B., Szabo, V., Harrison, R., Hambrecht, G., Kitchener, A. C., Wogelius, R. A., i Buckley, M. (2021). Machine learning ATR-FTIR spectroscopy data for the screening of collagen for ZooMS

- analysis and mtDNA in archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 126, 105311. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2020.105311>
- Paredes Herrera, M. (2020). Técnicas actuales de extracción de ADN en genética forense. A M. C., Crespillo Márquez, M. C. i P. A. Barrio Caballero, P.A. (Eds.). *Genética forense: Del laboratorio a los tribunales* (pp.107-132) Madrid: Ediciones Díaz de Santos
- Parker, C., Rohrlach, A. B., Friederich, S., Nagel, S., Meyer, M., Krause, J., Bos, K. I., i Haak, W. (2020). A systematic investigation of human DNA preservation in medieval skeletons. *Scientific Reports*, 10(1), 18225. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75163-w>
- Pasteris, J. D., Yoder, C. H., i Wopenka, B. (2014). Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key to a better understanding of bone mineral. *American Mineralogist*, 99(1), 16-27. <https://doi.org/10.2138/am.2014.4627>
- Pokines, J. T., L'Abbé, E. N., i Symes, S. A. (Eds.) (2021). *Manual of Forensic Taphonomy* (2a ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Redrejo-Rodríguez, M., Saint-Pierre, C., Couve, S., Mazouzi, A., Ishchenko, A. A., Gasparutto, D., i Saporbaev, M. (2011). New Insights in the Removal of the Hydantoins, Oxidation Product of Pyrimidines, via the Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways. *PLoS ONE*, 6(7), e21039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021039>
- Rohland, N., i Hofreiter, M. (2007a). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756-1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Rohland, N., i Hofreiter, M. (2007b). Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*, 42(3), 343-352. <https://doi.org/10.2144/000112383>
- Rojo Guerra, M., Garrido-Pena, R., i García-Martínez de Lagrán, Í. (Eds.). (2018). *El neolítico en la península ibérica y su contexto europeo* (2a. edición). Madrid: Cátedra.
- Rovira Port, J. (1978). Notas sobre las cavidades sepulcrales de la Edad del Bronce en Cataluña. *Cypsela*, 2, 49-53.
- Sampietro, M. L., Lao, O., Caramelli, D., Lari, M., Pou, R., Martí, M., Bertranpetit, J., i Lalueza-Fox, C. (2007). Palaeogenetic evidence supports a dual model of Neolithic spreading into Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1622), 2161-2167. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0465>
- Sandholzer, M. (2010). *Micro-CT analysis of human teeth after exposure to controlled thermal stress* [Treball de Final de Màster, Universitat Wien]. A <https://theses.univie.ac.at/>
- Schotsmans, E. M. J., Márquez-Grant, N., i Forbes, S. L. (Eds.). (2017). *Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment*. Chichester, Regne Unit: John Wiley & Sons.
- Schwarz, C., Debruyne, R., Kuch, M., McNally, E., Schwarcz, H., Aubrey, A. D., Bada, J., i Poinar, H. (2009). New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3215-3229. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp159>
- Scorrano, G., Valentini, F., Martínez-Labarga, C., Rolfo, M. F., Fiammenghi, A., Lo Vetro, D., Martini, F., Casoli, A., Ferraris, G., Palleschi, G., Palleschi, A., i Rickards, O. (2015). Methodological strategies to assess the degree of bone preservation for ancient

