

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

Universidad Autónoma de  
la Ciudad de México

---

---

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

“ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA  
POBLACIÓN PREHISPÁNICA MAYA DEL SURESTE  
DE MÉXICO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE  
DNA MITOCONDRIAL”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

BIOL. EXP. MAURO LÓPEZ ARMENTA

DIRIGIDA POR

DRA. MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO

DR. LEOBARDO MENDOZA ALCÁNTAR

México D.F. Febrero de 2007

San Lorenzo No. 290, Colonia Del Valle C.P. 03100 Delegación. Benito Juárez México D.F.  
Tel. 55 59 01 87

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## **TUTORES**

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno  
Académico Investigador del Departamento de Genética y Biología Molecular del  
CINVESTAV-IPN, Unidad Zacateco.

Dr. Leobardo Mendoza Alcántar  
Académico Investigador del Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad  
Autónoma de la Ciudad de México.

## **ASESORES**

Dra. Minerva Camacho Nuez  
Académico Investigador del Posgrado de Ciencias Genómicas de la Universidad  
Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Sergio López Alonso  
Académico Investigador del Centro INAH Oaxaca

La presente Investigación fue realizada en las instalaciones del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Zacatenco, gracias al apoyo económico otorgado por el laboratorio de la Dra. Ma. Lourdes Muñoz Moreno.

Agradezco de manera muy especial el respaldo que el Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México ha conferido en mí, por su apoyo económico y académico, destacando el profesionalismo y calor humano de quienes laboran en esta magnífica institución.

## **Agradecimientos.**

Agradezco inmensurablemente a mis tutores y asesores de tesis, a todos ellos les doy las gracias por su apoyo incondicional, su paciencia y entrega en esto que para mí a sido una gran aventura. De manera muy especial a la Dra. Ma. de Lourdes Muñoz Moreno por acogerme en su laboratorio como quien acoge en su hogar a un amigo, por su tolerancia ante mis arrebatos y por que me fue guiando en todo momento.

Al personal del Laboratorio y miembros del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, quien sin su ayuda y apoyo técnico no hubiera podido llevar adelante este proyecto: María Guadalupe Aguilar González, "*Lupita*"; Unidad de Ácidos Nucleicos, Guadalupe Rosalinda Tovar Gallegos "*Rosí*"; Auxiliar de Investigación. De manera particular a Miguel Moreno Galeana, "*Miguelón*"; Auxiliar de Investigación, un excelente investigador en materia de análisis de DNA antiguo, para mí, un gran Maestro, quien sin sus enseñanzas y auxilio no habría podido salido adelante. De igual forma agradezco a Hebert Cadena García, "*Hebert wherever*"; Técnico en Investigación, a quien debo su ayuda técnica y destacado profesionalismo, sin él, habría sido imposible conseguir con éxito los logros que el laboratorio me ha brindado. A todos ellos les doy mil gracias, no conformes con su entrega y profesionalismo me han entregado tan grandes muestras de su amistad

Debo agradecer a los Antropólogos Físicos Adrián Martínez Meza del Museo Nacional de Antropología y Javier Montes de Paz del Centro INAH Chiapas por facilitarme el material biológico antiguo con que se desarrollara esta investigación. Agradezco así mismo a las arqueólogas Ximena Chávez Balderas del Museo de Templo Mayor y Elizabeth Mejía Pérez Campos del Centro INAH Querétaro por su confianza al permitirme y facilitar el trabajo con una muestra tan importante y hermosa, *Pepita*.

A Fatima Catalina Sánchez Domínguez "*Caty*" y María de Lourdes Rodríguez Murguía "*Lulu*" de la UACM, y por supuesto a Antonia López Salazar "*Tony*" de CINVESTV, gracias por estar siempre dispuestas a brindar su ayuda.

Siempre estaré en deuda con mis compañeros de laboratorio, grandes investigadores y entrañables amigos, sus comentarios y valiosos consejos han sido de un valor inestimable: Diana Bustos Ríos "*Dianucha*", Gerardo Pérez Ramírez "*Gera*", Miguel Palomino Ángeles "*Miguelito*", Alma Herrera Salazar "*Almita*", Manuel Alberto Castillo Méndez "*Manuelito*", Catalina Evelyn Gardella García "*Evelyn*", Gustavo Limón Camacho "*Gus*" y Álvaro Díaz Badillo "*Álvaro*". A todos ellos les doy mil gracias, realmente no se que hubiera sido de mi sin su ayuda.

Mi agradecimiento y cariño a Edna Edith Lujan Belmontes "*Ednita*", Elena Sofía Abarca Ávila "*Elenita*", María Eugenia Ambríz Franco Romero "*Maru*", y Jorge Guillén Alfaro "*El Jefe*". Muchachos, gracias por creer en mí, bien saben que sin su apoyo no habría podido llegar hasta aquí.

Doy también gracias a quienes me han acompañado en cada instante y de los que sólo recibo cariño y aliento, mi familia. A mis hermanos y sobrinos que me han tolerado durante todo este tiempo con su habitual alegría, pero sobre todo a mis padres, Patricio López Cruz y Guadalupe Armenta Rivera. Sin ellos nada tiene sentido.

Finalmente quisiera expresar mi agradecimiento a quien ha dado un nuevo sentido a mi vida, Laura Maricela García Vega, por su apoyo, cariño y amor inconmensurable.

Son tantas las personas a las que debo el trabajo realizado, que me invade el temor de haber omitido el nombre de alguna de ellas, de ser así, pido perdón por esta mala memoria que de frecuente me traiciona, pero a cada uno de ustedes les doy mil gracias por su ayuda.

**A mis Padres y Laura.**

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	7
2.1. La mitocondria	7
2.2. Características Generales	8
2.3. Producción de ATP	9
2.4. Propiedades del DNA mitocondrial (mtDNA)	12
2.5. Organización genómica	14
2.6. Poliplasmia	15
2.7. Herencia por línea materna	15
2.8. Homoplasmia y heteroplasmia	17
2.9. Segregación de alelos	19
2.10. Evolución molecular	23
2.11. Poblamiento de América.	24
2.12. La teoría de los cuatro orígenes	25
2.13. Teoría de la doble inmigración	25
2.14. Estudios lingüísticos	26
2.15. Estudios genéticos	26
2.16. Los mayas	27
2.16.1. Cultura.	29
2.16.2. Sociedad	31
2.16.3. Vida cotidiana	31
2.16.4. Creencias y pensamiento	31
2.16.5. Bonampak	32
2.16.6. Palenque	32
III. ESTADO DEL ARTE	37
IV. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo General	40
4.2. Objetivos particulares.	40
V. MATERIAL Y MÉTODOS	41
5.1. Material de estudio	41
5.1.1. Muestras biológicas antiguas	41
5.1.1.1 Temporalidad de las muestras antiguas	42
5.1.1.2. Entierros de Bonampak	42
5.2. Muestras de control con DNA antiguo	43
5.3. Muestras de control con DNA contemporáneo	49
5.4. Estrategia experimental y metodología	50
5.4.1 Consideraciones para el manejo de DNA antiguo	51
5.4.2. Limpieza y consideraciones previas	51
5.4.2.1. Limpieza de las muestras	53
5.4.2.2. Molido de muestras	54
5.4.3. Extracción de DNA	54
5.4.3.1. Método de extracción por fenol/cloroformo para DNA antiguo	54

5.4.3.1.1. Lisis celular	55
5.4.3.1.2. Extracción del DNA	55
5.4.3.1.3. Precipitación	55
5.5.3.2. Variaciones de la técnica	56
5.5.3.2.1. Descalcificación	56
5.5.3.2.2. Lisis celular mediante adición de ditioneitol (DTT)	56
5.5.3.3. Extracción de DNA de pelo con raíz mediante "Chelex"	57
5.5.3.4. Extracción de DNA de sangre completa	57
5.5.4. Análisis de la calidad del DNA extraído	58
5.5.5. Eliminación de contaminantes por método de dilución	58
5.5.6. Eliminación de sales mediante Chelex	58
5.5.7. Eliminación de sales mediante columnas concentradoras	59
5.5.8. Purificación por electroforésis	59
5.5.9. Aplicación de Albúmina Sérica Bovina (BSA)	60
5.5.10. Amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	60
5.5.11. Análisis de los productos de PCR	62
5.5.12. Análisis de polimorfismo de longitud por fragmentos de restricción (RFLPs)	64
5.5.13. Limpieza de fragmentos	64
5.5.14. Marcaje de terminadores fluorescentes	65
5.5.15. Secuenciación.	65
5.5.16. Procesamiento <i>in silico</i> de los datos y Análisis de resultados	66
5.5.17. Haplogrupos	66
5.5.18. Análisis de secuencias de las regiones hipervariables I y II	67
VI. RESULTADOS	68
6.1. Aproximaciones de estandarización para el método de extracción con DNA antiguo	68
6.2. Porcentajes de éxito en la extracción de DNA antiguo	73
6.3. Análisis de calidad	75
6.4. Inhibidores	76
6.5. Diluciones de DNA antiguo	77
6.6. Evaluación sobre el efecto de inhibidores en presencia de DNA moderno	77
6.7. Sistemas de purificación basados en sílica gel	79
6.8. Adición de BSA	80
6.9. Determinación de haplogrupos mediante RFLPs	82
6.10. Análisis electroforético de amplificados de las regiones hipervariables I y II	83
6.11. Marcaje por el método de terminadores fluorescentes	87
6.12. Haplotipos y regiones hipervariables observadas	88
6.13. Fidelidad de secuencias	91
6.14. Análisis de secuencias	95
6.15. Análisis filogenético	98
6.16. Análisis filogeográfico	98
VII. DISCUSIÓN.	101
7.1. Problemas metodológicos.	101

7.2. Aproximaciones de estandarización para el método de extracción con DNA antiguo	102
7.3. Análisis de calidad	105
7.4. Análisis de haplogrupos	106
7.5. Análisis filogenético por secuencias de la región hipervariable I	107
7.6. Análisis filogeográfico	109
7.7. Validación de resultados	110
VIII. CONCLUSIONES	111
8.1. Extracción del DNA antiguo, aspectos metodológicos	111
8.2. Análisis de Haplogrupos	112
8.3. Análisis filogeográfico y de haplotipos de la región hipervariable I.	112
APÉNDICES	114
Apéndice I	114
Apéndice II	128
BIBLIOGRAFÍA	137

## ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1.	Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS)	12
Figura 2.	Ilustración de un mitocondria como parte de los elementos de la maquinaria celular.	13
Figura 3.	Características estructurales de la mitocondria.	13
Figura 4.	Ubicación geográfica de las entidades federativas de México y países de Centroamérica con presencia maya	30
Figura 5.	Ubicación geográfica correspondiente a las muestras de restos óseos de los sitios arqueológicos de Palenque y Bonampak	38
Figura 6.	Ubicación de pozos correspondientes a las muestras arqueológicas analizadas del grupo Frey en Bonampak	44
Figura 7.	Características del entierro 1 del grupo Frey en Bonampak	45
Figura 8.	Características del entierro 2 del grupo Frey en Bonampak	46
Figura 9.	Características del entierro 3 del grupo Frey en Bonampak	47
Figura 10.	Características del entierro 4 del grupo Frey en Bonampak	48
Figura 11.	Estrategia experimental.	52
Figura 12.	Localización de los polimorfismos que determinan los cuatro haplogrupos amerindios	66
Figura 13.	Electroforésis de amplificados obtenidos por PCR del fragmento que revela el haplogrupo A	69
Figura 14.	Análisis de calidad de DNA antiguo para muestras de Palenque.	76
Figura 15.	Electroforésis de amplificados obtenidos por PCR del fragmento que revela el haplogrupo A de muestras de Palenque para la determinación de un posible efecto Inhibidor	78
Figura 16.	Electroforésis de amplificados obtenidos por PCR del fragmento que revela el haplogrupo B de muestras de Palenque para la determinación de un efecto Inhibidor.	79
Figura 17.	Electroforésis de amplificados obtenidos por PCR del fragmento que revela el haplogrupo B de una muestra de Palenque empleada para la optimización de amplificados	81
Figura 18.	Electroforésis como análisis previo a la restricción del haplogrupo A de muestras de Bonampak y Palenque	82
Figura 19.	Electroforésis para el análisis de restricción del haplogrupo A de muestras de Bonampak y Palenque	85
Figura 20.	Electroforésis de amplificados obtenidos por PCR de la región hipervariable I en sus fragmentos A y B	85
Figura 21.	Electroforésis de amplificados obtenidos por PCR de la región hipervariable II y fragmentos A y B respectivos.	86
Figura 22.	Electroforésis de amplificados por PCR de la región D-Loop y región hipervariable II	87
Figura 23.	Electroforésis para la limpieza de amplificados obtenidos por PCR de la región hipervariable I y II	88
Figura 24.	Electroforésis para la determinación de contaminación máxima de aDNA para la obtención de amplificados de la región hipervariable I en DNA moderno	92

Figura 25.	Gradientes de diluciones de DNA antiguo (aDNA) con DNA moderno (mDNA).	92
Figura 26.	Electroforésis para la determinación de DNasa I máxima requerida para la digestión de DNA antiguo	93
Figura 27.	Electroforésis de amplificadas obtenidos por PCR de la región hipervariable I de DNA moderno en una muestra de DNA antiguo digerido con presencia de contaminantes inhibidores de PCR.	94
Figura 28.	Limpieza por electroforésis de la región hipervariable I, mediante GENCLEAN post-electroforésis.	94
Figura 29.	Corroboración de secuencia de una muestra control a través de complementariedad de las secuencias sentido (L) y antisentido (H) por alineamiento <i>in silico</i> y manual	95
Figura 30.	Árbol Filogenético mediante el método UPGMA de las secuencias reportadas en GenBank para los linajes de muestras analizadas (antiguos mayas de Bonampak)	99
Figura 31.	Asentamiento y ruta de dispersión geográfica de las secuencias reportadas en GenBank para los linajes de muestras analizadas (antiguos mayas de Bonampak)	100
Figura 32.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 42. Secuencia sentido.	114
Figura 33.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 42. Secuencia antisentido.	115
Figura 34.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 43. Secuencia sentido.	116
Figura 35.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 43. Secuencia antisentido.	117
Figura 36.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 44. Secuencia sentido.	118
Figura 37.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 44. Secuencia antisentido.	119
Figura 38.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 45. Secuencia sentido.	120
Figura 39.	Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 45. Secuencia antisentido.	121
Figura 40.	Electroferogramas de la región hipervariable I completa de una Muestra Control. Secuencia sentido	122
Figura 41.	Electroferogramas de la región hipervariable I completa de una Muestra Control. Secuencia antisentido.	123
Figura 42.	Electroferogramas de la región hipervariable II completa de una Muestra Control. Secuencia sentido	125
Figura 43.	Electroferogramas de la región hipervariable II completa de una Muestra Control. Secuencia antisentido.	126

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.	Muestras arqueológicas de restos óseos de Bonampak y Palenque del estado de Chiapas México	49
Tabla 2.	Muestras arqueológicas de restos momificados procedentes de los estados del Norte y Centro de México	50
Tabla 3.	Oligonucleótidos empleados para la amplificación de haplogrupos y segmentos de las regiones hipervariables I y II.	63
Tabla 4.	Polimorfismo por fragmentos de restricción para la designación de haplogrupos de amplificados por PCR.	65
Tabla 5.	Referencia sobre asignación rendimiento mediante cantidad de DNA amplificado vista por electroforésis como método indirecto.	70
Tabla 6.	Análisis comparativo de Rendimiento por método indirecto entre los diferentes sistemas de extracción a través de amplificados por PCR para el fragmento que revela haplogrupo A.	71
Tabla 7.	Datos generales de muestras de restos óseos procesadas en que se incluye tipo de extracción de DNA, cantidad y promedio de muestra extraída.	72
Tabla 8.	Datos generales de muestras de restos momificados procesadas en que se incluye la cantidad y tipo de extracción de DNA.	73
Tabla 9.	% de éxito por grupo	74
Tabla 10.	% de éxito por tipo de tejido	74
Tabla 11.	% de éxito por rango de muestra (>0.7 g ≤) en restos óseos	74
Tabla 12.	% de éxito por método de extracción en restos óseos	75
Tabla 13.	% de éxito total de DNA extraído.	75
Tabla 14.	Dimerización hipotéticas de oligonucleótidos empleados para el haplogrupo A.	84
Tabla 15.	Resumen de resultados de la amplificación de fragmentos para la designación de haplogrupos y amplificados de segmentos para secuenciación de las regiones hipervariables de muestras de restos óseos de mayas del estado de Chiapas.	89
Tabla 16.	Resumen de resultados de la amplificación de fragmentos para la designación de haplogrupos y amplificados de segmentos para secuenciación de las regiones hipervariables de muestras de restos momificados del centro y norte de México.	90
Tabla 17.	Comparación de la frecuencia de haplogrupos reportados respecto a la obtenida en el presente estudio.	90
Tabla 18.	Secuencia corroborada de una muestra control para la región hipervariable I completa por complementariedad de las secuencias sentido y antisentido respectivas.	96
Tabla 19.	Haplotipo de la muestra control teniendo como referencia la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (rCRS)	96
Tabla 20.	Alineamiento de secuencias de la región hipervariable I mediante Clustal W en formato de haplotipo.	97
Tabla 21.	Haplotipo característico de pobladores de Bonampak	108

## INTRODUCCIÓN.

Los avances en técnicas de Biología Molecular en las últimas dos décadas han favorecido el progreso de múltiples disciplinas. La aplicación de herramientas moleculares hace factible la apertura de nuevas áreas de investigación, de manera que el investigador puede centrar su atención en aspectos más particulares, que de otro modo, sólo serían analizados someramente. Es el caso de la Antropología Molecular uno de los ejemplos más significativos en que puede verse la interdisciplinaridad y ejercicio con otras áreas. (Cipollaro M. et al. 2005)

Si bien la Antropología Molecular data sus primeros antecedentes en 1917 con la aplicación de estudios serológicos (Cavalli-Sforza L. and Feldman M. 2003, Fernández T. J. L. 1995), no es sino hasta mediados de los 80s que esta disciplina adquiere mayor importancia, siendo el eje de estudio, la variabilidad genética entre los individuos y sus poblaciones, considerando tanto poblaciones antiguas como contemporáneas. (Klings M. et al. 1997; Nicholls H. 2005).

Las contribuciones de los estudios del DNA antiguo por parte de la Antropología Molecular tienen un peso significativo en la Arqueología y la Antropología (Rohland N. et al. 2004). Este tipo de estudios, permite obtener datos importantes de un yacimiento en particular, enmarcándolos dentro del contexto de la población y por otro lado, ayudando a esclarecer o construir teorías generales sobre grupos de poblaciones, con aportes subsecuentes que incluyen relaciones filogenéticas y de migraciones (Zhivotovsky L.A. et al. 2003)

Del trabajo realizado en restos óseos antiguos se ha podido prácticamente “viajar tiempo atrás” para obtener información relevante de los organismos estudiados; información que de otra manera sería imposible conocer. (Pääbo S. et al. 2004, Willerslev E. and Cooper A. 2005) Las posibilidades de estudio abarcan todos los niveles de organización biológica: individual, poblacional, de especie, e incluso el molecular. Numerosas revisiones han dado cuenta de las posibilidades que ofrece el DNA antiguo (Parducci L. and Bennett K. 2005, Yang, 1997).

Por lo anterior, cabe hacer mención de algunos eventos significativos, por ejemplo, en 1984 se demostró por primera vez, en medio de una gran expectación que

era posible recuperar DNA de especies extinguidas (Higuchi R., 1984). Desde entonces se ha aislado DNA a partir de restos antiguos de una gran variedad de especies vegetales y animales (Hofreiter M. et al. 2001), incluido el hombre. En 1985 se clonó por primera vez DNA de una momia de 5.000 años de antigüedad (Pääbo S., 1985) y posteriormente se han estudiado restos humanos de 10.000 años de antigüedad (Pääbo S. et al. 1988) (Pääbo S., 1993) hasta ciertas especies fósiles mucho más antiguas. Así, algunos autores han publicado el aislamiento de DNA de fósiles vegetales datados en millones de años (Soltis P. S. Soltis D. E. 1993). Aunque quizás sean éstos los casos más espectaculares de todos por su antigüedad, numerosos estudios sobre DNA humano antiguo han disparado la discusión acerca de la fiabilidad de los resultados (Gilbert M. T. et al. 2005) (Lindahl T., 1997). En medio de esta polémica han aparecido trabajos sobre el aislamiento de DNA de restos humanos antiguos anatómicamente modernos, como los hallados en los Alpes tiroleses (Handt., 1994), o bien de humanos extintos, como el caso de un DNA Neandertal. (Krings M. et al. 1999, Krings M. et al. 1997, Serre D. et al. 2004, Lindahl T. 1997, Ovchinnikov V. and Goodwin W. 2001)

Es importante hacer la aclaración, que los estudios genéticos no son de ningún modo la panacea que puede explicar todo fenómeno relacionado con las actividades humanas. Sin embargo, sí aporta pistas significativas sobre dichos fenómenos y actividades, por ejemplo, en la interpretación de los sitios arqueológicos, es de gran utilidad en la identificación del sexo de los individuos, sobre todo en los casos en los que las condiciones de preservación, no permitan la determinación morfológica, o en el caso de individuos infantiles, en los que todavía no se han definido las diferencias sexuales a nivel anatómico. Diversos trabajos han demostrado que es posible la determinación del sexo en restos humanos antiguos (Stone et al. 1996; Palmirotta et al. 1998; Cipollaro et al. 1998; Ovchinnikov et al. 1998) y en algunos casos esta aproximación ha contribuido a esclarecer las costumbres de un grupo concreto de individuos, como en el caso de los romanos de Ashkelon en Israel, que practicaban el infanticidio de los varones, contrariamente a las costumbres generales de la sociedad romana en la que las víctimas solían ser mayoritariamente del sexo femenino (Faerman et al. 1997).

También puede ser de gran utilidad la determinación de las relaciones familiares de los individuos encontrados, sobre todo en el caso de los enterramientos múltiples. Sin embargo, Brown and Brown (1994) han expuesto la dificultad de alcanzar un buen nivel de confianza para esta determinación, pues es necesario contar con un marco de referencia sobre la variabilidad genética de la población que permita determinar los grados de relación genética correspondientes a hermanos, primos o padres e hijos, siendo necesario llevar a cabo una genotipificación de DNA de varios enterramientos contemporáneos de la misma población genética, lo que a menudo no es posible debido a la falta de disponibilidad de los restos humanos necesarios. No obstante, algunos métodos pueden representar una buena aproximación, sobre todo si se combina el análisis de microsatélites (STRs) y mtDNA, tal como sucede en muchas de las prácticas de identificación forense (Jobling Mark A. and Gill Peter 2004), bajo consideración de que en la mayoría de las veces, el análisis de microsatélites está comprometido dado la degradación de DNA nuclear, lo cual es muy común en restos antiguos o sujetos a procesos que favorecen la degradación. (Parsons T. and Coble M. D. 2001)

El análisis del DNA de restos antiguos también puede ofrecer datos acerca de las enfermedades que sufrieron los individuos de una población determinada. La detección de enfermedades en poblaciones antiguas (Retana-Salazar A. P. 2005), puede ser importante en la evaluación de su prevalencia y en algunos casos, ayudando en la determinación de los movimientos migratorios de las poblaciones y las interacciones entre ellas. También podría investigarse el origen de algunas enfermedades en determinadas poblaciones, como el de la sífilis en el continente americano, lo que ayudaría esclarecer las dudas de si fue o no introducida al nuevo mundo por los españoles (Ross, 1992).

Por otra parte, del análisis de DNA de restos antiguos se pueden buscar mutaciones puntuales que den origen a enfermedades genéticas si se conoce el gen específico y la localización de la mutación. Por ejemplo, se ha informado de la amplificación del gen de la fibrosis quística en DNA antiguo (Pérez-Pérez, 1992). Además, también es posible determinar la presencia de cualquier enfermedad que deje su huella genética, como infecciones virales o bacterianas. Podría identificarse por

ejemplo la hepatitis, la sífilis o la malaria. De hecho, se ha detectado DNA de *Mycobacterium tuberculosis* en restos humanos momificados (Salo et al.1994; Nerlich et al. 1997), así como de *Mycobacterium sp.* (Crubézy et al. 1998) y *Mycobacterium leprae* (Rafi et al. 1994) en tejido óseo; así como de *Yersinia pestis* en pulpa dentaria (Drancourt et al. 1998).

Por otra parte, se ha destacado que la amplificación de DNA de microorganismos, podría por sí misma, establecer una nueva disciplina científica, la paleobacteriología (Gribaldo S. and Philippe H. 2002), en la que los campos de acción serían fascinantes, como la investigación sobre la teoría de la preexistencia de la resistencia a antibióticos.

Así mismo, el estudio de restos de plantas y animales relacionados con el hombre (Parducci L. and Bennett K. 2005), puede ayudar en temas como el origen de su domesticación. Se han hecho algunos estudios con muestras de maíz precolombino (Rollo et al. 1988) y con semillas de trigo encontradas en yacimientos arqueológicos (Brown et al. 1994), que además de demostrar la persistencia de DNA en este tipo de restos, permitiría ver el origen y características que llevó a que una variedad de grano, fuera elegida como fuente de alimentación. En el caso de animales, se ha estudiado el origen del conejo (Hardy et al. 1994), en otros casos, de animales que compartieron el hábitat con el hombre, como es el caso de los osos europeos (Hofreiter M. et al. 2002) así como de roedores nativos de América del Sur (Hadly E. A. et al. 2003).

Una de las perspectivas en el campo del DNA que es abordada por la Antropología Molecular y otras disciplinas, está determinada por la posibilidad de profundizar en el estudio de las poblaciones humanas. Las relaciones filogenéticas de estas poblaciones han sido estudiadas a través de análisis genéticos en individuos vivos y poblaciones antiguas, con estos datos ha sido construida de forma retrospectiva la historia de las poblaciones y las relaciones entre ellas. Con este enfoque, se han desarrollado interesantes estudios que abordan temas como el origen de los indígenas americanos (Torrioni A. et al, 1992; Horai S. et al, 1993; Torrioni A. et al, 1993; Merriwether A.D. and Ferrell R.E., 1996; Bonatto S.L. and Salzano F.M., 1997; Bonatto S.L. and Salzano F.M., 1997; Stone A.C. and Stoneking M., 1998; Cordaux R. et al, 2002; Malhi R.S. et al, 2002; Salzano. F.M., 2002; Bolnick D.A., 2003; Eshleman J.A. et

al, 2003; Lewis C.M. et al, 2004), población europea (Troy C. S. et al. 2001, Bermisheva M. A. et al. 2004) con reportes de este continente para el norte, como es Rusia (Bermisheva M. A. et al. 2002, Pakendorf B. et al. 2003) o centro, tal como Francia (Chilli A. A. et al 2004). El avance de la investigación se extiende de manera que es posible ver trabajos de investigación en Asia (Kong Q. P. et al. 2003, Metspalu M. et al. 2004, Quintana-Murci L. et al. 2004), como por ejemplo, Mongolia (Keyser-Tracqui C. et al. 2003) e India (Vishwanathan D. E. et al 2002; Cordaux R. et al. 2003) y la cuestión al parecer ya dilucidada sobre si los europeos modernos provienen o no de poblaciones locales de Neandertales (Serre D. et al. 2004) o de inmigrantes del este (Tambets K. et al. 2004). Así mismo, se han hecho muchos estudios para tratar de dilucidar el origen del *Homo sapiens* (Hawks J. et al. 2000; Maca-Meyer N. et al, 2001; Torroni A. et al. 2001; Huelsenbeck J. P. and Imennov N.S. 2002; Salas A. et al. 2004; Pakendorf B. and Stoneking M. 2005)

No obstante, el utilizar datos actuales para inferir eventos del pasado, no se deja de tener cierta dosis, en mayor o menor medida, de especulación. La posibilidad de obtener DNA de individuos de épocas pasadas abre la expectativa de minimizar las inferencias teóricas acerca de sucesos ocurridos en la historia de las poblaciones humanas, lo cual hace destacar de sobremanera los esfuerzos realizados por el equipo de trabajo de DNA antiguo de CINVESTAV a cargo de la Dra. Lourdes Muñoz Moreno, quienes gracias a sus investigación han permitido generar un acercamiento más concretos sobre los pobladores del México prehispanico (Muñoz M.M.L. et al, 2001; Loza M.I. et al, 2001; Díaz B.A. et al, 2002; Juárez M.A.I. et al, 2002; Martínez M.A. et al, 2002; Mendoza V.A.F. et al, 2002; Moreno G.M. et al, 2003; Martínez M.A. et al, 2005).