- DNA studies. *Annals of Human Biology*, 42(1), 10-19. <https://doi.org/10.3109/03014460.2014.954614>
- Sidstedt, M., Jansson, L., Nilsson, E., Noppa, L., Forsman, M., Rådström, P., i Hedman, J. (2015). Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 487, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.07.002>
- Simón, M., Jordana, X., Armentano, N., Santos, C., Díaz, N., Solórzano, E., López, J. B., González-Ruiz, M., i Malgosa, A. (2011). The presence of nuclear families in prehistoric collective burials revisited: The bronze age burial of montanissell cave (Spain) in the light of aDNA. *American Journal of Physical Anthropology*, 146(3), 406-413. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21590>
- Snoeck, C., Lee-Thorp, J. A., i Schulting, R. J. (2014). From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 416, 55-68. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.08.002>
- Soriano, I., i Amorós, J. (2015). El vaso geminado de Cova dels Assedegats (Vimbodí i Poblet, Conca de Barberà, Tarragona). Adenda a Soriano y Amorós (2014). *Revista d'arqueologia de Ponent*, 25, 329-333.
- Sosa, C., Vispe, E., Núñez, C., Baeta, M., Casalod, Y., Bolea, M., Hedges, R. E. M., i Martínez-Jarreta, B. (2013). Association between ancient bone preservation and dna yield: A multidisciplinary approach: Bone Preservation and DNA Yield. *American Journal of Physical Anthropology*, 151(1), 102-109. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22262>
- Sponheimer, M., i Lee-Thorp, J. A. (1999). Alteration of Enamel Carbonate Environments during Fossilization. *Journal of Archaeological Science*, 26(2), 143-150. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0293>
- Stevenson, F. J., i Goh, K. M. (1971). Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 35(5), 471-483. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(71\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(71)90044-5)
- Susic, M., i Boto, K. G. (1989). High-performance liquid chromatographic determination of humic acid in environmental samples at the nanogram level using fluorescence detection. *Journal of Chromatography*, 482(1), 175-187. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)93218-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)93218-2)
- Sutlovic, D., Gamulin, S., Definis-Gojanovic, M., Gugic, D., i Andjelinovic, S. (2008). Interaction of humic acids with human DNA: Proposed mechanisms and kinetics. *Electrophoresis*, 29(7), 1467-1472. <https://doi.org/10.1002/elps.200700699>
- Trueman, C. N. G., Behrensmeyer, A. K., Tuross, N., i Weiner, S. (2004). Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: Diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *Journal of Archaeological Science*, 31(6), 721-739. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2003.11.003>
- Trueman, C. N., Privat, K., i Field, J. (2008). Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266(3-4), 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2008.03.038>
- Vallverdú, J. (2019). *Memòria de la intervenció arqueològica a la Cova dels Xaragalls (Vimbodí – Poblet, Conca de*

Barberà) (Número d'expedient: 437 K121 N-935 2019-1-23330). Institut Català de Paleoeologia Humana i Evolució Social.

Vallverdú, J. (2020). *Memòria de la intervenció arqueològica a la Cova dels Xaragalls (Vimbodí – Poblet, Conca de Barberà)* (Número d'expedient: 437 K121 N935 2020-1-27890). Institut Català de Paleoeologia Humana i Evolució Social.

Vilaseca, S. (1954). Nuevos yacimientos tarraconenses de cerámica acanalada. *Instituto de estudios tarraconenses 'Ramón Berenguer IV'*. 49–52.

Weiner, S. (2010). *Microarchaeology: Beyond the visible archaeological record*. Nova York: Cambridge University Press.

Weiner, S., i Bar-Yosef, O. (1990). States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey. *Journal of Archaeological Science*, 17(2), 187-196. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(90\)90058-D](https://doi.org/10.1016/0305-4403(90)90058-D)

White, T. D., i Folkens, P. A. (2005). *The human bone manual*. Boston: Elsevier Academic.

Wilfinger, W. W., Mackey, K., i Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474-476, 478-481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>

Wright, L. E., i Schwarcz, H. P. (1996). Infrared and Isotopic Evidence for Diagenesis of Bone Apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary Implications. *Journal of Archaeological Science*, 23(6), 933-944. <https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0087>

Zipper, H., Buta, C., Lämmle, K., Brunner, H., Bernhagen, J., i Vitzthum, F. (2003). Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Research*, 31(7), e39.