Así, aprovechando las ventajas que brinda la metodología del DNA, ya se han realizado estudios para aclarar el origen de los japoneses (Horai et al. 1991; Oota et al.1999), de los indígenas americanos (Merriwether. A.D et al. 1994; Lalueza C. 1996; Parr et al. 1996; Ribeiro dos Santos et al. 1996; Lalueza C. et al. 1997; Stone and Stoneking, 1998), así como de las poblaciones de la islas del Pacífico (Hagelberg and Clegg, 1993; Hagelberg et al. 1994; Hagelberg, 1997) y no es arriesgado pensar que sea posible abordar estudios que ayuden a esclarecer incógnitas como la relación de la

población aborígen australiana con otras poblaciones antiguas o actuales; investigar si los anglosajones provienen de las invasiones germánicas o de los romanos, o probar si es cierta la sugerencia de que los europeos modernos provienen de migraciones de agricultores orientales, analizando restos humanos del Paleolítico y Neolítico. Por otra parte, puede completarse cada vez más el rompecabezas para el esclarecimiento del origen del Homo sapiens, como lo demuestran los estudios realizados con individuos Neandertales (Krings. et al. 1997; Ovchinnikov. et al. 2000), sin olvidar la posibilidad de estudiar poblaciones antiguas africanas (Kivisild T. et al. 2004).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. La mitocondria

Las primeras observaciones generales que se hicieron de las mitocondrias se remontan a mediados del siglo XIX. Entre los primeros reportes conocidos se hallan los de Rudolf Albert von Kölliker quien las describe en 1856 al advertirlas mientras desarrollaba estudios citológicos en tejido muscular. La función de las mitocondrias hasta entonces resultaba un misterio, pero en 1890 Richard Altmann advierte de su importancia al realizar los primeros trabajos sobre su estructura y función, lo que daría lugar a los primeros postulados sobre su autonomía genética y metabólica (Brown G. C., 2005).

Si bien las mitocondrias eran ya identificadas, Las estructuras observadas que las describían eran llamadas de diferentes formas, a menudo se les refería como gránulos, sarcosomas, blefaroblastos, condriosomas, mitogel, cuerpos parabasales, plasmasomas, condriocotes y vermiculos, hasta que en 1898 Carl Benda acuña el nombre de "mitocondria", palabra compuesta por los vocablos griegos *mitos* que significa hilo o filamento y *chondros* que quiere decir gránulo, término que refiere las características morfológicas que éstas presentaban al ser vistas bajo el microscopio de luz. (Bantseev V. and Sivak J. G. 2005, Scheffler I.E. 2000)

La información y conocimiento que se tiene de la mitocondria desde su descubrimiento a hasta nuestros días suele estar asociada a los fenómenos fisiológicos que resultan de los procesos bioquímicas al interior de ella, Sin embargo, el entendimiento creciente respecto al estudio del DNA ha dado lugar a nuevos campos y aplicaciones, que van desde ciencia básica sobre los fenómenos bioenergéticos, hasta el desarrollo de terapias como parte de la medicina moderna. La información sobre la mitocondria que a continuación se presenta sólo está confinada para el entendimiento sobre los fenómenos de variabilidad y su aplicación en la dilucidación del origen y migración del hombre moderno, por tanto, con riesgo de omitir otros aspectos de importancia.

## 2.2. Características Generales

Las mitocondrias se ubican en el citoplasma de todas las células eucariotas como de algunos microorganismos entre ellos las algas, hongos y protozoarios. Aunque el tamaño de las mitocondrias puede variar entre una y otra, su promedio oscila entre 0.3 a 1.0 por 5 a 10  $\mu\text{m}$  aproximadamente. La mitocondria como otros organelos presenta capacidad de desplazamiento a través del citoplasma celular (Bantseev V and Sivak J. G. 2005), por tanto, la población mitocondrial es dinámica, actualmente se sabe que dicha movilidad favorece su fusión y hendimiento continuo, lo que las hace variar significativamente en su tamaño y forman, para incluso, dar lugar a complejos ramificados (Shaw & Nunnari 2002, Karbowski & Youle 2003). Las variaciones de su tamaño, número y masa durante las diversas etapas del desarrollo y diferenciación celular, son resultado de la respuesta a diversas situaciones fisiológicas y patológicas (Goffart and Wiesner, 2003).

La estructura básica de la mitocondria es muy característica, sin embargo, existen diferencias morfológicas en función de la especie, del tipo de tejido y célula, del grado de actividad metabólica y del estado fisiológico y patológico (Duchen, 2004). De forma general se tiene que la mitocondria está constituida por dos membranas que son diferentes en su función y composición, una membrana interna, que se halla plegada en estructuras denominadas crestas y una membrana externa que está constituida de una bicapa fosfolipídica, con una composición de lípidos en aproximadamente un 50%. Los pliegues o crestas de la membrana interna posibilitan que la superficie que ocupa sea más grande que la membrana externa. La membrana interna y membrana externa son separadas por un espacio llamado intermembranal. El espacio que rodea a la membrana interna se denomina matriz y es el compartimiento acuoso interno de la mitocondria, mientras que el espacio contiguo a la membrana externa denominado citosol delimita su exterior. La membrana externa contiene complejos proteínicos llamados porinas, los cuales dan permeabilidad a moléculas de hasta 10 kDa, La membrana interna presenta un contenido de lípidos en aproximadamente 20%, con una elevada presencia de cardiolipina, la cual es un fosfolipido requerido para mantener el potencial y la integridad general de la membrana (Abrahams, J. P. et al, 1994; Lodish H., et al. 2002). La membrana interna sólo es permeable al oxígeno, CO<sub>2</sub> y agua, de

modo que requiere de transportadores especiales para dar paso a todas las moléculas y iones. Esta membrana contiene también el complejo enzimático requerido para el proceso de OXPHOS (fosforilación oxidativa), necesario para la síntesis de ATP, mientras que la matriz contiene una variedad de enzimas de metabolismo intermediario, incluyendo aquellas de la glucólisis (u oxidación de ácidos grasos) y ciclo de Krebs (o ciclo de los ácidos tricarboxílicos) que mantienen los sustratos para el sistema de OXPHOS. También contiene otras proteínas, ribosomas, tRNAs y mtDNA. (Frey and Mannella 2000).

### **2.3. Producción de ATP**

La principal función de la mitocondria es la generación de energía para los procesos celulares mediante la formación de ATP a través del proceso de OXPHOS. La cadena respiratoria, compuesta de cinco complejos de enzimas multiméricas (I-V), se localiza en la MMI y acopla la reducción del oxígeno a agua con la subsecuente síntesis de ATP (fig. 1). La transferencia de electrones de los equivalentes reducidos NADH, NADPH, FADH, obtenidos en la glucólisis y en el ciclo de Krebs se lleva a lo largo de la cadena respiratoria, y los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz dentro del espacio intermembranal, creando un gradiente de protones y un potencial electroquímico de membrana a través de la membrana interna. El complejo V emplea este gradiente electroquímico para sintetizar ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (Koningsberg F. M., 1992).

El sistema OXPHOS proporciona a la mayoría de los diferentes tipos celulares alrededor del 90% del requerimiento energético. En la mitocondria entran ácidos grasos que se oxidan en acetil-coenzima A (acetil-CoA) durante el proceso denominado  $\beta$ -oxidación. El piruvato que es el producto final de la glucólisis llevada a cabo en el citoplasma celular también entra en la mitocondria y se descarboxila por acción de la piruvato descarboxilasa, la cual incorpora la molécula denominada coenzima A (CoA) para producir acetil-CoA. La región acetato de la acetil-CoA se oxida en el ciclo de Krebs, así que al final de este ciclo se generan dos moléculas de  $\text{CO}_2$  y 4 pares de átomos de hidrógeno que se transfieren al dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD<sup>+</sup>) y al dinucleótido de flavina y adenina (FAD) los cuales se reducen en NADH y

FADH<sub>2</sub> respectivamente. Cabe mencionar que estas dos moléculas presentan una capacidad muy elevada para donar electrones, por lo que esta energía se va liberando a lo largo de una serie de reacciones de oxido-reducción en las crestas mitocondriales con la participación de complejos enzimáticos y de coenzimas. Esta serie de reacciones es lo que constituye la cadena respiratoria mitocondrial la cual representa una unidad funcional constituida por la cadena de transporte de electrones (fig. 1). La generación de energía es un proceso termodinámicamente costoso, por lo que su generación está mediada según las necesidades energéticas que la célula de un determinado tejido y órgano requiere (Nicholls, D.G., 1982; Hatefi Y., 1985).

La cadena respiratoria mitocondrial está formada por una serie de complejos, cada uno conformado por enzimas multiméricas, las cuales se localizan en las crestas mitocondriales, las cuales atraviesan la bicapa lipídica y sobresalen hacia la matriz y espacio intermembranal. Las coenzimas que participan en la cadena respiratoria están disueltas en lípidos que se hallan difundidos a lo largo y través de la superficie membranar. El complejo I, también llamado NADH ubiquinona oxidoreductasa, o NADH deshidrogenasa que representa el complejo de mayor tamaño está formado por al menos 42 polipéptidos. Su función es catalizar la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El complejo II conocido como succinato CoQ oxidoreductasa está compuesto por 4 péptidos, los cuales catalizan la oxidación del succinato a fumarato que tiene lugar en ciclo de Krebs además de transferir electrones a la ubiquinona en la cadena respiratoria de la mitocondria. El complejo III denominado citocromo c oxidoreductasa está constituido por aproximadamente 10 subunidades. El citocromo c, que se localiza en el espacio intermembranar, participa en la transferencia de electrones entre los complejos III y IV. El complejo IV llamado citocromo c oxidasa, también conocido como COX está compuesto de 13 subunidades, y transfiere 4 electrones desde el citocromo c a una molécula de oxígeno, que termina dando lugar a una molécula de agua. (Hatefi Y., 1985; Koningsberg F. M., 1992).

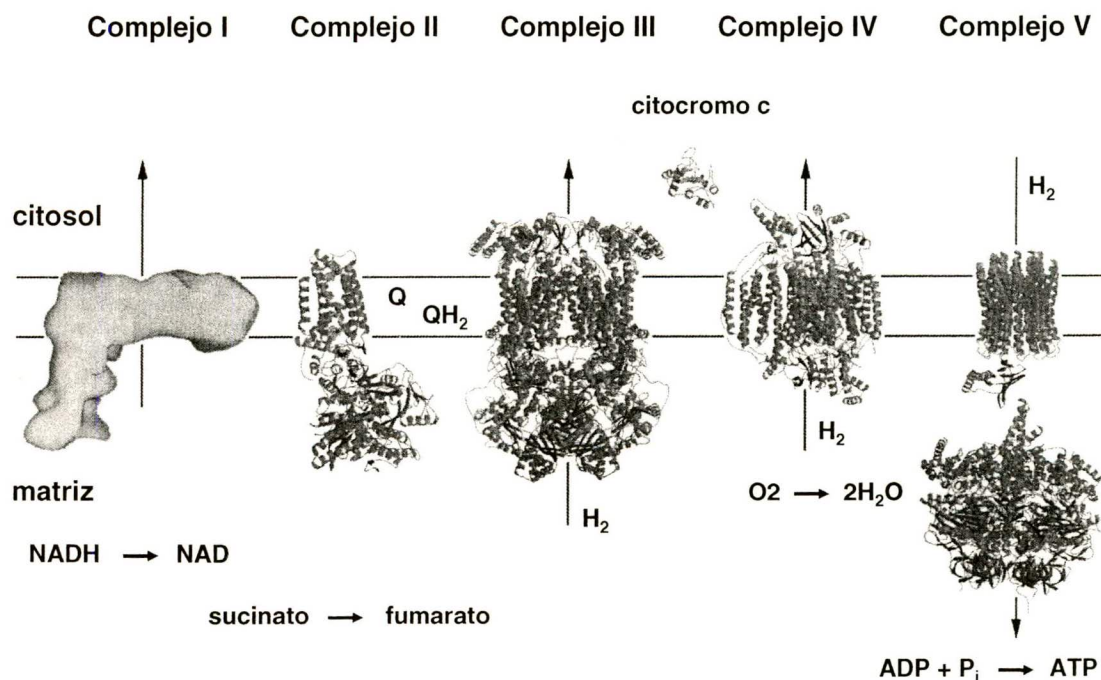
La transferencia de electrones entre los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria es aprovechada de forma indirecta para generar ATP. Al inicio de la cadena respiratoria las moléculas reducidas de NADH y FADH<sub>2</sub> transfieren los electrones del hidrógeno al siguiente complejo enzimático y liberan los protones a la matriz

mitocondrial mediante un mecanismo que aún no parece estar claro. Los electrones fluyen entre los complejos gracias a un gradiente electroquímico propiciado por los complejos III y IV como del transporte realizado por la ubiquinona y el citocromo c. La transferencia de electrones que realizan los complejos I-IV es realizada mediante las subunidades portadoras de los grupos prostéticos, que pueden ser por ejemplo los grupos hierro-sulfuro en los complejos I, II y III, o los grupos hemo-hierro en el citocromo c y complejo IV. La energía que se genera durante este proceso de transferencia es entonces empleado en los complejos I, III y IV para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. La acumulación de protones en el espacio intermembranal respecto a los electrones de la matriz, genera un potencial eléctrico que tiende a llevar de nueva cuenta los electrones hacia la matriz. Entonces, la distribución asimétrica de iones tales como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo de la membrana interna permite la generación de un gradiente químico. Dado que la membrana interna tiene una gran impermeabilidad sobre los protones, se hace necesaria la participación del complejo V también conocido como F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa, el cual realiza el transportados de protones al interior de la mitocondria. Esta entrada de protones da lugar a la generación de energía, la que es entonces empleada para sintetizar ATP a partiendo de adenosina difosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi). El ATP generado por la mitocondria es luego intercambiado por ADP citosólico mediante el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), y que se caracteriza por las diversas isoformas que son específicas de ciertos tejido. El complejo V está compuesto por 12-14 polipéptidos. En el complejo se pueden distinguir dos regiones, la F<sub>0</sub> que está asociada a la membrana y que al parecer es la encargada del transportar electrones, en tanto, la F<sub>1</sub> representa la parte catalítica de la molécula, la cual está insertada en la matriz mitocondrial. Debe tenerse en cuenta que son necesarios algunos requisitos para que se produzca la fosforilación oxidativas, siendo los más importantes la integridad de la membrana interna y una elevada concentración de protones en el espacio intermembranal. (Koningsberg F. M., 1992).

Cabe mencionar que la mitocondria necesita para el mantenimiento de su estructura y función alrededor de 850 proteínas codificados en el DNA nuclear. Estas proteínas se sintetizan en el citoplasma y se importan al interior del orgánulo, en donde

se distribuyen en alguno de los cuatro compartimentos principales de la mitocondria, esto es, la membrana externa, la membrana interna, el espacio intermembranal y la matriz. (ver figura 3). Aproximadamente 70 de las 850 proteínas codificadas en el núcleo son parte estructural de los complejos de la cadena, y al menos 20 de éstas proteínas son necesarias para acoplar y mantener en forma ordenada a los complejos (Glick B.S. and Schatz, G., 1991; Glick B. S., Wachter, C. and Schatz, G., 1992).

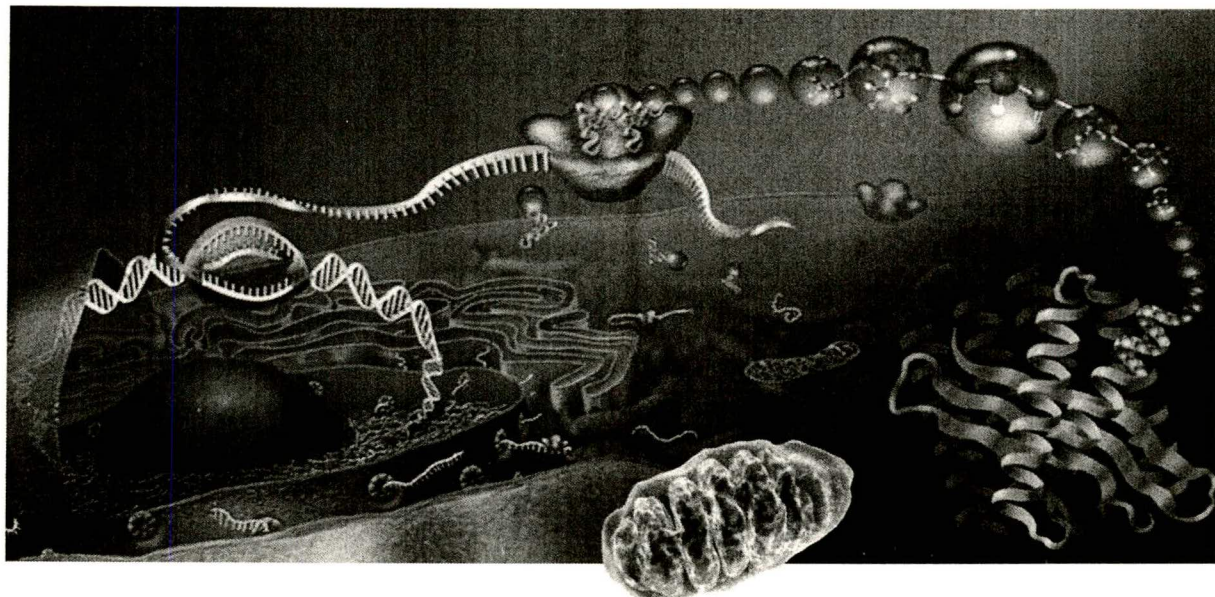
**Figura 1.** Sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). La oxidación de sustratos a través de la cadena respiratoria produce un bombeo de protones al espacio intermembranal de la mitocondria, que genera un gradiente electroquímico que puede ser disipado a través de la ATP sintasa, generando ATP a partir de ADP y fósforo



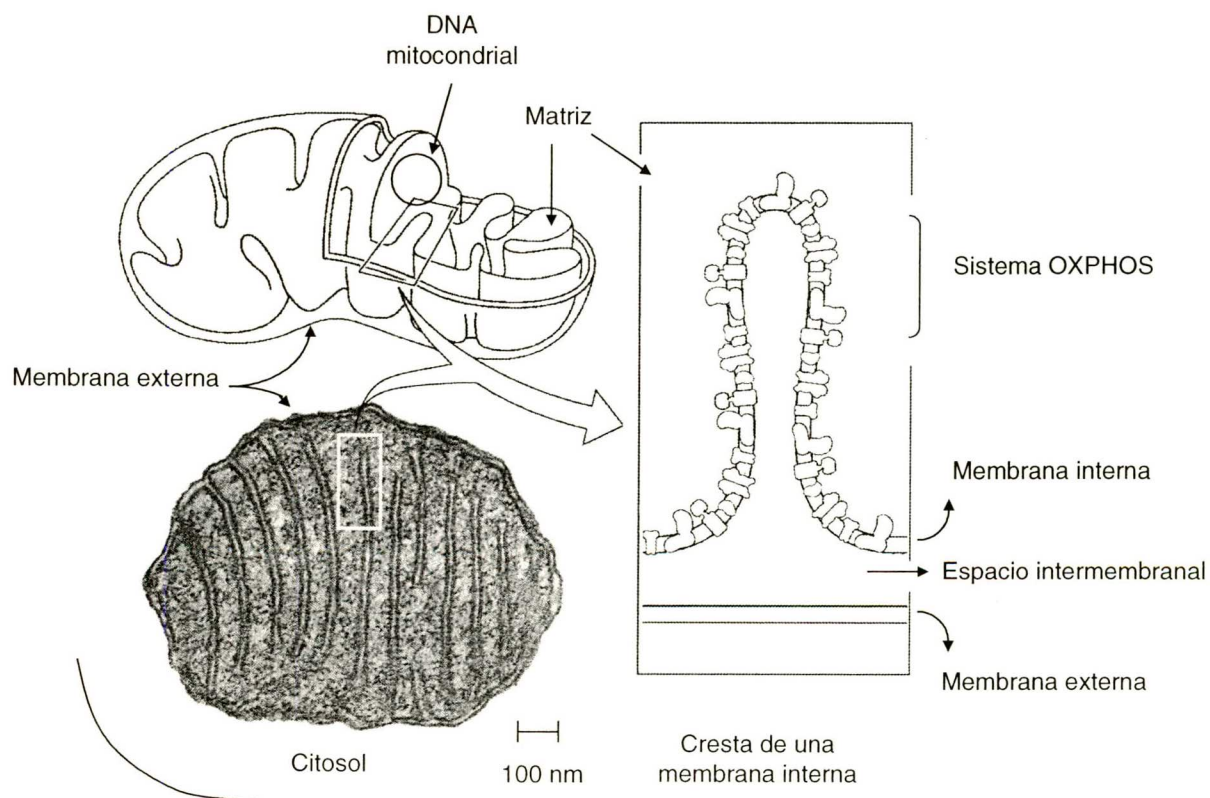
## 2.4. Propiedades del DNA mitocondrial (mtDNA)

El mtDNA exhibe determinadas propiedades que lo hacen una herramienta de gran ayuda en los estudios de evolución molecular, ello se ha visto favorecido gracias a la secuenciación completa de su genoma, el alto número de copias que presenta en cada célula, la segregación por línea materna, su elevada tasa de evolución y la presencia de una región susceptible a presentar un gran número de polimorfismos hacen de esta molécula un elemento imprescindible en los estudios evolutivos. (Ballard J.W.O. and Whitlock M.C., 2004).

**Figura 2.** Ilustración de un mitocondria como parte de los elementos en la maquinaria celular.



**Figura 3.** Características estructurales de la mitocondria.



## 2.5. Organización genómica

El mtDNA es uno de los genomas de eucariontes mejor caracterizados, de él se conoce la estructura y secuencia completa de sus genes, entre los que se incluye el humano y muchos otros organismos.

El mtDNA humano es una molécula circular de aproximadamente 16.500 pares de bases, su genoma presenta una organización muy compacta dado su tamaño, lo cual se advierte al compararse con el genoma nuclear al punto que un 90% de su genoma da lugar a regiones codificantes, lo cual implica la síntesis de 13 proteínas, dos RNAs ribosomales y 22 RNAs de transferencia. En tanto, el 10% restante del genoma da lugar a las regiones no codificantes, las cuales están distribuidas en pequeños segmentos ubicados entre las regiones codificantes. Así mismo, dentro de las regiones no codificantes se distinguen dos fragmentos de mayor tamaño, que por su extensión, resultan más susceptibles a los fenómenos de sustitución, inserción y pérdida de nucleótidos. Debido a que estos fragmentos no codifican para ninguna proteína, se hallan libres de los fenómenos de presión selectiva, de modo que los cambios en su secuencia pueden ser acumulados, por lo que dichas regiones son denominadas como hipervariables (Anderson et al. 1981).

La capacidad que estas regiones tienen para poder acumular cambios, las hacen una herramienta de gran importancia para los estudios filogenéticos, ya que al variar las secuencias permiten comparar grupos de individuos dentro y entre poblaciones, y aún si es que se desea entre especies no emparentadas, esto como resultado de las diferencias que las regiones hipervariables presentan (Wallace, 1994).

Por otra parte, la variabilidad que dichas regiones hipervariables tienen, pueden ser de utilidad para establecer cambios evolutivos a través del tiempo, de modo que los cambios que se suceden en su genoma sirven como puntos de referencia respecto eventos históricos. (Edwards S.V. and Beerli P., 2000; Nichols R., 2001; Hudson R.R., Turelli M., 2003).

La principal región no codificante comprende alrededor de 1100 pb, la cual también es conocida como región de control, debido a que presenta el origen de replicación de la cadena pesada (H), la regiones promotora de las dos cadenas y una pequeña región de inicio de replicación o D-loop (Wallace, 1994). La región D-loop,

denominada así por la abreviatura en inglés “displacement loop”, representa un segmento que durante la replicación de la cadena pesada, adquiere la forma de triple cadena, en ese punto la orquilla de replicación inicia un desplazamiento que avanza durante la síntesis de la nueva cadena complementaria (Clayton, 1982). Sin embargo, se propone que la función de la región D-loop no sea propiamente la de la replicación, sino la de ofrecer un sitio de asociación para alguna proteína (Fisher et al. 1992), o bien, la de exhibir porciones únicas de la cadena pesada para los procesos de transcripción (Clayton, 1982). Sea cual fuera el caso, dentro de la región control se hallan dos fragmentos altamente variable, llamados también región hipervariable I y II, de los cuales la región hipervariable I parece presentar mayor variabilidad, motivo por el cual, es principalmente empleada en estudios filogenéticos (Wakeley, 1993, Handt et al. 1998).

## **2.6. Poliplasmia**

Se denomina así a la gran cantidad de copias de mtDNA que existe en cada mitocondria, como en cada célula. Lo anterior es resultado de las observaciones *in situ* sobre una gran variedad de organismos (Newman et al. 1996), que revelan una elevada organización al interior de la mitocondria, donde se puede observar que el DNA se encuentra unido a ciertas proteínas formando un complejo denominado “nucleoide”. Una mitocondria puede presentar de dos a diez nucleoides, por lo que el número de copias de mtDNA por célula puede variar entre 1000 y 10 000. (Malyarchuk *et al.* 2002, GILES *et al.* 1980). Esta propiedad permite que el mtDNA sea más factible de obtener, aún cuando se trate de restos antiguos (Pääbo, 1989; Stoneking, 1993).

## **2.7. Herencia por línea materna**

Entre las ventajas que ofrece el mtDNA como herramienta molecular para la elaboración de filogenias, está el hecho de que éste es segregado por vía materna. Esta propiedad implica que todos los miembros de un mismo linaje, en este caso materno, estarán caracterizados por la misma información genética que su mtDNA presente (Stoneking, 1993). Por mucho tiempo se ha creído que la segregación de mtDNA es exclusivamente materna, sin embargo se cree puedan existir excepciones

(Schwartz M. and Vissing J. 2002), no implicando que estas excepciones sean una regla en la segregación del mtDNA.