8. Annex

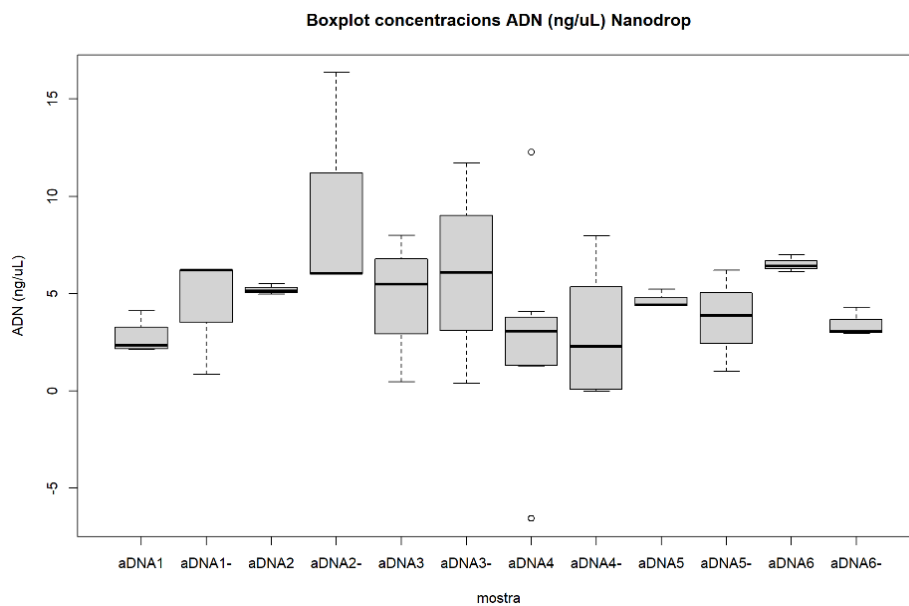


Figura 9. Boxplot de les diferents mesures per NanoDrop de la concentració d'ADN de cada extracte. No s'hi inclouen els extractes ADN i perquè només va ser possible fer una quantificació.

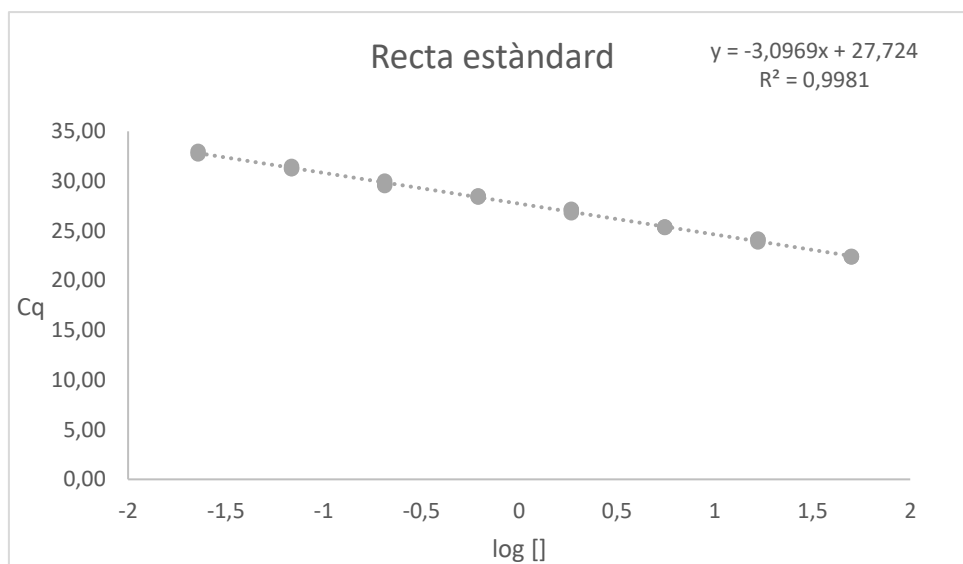


Figura 10. Recta estàndard.