La segregación por línea materna fue inicialmente advertida luego de un estudio en tres familias en que se analizaron los polimorfismos mitocondriales mediante RFLPs, sin poder determinar entonces cuales debían ser los mecanismos que conducen tal herencia (Giles et al. 1980). Si bien los espermatozoides de los vertebrados contienen una gran cantidad de mitocondrias en la cola, generalmente estos no pueden entrar al ovocito durante el proceso de fecundación y aún cuando esto sucediera, las mitocondrias al parece no sobreviven (Spuhler et al 1988). En 1995 Kaneda y col. (1995) quienes trabajaban con ratones, propusieron que el citoplasma de los ovocitos debía contener algún elemento que reconocía y eliminaba todas las mitocondrias y DNA que hubiera pasado a su interior. Esta aseveración dio lugar a múltiples opiniones, muchas de ellas encontradas, en las cuales se discutía si los ratones como modelo de estudio eran los más adecuados para interpretar los fenómenos que se desarrollaban en ovocitos humanos, al considerar marcadas diferencias en la herencia citoplásmica, tales como el hecho de que el centrosoma se hereda por vía materna en ratones, mientras que en humanos como en otros vertebrados sucede por vía paterna (Ankel-Simons and Cummins 1996), y por otro lado quedaba en duda si la herencia matrilineal reportada era lo suficientemente valida, luego de que los estudios de Giles (1980) basaban sus conclusiones partiendo de un análisis de RFLPs con enzimas de restricción de bajo poder resolutivo. Además que, en la mayoría de las especies el espermatozoide podía penetrar por completo el óvulo fecundado, no siendo difícil pensar que la segregación mitocondrial involucrara en cierta medida una transferencia por vía paterna. Hecho que hasta entonces no podía ser considerado incorrecto cada vez que no se supiera lo que ocurría con las mitocondrias del espermatozoide que penetraba el óvulo.

En respuesta de estas interrogantes diferentes grupos de trabajo se dieron a la tarea de dilucidar si la herencia mitocondrial era o no de exclusividad materna. Uno de los primeros acercamientos implicó un análisis de secuencia de la región D-loop de 69 casos, en cada uno de los cuales se buscó la transferencia paterna hacia los hijos sin encontrar indicio alguno (Parsons et al. 1997). Estos resultados fueron apoyados luego

de un estudio realizado en parejas sometidas a inseminación asistida, donde la fecundación fue llevada a cabo por medio de inyección intracitoplasmática del espermatozoide (Torrioni et al.1998), método en que el espermatozoide es inyectado directamente dentro del ovocito. Echando por tierra la teoría en la que se exponía que las mitocondrias contenidas en los espermatozoides, eran eliminadas al encontrarse seriamente dañadas luego de la exposición a especies reactivas del oxígeno que se generan durante la trayectoria hacia el ovocito en que se maximiza la generación de energía (Allen, 1996; Yakes and Van Houten, 1997). A partir de estos trabajos se pudo establecer que la herencia del mtDNA en humanos era materna. Dos años después fueron presentados datos en los que se sugiere que las mitocondrias del espermatozoide en desarrollo, son marcadas con una ubiquitina, proteína responsable de la eliminación de mitocondrias y DNA respectivo que en un momento dado pudieran penetrar al ovocito (Sutovsky, P., et. al. 1999., Hopkin, 1999).

## **2.8. Homoplasma y heteroplasma**

La homoplasma es la condición en la cual los genomas presentes de una célula u organismo son genéticamente iguales, en contraparte, la heteroplasma será la condición en que una célula u organismo presenten dos o más genomas diferentes. Por lo anterior, el mtDNA puede ser considerado como un locus constituido de un sólo alelo o forma alternativa, el cual carece de cambios en la secuencia de las múltiples copias que lo representa. Sin embargo, la homoplasma no es una condición ni constante ni exclusiva, pese a que ésta se halle en la mayoría de los individuos, lo cual implica que existan individuos con dos o más genomas en cuanto a mtDNA refiere, es decir, siempre habrá, aún cuan pequeño sea, cierto número de individuos heteroplásmicos

En búsqueda de entender los fenómenos de la homoplasma y en consecuencia los de la heteroplasma, se ha planteado la posibilidad de que en los mamíferos exista algún mecanismo capaz de mantener la integridad de la secuencia para el mtDNA que la células de un individuo presenta (Monnat y Loeb, 1985), las razones que llevan a esta idea surgen del hecho de que, en detrimento o perdida total de funcionalidad de una pequeño grupo de genomas mitocondriales entre algunos miles, no habría por que esperar alteraciones capaces de comprometer la funcionalidad de una célula. Por otro

lado, dado que el código genético del mtDNA es más degenerado que el DNA nuclear, éste debería tolerar mejor los errores de transcripción y traducción para la síntesis de proteínas que se pudieran generar con o sin alteraciones de una o más bases de su genoma considerando que la DNA polimerasa mitocondrial quien carece de actividad de exonucleasa puede admitir una tasa de error de 1/7000 pb y por que además, es en las mitocondrias donde se genera la mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno, responsables del daño y mutación de los genomas. Cabría entonces esperar que en algún punto del desarrollo se diera lugar a cierto cambio en la secuencia del mtDNA de células y tejidos, cuanto más si se considera que su renovación implica consecuentes divisiones y por tanto, cambios acumulativos. Pero al no observar evidencia de estos cambios, se ha planteado la posibilidad de que la replicación y/o la reparación del mtDNA sean procesos de una elevada fidelidad, o en todo caso, se tenga un mecanismo capaz de limitar la generación de cambios en las moléculas del mtDNA (Monnat y Loeb 1985). Lo cual parece ser concordante con estudios en que se demuestra cierta capacidad de reparación para algunos tipos de daño en el mtDNA, siendo esta capacidad de reparación mayor de lo que se pensaba, aunque también se ha propuesto que las moléculas con daños considerables podrían ser marcadas para posteriormente ser destruidas (Bogehagen, 1999).

La heteroplasmia por su parte se caracteriza por la presencia de dos o más genomas mitocondriales que difieren en su secuencia, presentes ya sea en una sola mitocondria, una sola célula o un sólo individuo. Aunque el fenómeno de heteroplasmia es común en individuos con enfermedades mitocondriales, destaca que ésta se observe rara vez en forma de mutaciones neutras o silenciosas, hecho que se manifiesta luego de haberse secuenciado las regiones hipervariables de la región control de muchos individuos sanos, lo que sugiere que la heteroplasmia sea un fenómeno raro, o difícil de detectar mediante secuenciación directa (Bendall et al. 1996), al punto que, en la mayoría de los reportes de individuos heteroplásmicos se observa generalmente la presencia de tan sólo dos genomas.

## 2.9. Segregación de alelos

La acumulación de cambios que sufren las secuencias de mtDNA con respecto al DNA nuclear resulta significativamente mayor. Esta diferencia en la acumulación de cambios está determinada por la suma de múltiples factores, los cambios en el genoma pueden ser advertidos a través del tiempo luego de un análisis comparativo entre las secuencias de DNA de individuos tomados al azar de una misma o diferente especie, ello implicando que dichos cambios debieron estar presentes en las células germinales para así poder pasar de una generación a otra. La fijación de estos cambios se sucede en forma paulatina y está en dependencia del efecto que se genera en el individuo, de modo que los cambios deberán ser favorables o neutros. Cambios con implicaciones deletéreas sobre la síntesis de proteínas pueden dar lugar un funcionamiento anómalo sobre la actividad celular, consecuentemente comprometiendo la vida del individuo y por tanto impidiendo que dichos cambios puedan ser fijados. En los casos en que la sustitución de nucleótidos no compromete la vida de un individuo, los cambios podrán pasar de una generación a otra, si el linaje al cual pertenecen presenta éxito reproductivo, se puede entonces esperar que dichos cambios alcancen el nivel de polimorfismo tanto en la población como en la especie.

Los procesos de cambio en el genoma mitocondrial son un fenómeno constante, algunos de ellos se suceden durante la diferenciación y desarrollo del individuo, o bien durante la etapa adulta. En el primero de los casos se da lugar a individuos con marcadas heteroplasmas en porcentaje que depende del estadio en que el cambio se hizo presente, mientras que en adultos la heteroplasma suele ser poco significativa, cada vez que su presencia se confina a células con pobre capacidad de replicación o bien en células sin poder replicativo, siendo el caso de los genomas de piel o células queratinizadas de cabello y uña.

Cuando una mutación o cambio cae en el genoma mitocondrial de un individuo en desarrollo, esta se distribuye en forma aleatoria junto con el genoma normal, las subsiguientes replications mitóticas derivan entonces a formas puras de genomas con y sin cambio en diferentes tipos de células, las cuales nuevamente se redistribuyen en tejidos y órganos a través de un fenómeno denominado segregación replicativa (Wallace D.C., 1994). Los cambios presentes en los genomas de células somáticas se

pierden cuando el individuo muere, pero cuando estos cambios se hallan en células germinales cabe la posibilidad de que puedan pasar de una generación a otra y al cabo de algunas generaciones la progenie adquiere un genoma diferente al grupo poblacional del que pertenece, definiendo así, el inicio un nuevo linaje (Wallace D.C., 1994).

La velocidad con que un genoma mitocondrial diferente puede fijarse en la población parece estar determinada fuertemente por la segregación meiotica. Estudios realizados en ganado bovino holstein revelan que el estado de heterplasmia puede perderse al cabo de dos generaciones (Hauswirth y Laipis, 1982; Ashley et al. 1989). Koehler y col. (1991) presumen que la rapidez con que se sucede este tipo de segregación debe estar dada por un fenómeno de cuello de botella durante la ovogénesis o embriogenesis (Hauswirth y Laipis. 1982, Meirelles F. V. et al 2001), en donde el número de genomas mitocondriales sería reducido a unos cuantos, para posteriormente incrementarse durante las siguientes divisiones, de manera que la heteroplasma presente en ovocitos y embriones viraría rápidamente a un estado homoplásmico, ya que no es posible que se suceda tan rápidamente una selección aleatoria sobre los diferentes genomas con que parte una la línea germinal. Sin embargo no queda clara cual es el número mínimo al que puede reducirse el numero de copias de DNA mitondrial por célula Ashley M. V. et al 1989; Koehler, C.M., et al. 1991)

Mientras que la teoría de cuello de botella del desarrollo parece ser aceptada como un fenómeno plausible en bovinos, existe suspicacia sobre si este fenómeno guarda correlación en humanos cada vez que los estudios generados al respecto difieren respecto a la velocidad de segregación y número de genomas mitocondriales en que acaba el cuello de botella. Para Howell y colaboradores (1992) la heteroplasma en humanos varía muy poco entre individuos y generaciones, luego de que un estudio de 8 individuos distribuidos en tres generaciones se advirtiera heteroplasma en todos ellos. Así mismo, en otro estudio realizado sobre diez individuos emparentados por línea materna Lutz S. Y col (1999) advierten que el fenómeno de botella puede ser variable al punto que no es posible establecer una relación constante en la reducción del cuello de botella. Lo cual resultó de estudiar la heteroplásmia en variante homopolimérica de citosinas, en la cual todos los individuos mostraron heteroplásmia

con variación significativa entre uno y otro. Por otro lado Sekiguchi K. y col. (2003) al realizar un estudio de heteroplásmia en variante de transición de bases, citosina por timina, a partir de 13 individuos relacionados por línea materna a través de tres generaciones, advierten que existe una amplia variación intra y entre generaciones. Este último resultado si bien es concordante con la teoría de cuello de botella del desarrollo, no establece ningún patrón sobre la velocidad de segregación y el número de genomas mitocondriales al término del cuello.

Para poder dar una explicación a las diferencias en los tiempos de segregación quizá sea conveniente advertir que la unidad de segregación no sean las moléculas de mtDNA, sino la mitocondria misma. Se sabe que el número de moléculas de mtDNA puede variar entre 1 y 10 copias por mitocondria y de 100 000 a 200 000 genomas mitocondriales por ovocito (Cummins, 1998), además que en individuos heteroplásmicos las mitocondrias podrían hallarse en al menos tres estadios diferentes y en cada uno de ellos con un genotipo particular: uno homoplásmico para el mtDNA normal, un segundo homoplásmico para el DNA mutado o con cambio y un tercero heteroplásmico. Por tanto, el genotipo de las células de un individuo con heteroplasmia no será necesariamente el mismo, de modo que la rapidez con que se de la segregación habrá de depender del porcentaje de genotipos mitocondriales que un determinado ovocito presente. Lightowlers y col (1997), no descartan que la unidad de segregación sea el nucleoide, lo cual implica una velocidad de segregación tan variable, como variable sea el porcentaje de heteroplasmia en la mitocondria, es decir, una tasa de segregación lenta en nucleoides heteroplasmicos y una tasa de segregación acelerada nucleoides homoplásmicos.

Sea cual fuera la unidad de segregación, aún quedan cuestiones sin explicar, la principal de ellas gira en torno sobre si la teoría del cuello de botella del desarrollo realmente sucede durante la ovogénesis humana y de ser así bajo que condiciones, ya que estudios realizados en ovocitos de humanos no fertilizados luego del fracaso de la fertilización *in vitro* indican una sorprendente variación en la cantidad de copias de mtDNA que hay en ellos, a este respecto Chen y col (1995) mediante ensayos PCR competitiva reportan un promedio de 138 000 copias de mtDNA cuantificado de nueve ovocitos, mientras que Steuerwald y col (2000) indican mediante un análisis de PCR en

tiempo-real un promedio de 314 000 copias de mtDNA en 18 ovocitos, por su parte Reynier P. y col (2001) también con análisis de PCR en tiempo-real señalan un promedio de 193 000 genomas mitocondriales por ovocito en un rango de 20 000 a 598 000 ( $\pm 122\ 000$ ) de 113 ovocitos de 43 pacientes, pero también un promedio de 209 000 ( $\pm 122\ 000$ ) copias de mtDNA en 45 ovocitos de 26 pacientes con cohorte de índice normal de fertilización. Los datos anteriores no reflejan en lo absoluto un patrón que pueda ayudar a interpretar el denominado cuello de botella, pues si bien no representan el número de mitocondrias al inicio del cuello, sí indican que un decremento en la cantidad de mitocondrias puede generar ovocitos no viables para la fecundación y por tanto irrelevantes en la segregación mitocondrial, del mismo modo cabe la duda sobre si el decremento de mitocondrias en la embriogénesis compromete o no el desarrollo en el individuo puesto que las necesidades energéticas son imprescindibles para una diferenciación celular adecuada.

Aunque existe cierta idea sobre los mecanismos con que un determinado genotipo puede irse fijando a través del tiempo en una población, sólo se tiene claro que la segregación de la heteroplasma vista desde un punto de vista poblacional sólo representa un estado transitorio a la homoplasma. En dicho estado de transitoriedad caben múltiples fenómenos que deben ser considerados constantemente, pues si bien es la permanencia y proporción de individuos heteroplásmicos un determinante sobre la capacidad con que un alelo puede irse fijando en la población, caben otros factores tales como la deriva génica y la selección natural que modulan regularmente la tasa de evolución del mtDNA. Es por ello, que aún cuando los individuos con dos o más genotipos alcancen un estado de homoplasma sobre su descendencia, ya sea que ésta implique tan sólo unas cuantas generaciones, no significa que puedan prevalecer sobre la población hasta alcanzar una frecuencia de polimorfismo, ya que los cambios sin efecto fenotípico o mutaciones neutras como se les suele denominar, terminan perdiéndose debido a la deriva génica Wallace (1994), y por tanto, implicando que estos cambios sean apenas unos cuantos al cabo de muchas generaciones, tiempo que dependerá del tipo de mutación, efectos de presión selectiva y ciclo de vida medio de los individuos que componen la población. Podrá entenderse que el cálculo de la tasa

de evolución en el mtDNA no resulte una tarea fácil, cada vez que el número de variables involucradas es tan grande como aleatoria cada una de ellas.

## **2.10. Evolución molecular**

Es importante hacer notar que en cuanto a la identificación en medicina forense y a los estudios genealógicos y filogenéticos se refiere, todas las aplicaciones anteriormente mencionadas, han desarrollado sus métodos en base a los estudios de la variabilidad molecular, la cual a su vez ha surgido por un proceso de cambio denominado evolución molecular (Templeton A. R. 1999).

No obstante, al igual que en los estudios de la genealogía de poblaciones, los estudios para reconstruir el proceso histórico de la evolución molecular, han obtenido sus conclusiones de forma retrospectiva. Se han calculado tasas de mutación de diferentes segmentos de DNA tanto de humanos como de otras especies, analizando la variabilidad actual que presenta determinado segmento en individuos de la misma especie o de especies relacionadas (Brown et al, 1979). Ahora bien, gracias al desarrollo de las técnicas de extracción de DNA de restos biológicos antiguos, es posible diseñar investigaciones introduciendo una variable temporal y esto implica que el proceso evolutivo puede ser ahora “visto” a través del tiempo de una forma directa. Lo que se requiere es contar con especímenes lo suficientemente antiguos de la misma especie o al menos de la misma línea filogenética que los individuos actuales, para analizar determinado gen o segmento de DNA y poder así observar cómo y a qué velocidad evoluciona a través del tiempo el DNA. De esta forma, las tasas de evolución, podrían ser calculadas con mayor precisión.

En cuanto a lo que significa suficientemente antiguo, cabe mencionar que dependerá del tipo de DNA que se quiera estudiar, por ejemplo, en el caso de la región de control del mtDNA humano se han calculado tasas más rápidas que en el DNA nuclear usando métodos filogenéticos retrospectivos y todavía más rápidas mediante observaciones empíricas. En este caso, el rango actualmente aceptado para la preservación del DNA de 100,000 años encaja perfectamente para observar la evolución de esta región de la molécula y quizá la limitación esté dada por la disponibilidad de restos humanos que conformen un amplio mosaico en tiempo y

espacio. Por el contrario, para analizar regiones del genoma de más lenta evolución, será necesario contar con organismos de millones de años de antigüedad, lo que prácticamente excluiría los restos no fosilizados como fuente de información genética. La situación polémica de los resultados obtenidos con restos fosilizados, no permiten de momento especular con base firme sobre esta posibilidad, por lo que será necesario esperar a entender mejor los mecanismos de preservación del DNA y determinar cuales son los límites de tiempo efectivos. Por otra parte, los métodos de reconstrucción filogenética, no cuentan con un medio para verificar su efectividad, pues sus resultados se refieren a eventos pasados de los que nadie ha podido ser testigo. Sin embargo, con el DNA antiguo, es posible retroceder en el tiempo, para verificar si determinadas filogenias son como las predicen los métodos, lo que a fin de cuentas constituye un medio de verificación de los distintos métodos. Las posibilidades de trabajo en este campo son bastante amplias y los resultados pueden ser muy útiles y satisfactorios.

### **2.11. Poblamiento de América.**

La llegada del hombre a América o poblamiento de América es una cuestión que aún se discute arduamente en la actualidad. Existe un cierto consenso, aunque no unánime, sobre el hecho de que América se habría poblado desde Siberia (Asia). Más allá de ese consenso relativo, la comunidad científica sigue discutiendo sobre la fecha, ruta y cantidad de oleadas migratorias

Las tesis más aceptadas sobre el poblamiento o descubrimiento de América las podemos comenzar a precisar en los planteamientos de Alex Hrdlicka y el mexicano Pablo Martínez del Río quienes sostienen que el paso se dio por el estrecho de Bering y las Islas Aleutianas. Hrdlicka (Comas J. 1974, Mann, Charles C. 2006), de acuerdo a ello, el estrecho de Bering debió ser el paso obligado de numerosos y más antiguos contingentes humanos procedentes del noreste asiático, la posibilidad material del paso terrestre a través de Bering habría tenido lugar como resultado en el descenso del nivel del mar con motivo de la última glaciación, a este respecto Beals y Hoijer (1971), sostienen que, en definitiva, el nivel del mar debió haber bajado más de 36,5 metros, dejando un puente de tierra entre los dos continentes, resultando imposible que el paso fuera antes del período glacial Wisconsin, lo cual debió llevar a cabo migraciones,

durante un período cálido intermedio en la glaciación Wisconsin, de una antigüedad entre 30,000 y 40,000 años (Beals R. and Hoiger H. 1971).

### **2.12. La teoría de los cuatro orígenes.**

Según Rivet (1973), la variedad de tipos indígenas se debe a que América fue poblada por cuatro grupos de tipos raciales diferentes. Mongoles y esquimales llegados de Asia por el estrecho de Bering, tal como señalaba Hrdlicka, dando lugar a varios pueblos de Norteamérica. Otro grupo procedente del archipiélago de la Polinesia en el Pacífico, que habrían llegado desde el océano pasando de isla en isla para dar origen a numerosas tribus de Centro y Suramérica. Un tercer grupo que también habría llegado por vía marítima y en oleadas sucesivas desde el archipiélago de la Melanesia. A este grupo y el anterior los denominó Rivet elementos malayo-polinésicos. Un cuarto grupo habría procedido de Australia (Rivet P. 1973)

Rivet fundamentó su teoría en investigaciones que le permitieron encontrar grandes semejanzas físicas, de costumbres y lingüísticas entre numerosas tribus de indios que viven desde California hasta Brasil, así como de los habitantes malayo-polinésicos (Rivet P. 1973).

### **2.13. Teoría de la doble inmigración:**

En 1951, el norteamericano Joseph Birdsell (1972) rechazó las teorías de que los melanesios y polinesios fueron pobladores de América e insistió en que el hombre americano es producto del mestizaje de una doble inmigración asiática. Según él, una rama del gran tronco racial blanco o caucásico emigró hacia el río Amur en el norte de Asia, motivo por el cual los denominara amurianos. De acuerdo a la hipótesis de Joseph Birdsell, los amurianos habrían tenido origen de grupos mongoloides, siendo también ancestros de los antiguos habitantes del Japón, y un tercer grupo llamado murrayos habrían migrado hasta el río Murray en Australia. Birdsell concluye que debieron generarse al menos dos oleadas migratorias hacia América, la primera de mongoles y amurianos y la segunda de murrayanos. El mestizaje resultante de estas migraciones habría dado origen a las poblaciones de amerindios (Joseph B. B. 1972).

## **2.14. Estudios lingüísticos**

Greenberg (1986) formuló la hipótesis de los tres troncos lingüísticos en la América precolombina: esquimal, na-dene y amerindio, correspondientes con tres grandes migraciones (Greenberg J.M. 1986). Esta hipótesis puede conciliarse con la teoría del poblamiento tardío, en la que se expone que la migración amerindia habría sido la primera siendo testimonio la cultura de los Clovis. Sin embargo no ha podido probarse el origen único de todas las lenguas amerindias y aunque se han agrupado con seguridad varias familias, otras parecen muy divergentes. Las investigaciones actuales exploran afinidades estructurales de profundidad entre idiomas de indios americanos con idiomas de asiáticos. La dilucidación de la historia lingüística del nuevo mundo plantea una serie de problemas altamente complejo, los cuales aún siguen siendo estudiados con detalle (Greenberg J.M. 1986, Bateman I. G. 1990).

## **2.15. Estudios genéticos**

Los estudios basados en polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción (RFLPs) y secuencias de la región hipervariable (RHV) han mostrado que el mtDNA de los nativos americanos que se estudian hasta el momento queda clasificado en cuatro grupos distintivos, llamados haplogrupos A, B C y D. La distribución de estos cuatro haplogrupos al respecto de los tres tipos principales de lenguas encontradas en América (amerindio, Na-Dene y Esquimo-aleutiano), como de estimados de la diversidad interna de cada haplogrupo, han llevado a varias hipótesis relacionadas al número y edad de las migraciones que colonizaron el nuevo mundo. Aunque generalmente las poblaciones amerindias tienen los cuatro haplogrupos, los grupos Na-Dene y esquimales tienen principalmente secuencias de haplogrupos A (Merriwether et al. 1995; Wallace 1995). Más aún Torroni (1992,1993) encontró una diversidad secuencial más baja en el haplogrupo A en los Na-Dene que en los Amerindios, en donde, dentro de los Amerindios, el haplogrupo B tenía una diversidad de secuencias más baja que en aquellos de los otros tres haplogrupos. Estos resultados llevaron a estos autores a sugerir que los Na-Dene entraron al continente en una migración independiente (Wallace, 1995). Por otro lado, los amerindios, habrían migrado a las

américas en dos oleadas; en la más antigua llevando los haplogrupos C y D, y la más reciente llevando las secuencias del haplogrupo A y B.

Para entender la diversidad encontrada en los haplogrupos, Wallace y colaboradores fecharon la principal migración amerindia como posible de ocurrir hacia el 26.000-34.000 A.C, la migración del haplogrupo B ocurriendo hace 2.000-15.000 A.C, y la Na-Dene ocurriendo en el 7.000-9.000 A.C (Wallace, 1995). En contraste, Horai et al. (1993), usando datos de secuencias de la región hipervariable, postuló que cada haplogrupo principal representarían migraciones separadas, que habrían dado inicio entre el 14.000 y el 21.000 A.C.

## **2.16. Los mayas.**

A fin de dar contexto al trabajo del presente estudio, es importante hacer mención de las características históricas que distinguen al pueblo Maya.

Al parecer, el término maya tuvo su origen en el noroeste de Yucatán en el período posclásico, donde fue utilizado por los conquistadores itzas para denominar a los autóctonos (y conquistados) de esa región. El significado original se discute. Según Castañeda Q. E. (1996), el término maya o mayab se refería colectivamente a grupos de personas que organizaban la sociedad, el Estado, la historia, los alrededores, etc., basándose en un calendario en el cual may (palabra yukateka que significa tanto “pezuña” como un período de aproximadamente 260 tuns o años de 360 días) era la unidad privilegiada para calcular el tiempo (Castañeda Q. E. 1996).

Por lo tanto, que el término maya se aplica a las diferentes civilizaciones que florecieron en el sur de Mesoamérica en la época precolombina, y que se puede explicar por el hecho de que las impresionantes reminiscencias de estas civilizaciones, especialmente las ruinas de ciudades como Chichén Itza y Uxmal se encuentran en la misma región donde se habla el idioma (yukateko) maya.

Otros pueblos contemporáneos fueron incluidos entre los “mayas” cuando el término fue utilizado para nombrar la familia lingüística a la que pertenece el yukateko maya. Otto Stoll (1958) aparentemente fue el oligonucleótido etnógrafo que identificó la mayoría de los cerca de 30 idiomas que actualmente se reconocen como ramas del tronco lingüístico mayence (Schackt J., 2002.).

Los antiguos mayas fueron una de las culturas mesoamericanas precolombinas. Contrariamente a la creencia popular, el pueblo maya nunca "desapareció". Millones de sus descendientes aún viven en la región, y muchos de ellos aún hablan alguno de los idiomas de la familia máyense (Farre H., 1984). Lo que sí desapareció fue el esplendor de la civilización maya siglos antes de la llegada de los primeros españoles. La Conquista española se consumó en 1696 con la toma de Tayasal, capital de los mayas Itzá y Zacpetén, capital de los Maya Ko'woj en el Petén, actual Guatemala (Gonzalbo P. E., 2004).

La cultura prehispánica Maya se caracterizó por su elevado conocimiento en matemáticas, escritura, astronomía, así como por su rica arquitectura, arte escultórico y mural, además de una fascinante cosmogonía y religión. En el apogeo del periodo Clásico, el corazón de la zona maya fue el triángulo que tiene como vértices a Palenque en Chiapas, Tikal en Guatemala y Copán en Honduras según se indica en la figura 4 (Bastarrachea, J. R., 1994).