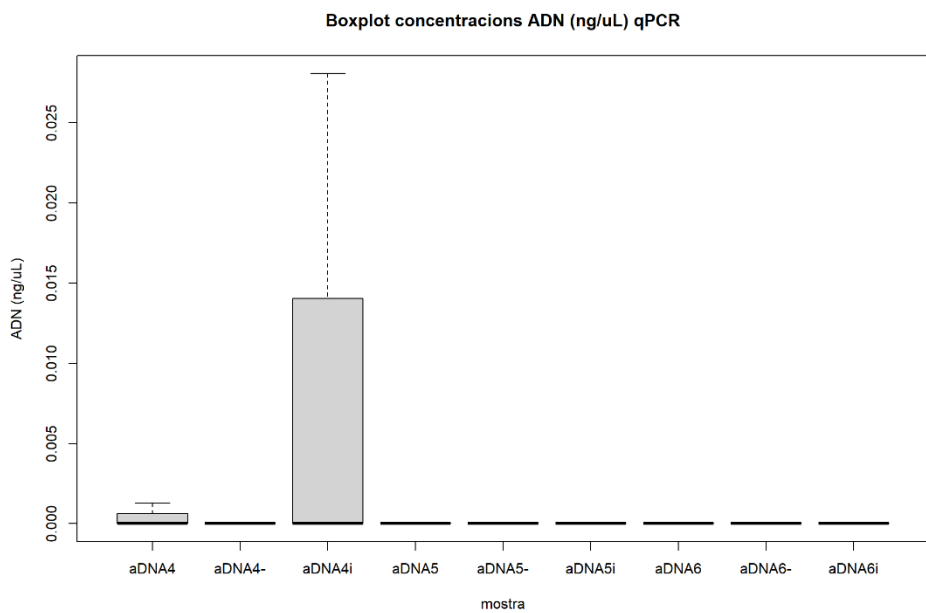
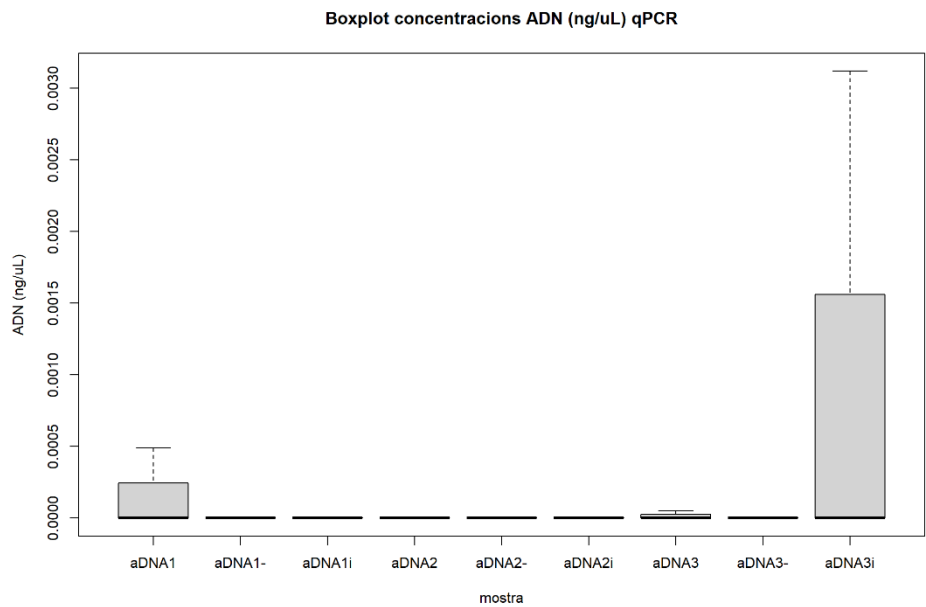


Figura 11. Boxplot dels triplicats de la PCR quantitativa.

Resum:

Grups	Comptatge	Suma	Mitjana	Variància
aDNA1	3	0,00049	0,00016	8,0896E-08
aDNA1-	3	0	0	0
aDNA1i	3	0	0	0
aDNA2	3	0	0	0
aDNA2-	3	0	0	0
aDNA2i	3	0	0	0
aDNA3	3	0,00015	0,00005	7,5765E-09
aDNA3-	3	0	0	0
aDNA3i	3	0,00312	0,00104	3,2447E-06
aDNA4	3	0,00129	0,00043	5,5251E-07
aDNA4-	3	0	0	0
aDNA4i	3	0,02807	0,00936	0,00026
aDNA5	3	0	0	0
aDNA5-	3	0	0	0
aDNA5i	3	0	0	0
aDNA6	3	0	0	0
aDNA6-	3	0	0	0
aDNA6i	3	0	0	0

Anàlisi de variància total:

Origen de les variacions	Suma de quadrats	Graus de llibertat	Mitjana dels quadrats	F	Probabilitat	Valor crític per F
Entre grups	0,00025	17	1,44832E-05	0,97812	0,50101	1,91532
Dins dels grups	0,00053	36	1,48071E-05			
Total	0,00078	53				

Taula 11. ANOVA d'un factor