Los mayas construyeron desde el Preclásico medio grandes ciudades como Nakbé, El Mirador, San Bartolo, Cival, localizadas en la Cuenca del Mirador, en el Norte del Petén, y durante el Clásico, las conocidas ciudades de Tikal, Quiriguá, Palenque, Copán, Río Azul, Calakmul, así como Ceibal, Cancuén, Machaquilá, Dos Pilas, Uaxactún, Altún Ha, Piedras Negras, y muchos otros sitios en el área. No desarrollaron un imperio, sino una cultura fruto de su organización en ciudades-estado independientes cuya base era la agricultura y el comercio (Fernández T. I., 1998). Los monumentos más notables son las pirámides que construyeron en sus centros religiosos, junto a los palacios de sus gobernantes y los palacios, lugares de gobierno y residencia de los nobles, siendo el mayor encontrado hasta ahora el de Cancuén, en el sur del Petén, muchas de sus estructuras estaban decoradas con pinturas murales y adornos de estuco (Trejo S., 2000).

Otros restos arqueológicos importantes incluyen las losas de piedra tallada usualmente llamadas estelas (los mayas las llamaban Tetún, o "tres piedras"), que describen a los gobernantes junto a textos jeroglíficos que describen sus genealogías, victorias militares, y otros logros. La cerámica Maya está catalogada como de las más variadas, finas y elaboradas del mundo antiguo. Los mayas participaban en el comercio

a larga distancia en Mesoamérica, y posiblemente más allá. Entre los bienes de comercio estaban el Jade, el cacao, la sal y la obsidiana. (Dorie R-B., 1997)

Durante la época Prehispánica, los mayas habitaron un extenso territorio con diferentes climas y variada vegetación; montañas y planicies, selvas con alta precipitación pluvial y sitios secos, tierras con ríos, lagos y cascadas, y una buena extensión de costas. La zona maya comprendía 389.610 km<sup>2</sup>, lo que en la actualidad son los estados de Quintana Roo, Campeche, Yucatán, Tabasco y el oriente de Chiapas en México; Guatemala, Belice y la parte poniente de Honduras y El Salvador en Centroamérica (Bastarrachea, J. R., 1994)

### **2.16.1. Cultura.**

Los antiguos mayas se caracterizan por su alto nivel cultural, desarrollaron el sistema de escritura más completo de todos los pueblos indígenas americanos. Con él escribieron todo tipo de textos: de medicina, de botánica, de historia, de matemáticas, de astronomía (Vogt E.Z. and Ruz A.L., 1971). Se conservan, además de las inscripciones, algunos códices, entre los que destacan el código de Dresde, escrito en el siglo XIII y que contiene un tratado de adivinación y de astronomía, el código de París, posiblemente del siglo XIII que contiene profecías y adivinaciones, el código de Madrid que contiene horóscopos y almanaques así como el código Grolier que contiene un calendario completo.

El conocimiento en astronomía es algo que ha caracterizado a los mayas, sus observaciones hacia la bóveda celeste les permitió desarrollar un calendario muy preciso, con un año de 365 días. El año solar (haab) tenía 18 meses de 20 días cada uno y otro más de sólo cinco días. Los nombres de los meses eran: Pop, Uo, Zip, Zotz, Tzec, Xul, Yaxkin, Mol, Chen, Yax, Zac, Ceh, Mac, Kankin, Moan, Pax, Kayab, Cumbu y Uayeb (Dante A. R. and María E. M r., 1981). Además de ello, su conocimiento en matemáticas dio lugar al empleo de un sistema de numeración vigesimal posicional. También tenían un signo para representar el cero, y así poder realizar operaciones matemáticas complejas.

**Figura 4.** Ubicación geográfica de las entidades federativas de México y países de Centroamérica con presencia Maya. Los mayas ocuparon una extensa región que incluye en nuestro país a los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas, así como buena parte de Guatemala, Belice, Honduras y El Salvador. En el apogeo del periodo Clásico, el corazón de la zona maya fue el triángulo que tiene como vértices a Palenque (Chiapas), Tikal (Guatemala) y Copán (Honduras).



### **2.16.2. Sociedad**

La elite social la constituían los sacerdotes y los nobles, que residían en la ciudad (que era también el centro religioso). Los campesinos vivían en las zonas rurales cercanas a la ciudad. La base de la economía era la agricultura y frecuentemente se desbrozaban trozos de selva para realizar nuevos cultivos. Los principales fueron el maíz, el algodón y el cacao. Este último tuvo tanta importancia que llegó a ser utilizado como moneda.

Parece ser que existía la esclavitud. Se supone que los esclavos eran la mano de obra para la construcción de las colosales pirámides, pero ayudados por los campesinos, además de que también debieron existir grupos de artesanos especializados (Vogt E. Z. and Ruz A. L., 1971).

### **2.16.3. Vida cotidiana**

El principal espectáculo de los mayas era un juego de pelota. Según algunos investigadores, los jugadores eran los prisioneros de guerra y se decapitaba los que perdían. Pero en realidad era más que un simple juego. Era un ceremonial religioso que representaba el paso de los astros y el sol (representado por la pelota), que es fuente de vida (Pierre A. 1993).

### **2.16.4. Creencias y pensamiento**

Los mayas creían que antes de existir nuestro mundo habían existido otros, pero que estos habían sido destruidos por diferentes catástrofes. El universo tenía tres partes: el cielo, la tierra y el inframundo. El cielo tenía 13 capas (la última de ellas en contacto con la tierra) y cada una gobernada por uno de los Oxalahuntikú. El dios Itzamná, a quien se representaba con forma de reptil o iguana, regía el Cielo en su conjunto. El inframundo estaba debajo de la tierra, y estaba dividido en 9 capas. Cada una de estas capas era gobernada por uno de los Bolontiku o Señores de la Noche. Había además otros dioses que actuaban sobre las cosas cotidianas: el maíz, la miel, los mercados, etc, (De la Garza M. 1978; Lenkersdorf C. 1997; Peissel M., 1981)

### **2.16.5. Bonampak**

Bonampak tuvo su gran esplendor a finales del período Clásico Maya. Abandonado alrededor del año 800 D.C., fue descubierta en la década de los cuarentas. Su nombre en vocablo maya significa: "Muros Pintados", y es justamente a lo que debe su fama este sitio, debido a que uno de sus edificios tiene en sus tres recintos, pinturas en sus muros de una calidad indiscutible (Pincemin D. S., 1994)

Bonampak fue una ciudad maya del periodo Clásico Tardío que floreció entre los años 650 y 900 d.C. Su zona arqueológica es famosa por sus murales, estelas y dinteles fechados, así como por sus edificios de mampostería, representativos de esta gran civilización. Bonampak se ubica en la selva lacandona de Chiapas, en el valle del río Lacanhá y su extensión es de más de cuatro kilómetros cuadrados (Baer P. and Baer M. E., 1969)

Los materiales arqueológicos más tempranos recuperados en Bonampak se remontan al inicio del periodo Clásico (250 d.C.), época en la que el sitio adquirió importancia.

La sociedad maya del Clásico tenía como base económica de subsistencia la agricultura, complementada con los abundantes recursos de la selva. Estaba organizada en varios estratos o clases sociales; sus habitantes pertenecían a ellos, básicamente por nacimiento, matrimonio o por aprender un oficio especializado (Tovalín A. A., 1998)

### **2.16.6. Palenque**

Palenque es una ciudad maya, ubicada lo que hoy es el estado mexicano de Chiapas, cerca del río Usumacinta. Es uno de los sitios más impresionantes de esta cultura. En comparación con otras ciudades mayas, se la considera de tamaño mediano: mucho menor que Tikal o Copán, destaca por su acervo arquitectónico y escultórico (Aveni A. and Horst H., 1997).

El área descubierta hasta 2005 abarca 2,5 km<sup>2</sup>, pero se estima que sólo se ha explorado menos de un 10% de la superficie total que alcanzó la ciudad, permaneciendo aún más de mil estructuras cubiertas por la selva. En 1981, Palenque fue designada Zona Protegida (Navarrete C., 2000).

El nombre maya de la ciudad es Lakam Ha, que significa "Grandes Aguas". La ciudad estaba abandonada cuando tuvo lugar la Conquista de México en el siglo XVI. La primera visita de un europeo a Palenque fue la de Fray Pedro Lorenzo de la Nada en 1567. En aquel entonces, la región era conocida por el pueblo Chol como Otolum, o "Tierra de Casas Fuertes"; por lo cual De la Nada lo tradujo como Palenque que significa "fortificación". La información disponible es producto de las investigaciones arqueológicas pasadas y presentes, y como tal, nuevos datos surgen continuamente, lo cual lleva continuamente a la evolución de las hipótesis establecidas (Ramoni C. D., 1991).

Se cree que los mayas fundaron Lakam Ha durante el período formativo (2500 AC - 300 DC), alrededor del 100 AC, como una aldea predominantemente agricultora, y favorecida por los numerosos manantiales y corrientes de agua de la región. La población creció durante el período Clásico Temprano (200-600), hasta ser una ciudad, llegando a ser la capital de la región de B'akaal (hueso), comprendido en la zona de Chiapas y Tabasco, en el período Clásico Tardío (600-900). La más antigua de las estructuras que han sido descubiertas fue construida alrededor del año 600 (Navarrete C., 2000) B'akaal fue un centro importante de la civilización maya entre los siglos V y IX, durante los cuales alternó épocas de gloria y de catástrofe, de alianzas y guerras (Trejo S., 2000,). Los gobernantes de B'akaal proclamaban que el origen de su linaje venía del pasado remoto, algunos inclusive jactándose de provenir de tiempos prehistóricos, llegando a la creación del mundo actual, que, en la mitología maya, fue en el año 3114 AC. Las teorías arqueológicas modernas especulan que la oligonucleótido dinastía de sus regidores fue probablemente olmeca (Ochoa L., 2000)

En la actualidad, los mayas, caracterizados por el número de hablantes de esta lengua, representan un volumen de población que asciende a 800 mil personas, las cuales se concentran casi en su totalidad en tres entidades federativas: Yucatán, Quintana Roo y Campeche.

Estas entidades presentan niveles de desarrollo socioeconómico distintos, lo cual implica diferencias en los grados de atracción para la población migrante. Lo anterior se refleja en las estructuras por edad y sexo de la población hablante de maya en cada una de las entidades, estructuras impactadas tanto por los movimientos migratorios,

como por los niveles de fecundidad y de conservación o pérdida de la lengua. Estas estructuras son de utilidad para entender o contextualizar con debida distancia, fenómenos sociodemográficos que reflejan, entre otras cosas, las relaciones filogenéticas de este pueblo. (INEGI., 2005a).

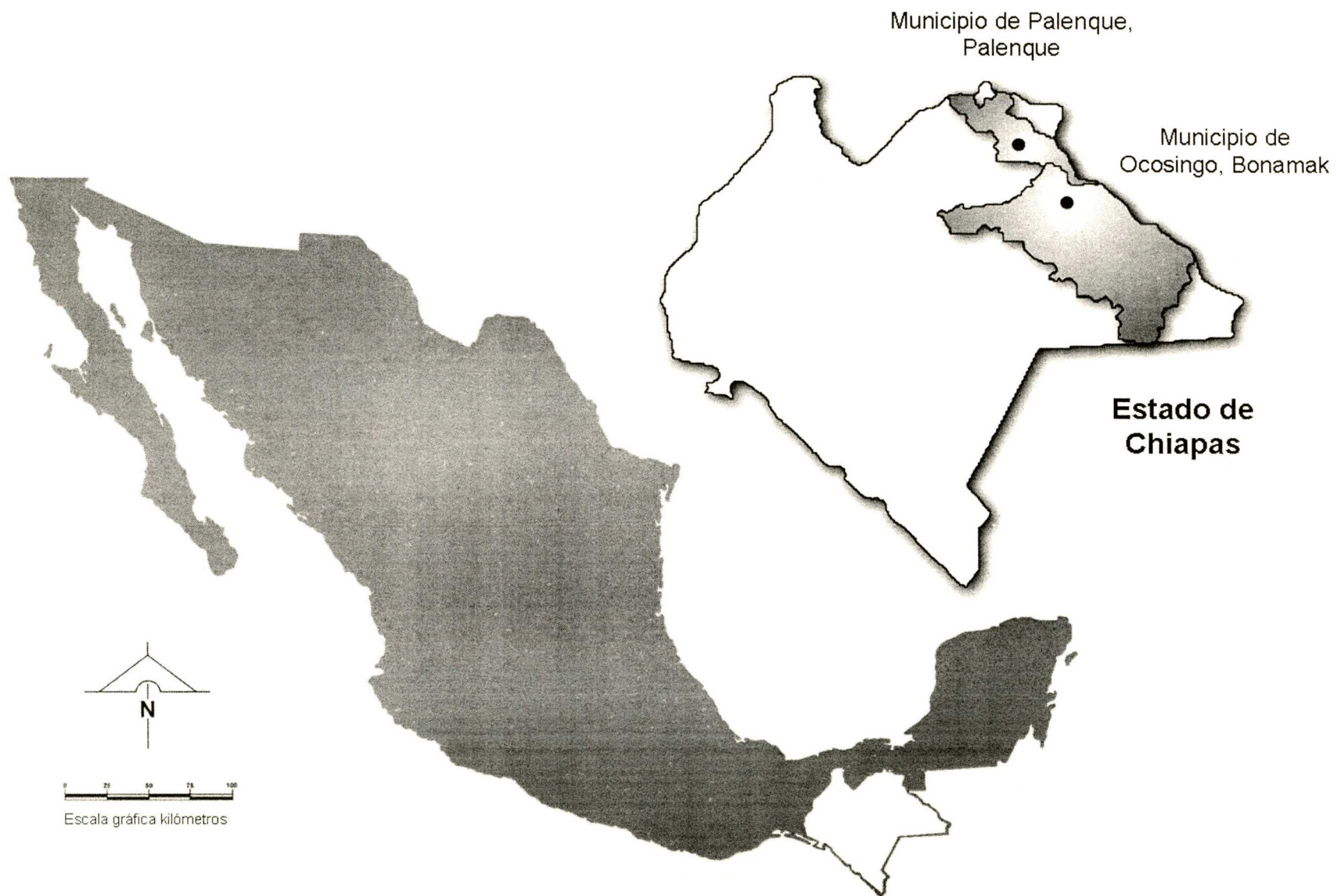
Algunos antecedentes históricos relevantes sobre los mayas de Chiapas son los siguientes:

<b>Año</b>	<b>Acontecimiento</b>
1500. A. C.	Los mayas inician su asentamiento en la región chiapaneca.
1300. A. C.	Se consolidan los centros ceremoniales de Izapa y otros lugares de Chiapas, los cuales se caracterizan por tener una fuerte influencia olmeca.
300. D. C.	Los mayas del área central de Chiapas tienen su máximo desarrollo. Construyen centros ceremoniales, elaboran la escritura jeroglífica, desarrollan la medicina, las matemáticas, la astronomía, las artes plásticas y las innovaciones agrícolas.
550. D. C.	Los mayas parten al Mayab y al oriente de Yucatán; en Chiapas, los que se quedan se fragmentan en numerosos cacicazgos que se hacen la guerra entre sí.
603. D. C.	Inicia el florecimiento del centro ceremonial de Palenque, llegando a tener una extensión de 7 kilómetros de longitud.
900. D. C.	Se establecen los indígenas chiapa, quienes dominan a los grupos mayas locales y fundan guarniciones y colonias en el Soconusco y Zinacantán.
950. D. C.	Llegan los toltecas procedentes del Altiplano Central, quienes imponen sus costumbres y creencias.
1482. D. C.	Los aztecas invaden el Soconusco, pero no pueden vencer la resistencia de los chiapa. Establecen guarniciones en Zinacantán y Soconusco. Se imponen tributos a los pueblos conquistados,

consistentes en ropa, cacao, pieles de tigre y pájaros raros.

1486. D. C. Los aztecas encabezados por Tiltototl someten en Amatenango a los tzeltales.
1522. D. C. Se registra contacto con europeos, siendo Gonzalo de Sandoval quien funda la villa del Espíritu Santo en la margen izquierda del río Coatzacoalcos y reparte entre los colonos extensiones de tierra, en la región chiapaneca. (INEGI., 2005a)

**Figura 5.** Ubicación geográfica de las muestras de restos óseos correspondientes de los sitios arqueológicos de Palenque y Bonampak del estado de Chiapas México



### III. ESTADO DEL ARTE

Son ya numerosas las publicaciones que establecen las condiciones del estado actual de la Antropología Molecular, la cual se ha ido incrementando paulatinamente en el mundo, siendo los países desarrollados las potencias en esta disciplina. En México, existe evidente carencia en cuanto a esta investigación se refiere, si bien el acceso a la tecnología para efecto de investigación es un freno considerable, es la falta de conocimiento de actividades, interdisciplinaridad y comunicación entre las áreas biológicas y sociales el determinante en su lento desarrollo. Situación que sumada a la falta de apoyo institucional hace que su condición se recrudezca a puntos críticos, comprometiendo no sólo a la antropología molecular, sino a las áreas que estarían directamente beneficiadas, tales como la Antropología, Arqueología, Paleontología, Lingüística e Historia entre muchas otras (Nettle D. 1999; Morora I. and Rollo F. 2002; Lewis C. M. et al. 2004).

Aunque existe gran cantidad de publicaciones que han tenido por objetivo la descripción de registros arqueológicos y antropológicos sobre el origen de los primeros pobladores de América y la relación existente entre ellos, solamente en algunos pocos casos se han postulado modelos de poblamiento basados en la evidencia descubierta. Estas aproximaciones son una tarea difícil si se considera que los elementos con que se cuenta, suelen a veces presentar variaciones tan sutiles que existe probabilidad de que los modelos generados sean erróneos, trátase de aproximaciones por construcción de ramas lingüísticas, análisis antropométricos, e información que textiles, cerámica y arquitectura ofrece.

Los antecedentes aportados por la Arqueología, la Antropología Física y la Genética de Poblaciones, sugieren que el establecimiento de pobladores de América se produjo como consecuencia de un evento migratorio originado en el noreste de Asia (Turner 1984; Greenberg et al. 1986; Gibbons 1993). El establecimiento de las poblaciones de América se habría llevado a cabo cruzando el estrecho de Bering, luego de que las condiciones de tránsito fueran favorables, ocurriendo ello hace aproximadamente unos 35.000 años, a este respecto, son el número y la duración de las corrientes migratorias el tema de debate que se mantiene vigente aún en nuestros

días (Torrioni A. et al, 1993; Ward et al, 1993; Merriwether et al, 1995; Bonatto and Salzano 2002). Una vez que los paleoindios cruzaron América del Norte dejando huellas de su presencia en varios sitios arqueológicos se desplazaron por América Central (Lewis C. M. et al. 2004) incluyendo las islas del Caribe (Lleonart R. et al. 1999; Martínez C. J. C. 2002; Lalueza-Fox C. et al. 2003,) hasta América del Sur (Rothhammer F. et al. 2003; Mulligan C. J. 2005).

Sin embargo, esta evidencia apenas describe unas cuantas poblaciones en centro y sur América, de las cuales, la gran mayoría esta basada en poblaciones contemporáneas, de modo que la certeza de los datos se vuelve frágil en cuanto a primeros pobladores y flujos migratorios.

En México, los adelantos más significativos en cuanto Antropología Molecular se refiere están confinados al estudio de variabilidad en poblaciones contemporáneas (Green L. D. et al. 2000; Cerda-Flores R. M. et al. 2002), Cabe decir, que en México, aunque se ha iniciado investigación en grupos prehispánicos sobre muestras antiguas éstos son apenas unos pocos y por desgracia, esporádicos y de casi nula difusión. Son los estudios de poblaciones contemporáneas el eje que prevalece en las investigaciones y consecuentes publicaciones que se generan, las cuales, no por ende dejan de ser significativas e importantes. De modo que las referencias mas próximas con este trabajo serán los estudios con poblaciones contemporáneas, particularmente aquellos referentes al poblamiento de América y por ende, con énfasis en poblaciones del Sureste de México y Centroamérica.

Los primeros trabajos realizados en poblaciones amerindias precolombinas se remiten al análisis con enzimas de restricción con que se determina que las variantes de mtDNA y que han sido obtenidas de poblaciones amerindias contemporáneas, las cuales caen dentro de cuatro grupos constituidos por linajes relacionados. Cada uno de estos grupos o haplogrupos puede ser caracterizado por un marcador de mtDNA específico: la ganancia de un sitio de restricción para la enzima *Hae III* en la posición 663 pb corresponde al haplogrupo A, la pérdida de 9 pb. en la región intergénica COII/tRNA<sup>Lys</sup> es para el haplogrupo B, la pérdida de un sitio para la enzima *Hinc II* en la posición 13259 pb será para el haplogrupo C y la pérdida de un sitio para la enzima *Alu I* en la posición 5176 pb conferirá el haplogrupo D (Schurr et al. 1990; Torrioni A. et

al. 1992, Wallace and Torroni A.,1992). Los datos de secuencia obtenidos muestran una correspondencia entre cada uno de los haplogrupos mencionados con mutaciones específicas presentes en la región hipervariable I (HVI) del mtDNA (Horai et al. 1993, Baillet et al. 1994). Aún cuando más del 95 % de los amerindios analizados caen dentro de alguno de estos cuatro grandes grupos, nuevos posibles linajes fundadores han sido postulados en poblaciones aborígenes actuales (Torroni A., et al. 1993; Baillet et al. 1994; Easton et al. 1996), así como en individuos prehistóricos (Stone and Stoneking 1993, 1998; Ribeiro-dos-Santos et al, 1996). La mayoría de éstos, con excepción de los esqueletos analizados por Ribeiro-dos-Santos corresponden a aborígenes de América del Norte. Recientemente Smith et al. (1999) han descrito para estas poblaciones un quinto haplogrupo fundador denominado X, que se presenta con frecuencias cercanas al 3 % y está definido por la pérdida de sitios para la enzima *Dde I* en las posiciones 1715 y 10394.

Como se podrá ver, existen múltiples dudas en cuanto a primeros pobladores, de manera que no resultará difícil entender la importancia que tienen los estudios de Antropología y Antropología Molecular sobre los pueblos prehispánicos. Para el caso del presente estudio, el pueblo maya.

## **IV. OBJETIVOS.**

### **Objetivo General**

Contribuir al conocimiento de la estructura genética y origen de la población prehispánica maya del Sureste de México (Chiapas) mediante el análisis de mtDNA.

### **Objetivos particulares.**

Determinar la frecuencia de los haplogrupos y secuencias de las regiones hipervariables I y II en la población prehispánica maya.

Caracterizar a nivel de haplogrupo y mapa haplotípico las secuencias del mtDNA antiguo obtenido

Apoyar la hipótesis de colonización de América por cruce de Asia al Nuevo Continente.

Determinar las condiciones de los diferentes métodos de extracción de DNA antiguo.

Determinar la relevancia del tipo de tejido, antigüedad de la muestra, enzimas empleadas en la obtención de DNA de alta calidad.

Validación de resultados.

Elaboración de árboles filogenéticos para proponer patrones de migración de la población prehispánica maya en relación a poblaciones ancestrales y contemporáneas ya reportadas, establecidas en el sureste de México a fin esclarecer posibles relaciones de parentesco.

## **V. MATERIAL Y MÉTODO.**

### **5.1. Material de estudio**

De acuerdo a los objetivos del presente estudio en que se busca rastrear el origen, asentamiento y rutas migratorias de los antiguos pobladores Mayas de Chiapas se concluyó que la fuente del material biológico fuera aquella no sujeta a fenómenos de mestizaje, es decir restos óseos prehispánicos. Si bien las poblaciones aisladas de indígenas americanos contemporáneos asumen carencia de contribución de otras poblaciones no americanas (representados en América por población europea y africana principalmente), se sabe por estudios previos que dicha contribución existe, no así en restos óseos prehispánicos donde el fenómeno de mestizaje antes mencionado es por cuanto se sabe carente en totalidad.

#### **5.1.1. Muestras biológicas antiguas.**

El material biológico antiguo que fue empleado para el presente trabajo partió de las colecciones de restos óseos humanos de los sitios arqueológicos de Bonampak y Palenque del estado Chiapas México, dicho material fue seleccionado y concedido por el Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH) a cargo de los Antropólogos Físicos Adrián Martínez Meza del Museo Nacional de Antropología y Javier Montes de Paz del Centro INAH Chiapas. Ambas colecciones compuestas de huesos esponjosos correspondientes a vértebras torácicas dorsales y epífisis de fémur.

De las muestras correspondientes al sitio arqueológico de Palenque sólo se analizó una fracción del total de individuos hallados en Templo de la Cruz y Templo XV, en que sólo se consideraron 8 y 6 muestras respectivamente. En cuanto a Bonampak y al igual que en Palenque sólo se analizó una fracción del total de individuos hallados, siendo 4 las muestras analizadas (tab. 1).

Adicionalmente fueron incluidas muestras de restos momificados procedente de los estados del Norte y Centro de México (tab. 2), también concedidas por el INAH a cargo del Antropólogo Físico Adrián Martínez Meza. Las muestras correspondientes a la denominada momia *Pepita* corrieron a cargo de las arqueólogas Elizabeth Mejía Pérez

Campos del Centro INAH Querétaro y Ximena Chávez Balderas del Museo del Templo Mayor.

#### **5.1.1.1. Temporalidad de las muestras antiguas.**

Palenque Grupo Templo de la Cruz temporalidad (600-700 DC.)

Palenque Grupo Templo XV, temporalidad (750 y 800 DC.)

Bonampak grupo Frey temporalidad (580 y 800 DC)

Momias del Norte y Centro de México (sin datos de temporalidad)

Momia Pepita (300 AC)

#### **5.1.1.2. Entierros de Bonampak**

El tipo de suelo en los entierros del Grupo Frey de Bonampak son caracterizados por capas de suelo de tierra café con rango de color amarillo a cafetoso y con textura arenosa arcillosa y grado de compactación medio. La ubicación de las muestras arqueológicas analizadas del grupo Frey en Bonampak se indica en la figura 6.

#### **Entierro 1.**

Entierro primario, indirecto y en posición cubito ventral extendido con orientación al oeste. Restos óseos de 1.60 m de longitud, carece del 90 % de la pelvis y 100 % de vértebras, con sólo dos fragmentos de costilla junto al fémur derecho. Rostro trepanado con falta de frontal y maxilar superior, observándose occipital y parte de los parietales. Maxilar superior casi completo. Miembros inferiores completos con falta de algunos dedos. Miembros superiores incompletos conservándose solamente parte del húmero izquierdo y fragmentos del cubito, radio y clavícula derecha así como algunos huesos de la mano y dedos del lado derecho.

La carencia de vértebras y costillas coinciden con falta de tapa de la cista, estando este lugar por la laja cuadrada ya mencionada, lo cual podría ser resultado de un saqueo.

Ofrenda compuesta por dos cajetes y un plato (Fig. 7).

### **Entierro 2.**

Entierro localizado al interior de una cista. Entierro primario, indirecto, en posición cubito dorsal extendido con orientación al oeste. Individuo de cuyos restos ocupan al menos 90 cm de largo. Presencia de cráneo completo y maxilar inferior, vértebras y costillas incompletas, presencia de clavícula y humero derecho. Falanges incompletas y fragmentos del cóccix y pelvis así como un fragmento del fémur derecho e izquierdo.

Presenta como ofrenda dos vasijas y dos cajetes (Fig. 8).

### **Entierro 3.**

Entierro al interior de una cista. Entierro primario indirecto en posición cubito dorsal con orientación al oriente, carece de pelvis y pies, mano derecha, carece de cráneo pero con presencia de mandíbula inferior. Presenta como objeto asociado una cuenta tubular de jadeita.

Presenta como ofrenda jadeita en la boca (Fig. 9).

### **Entierro 4.**

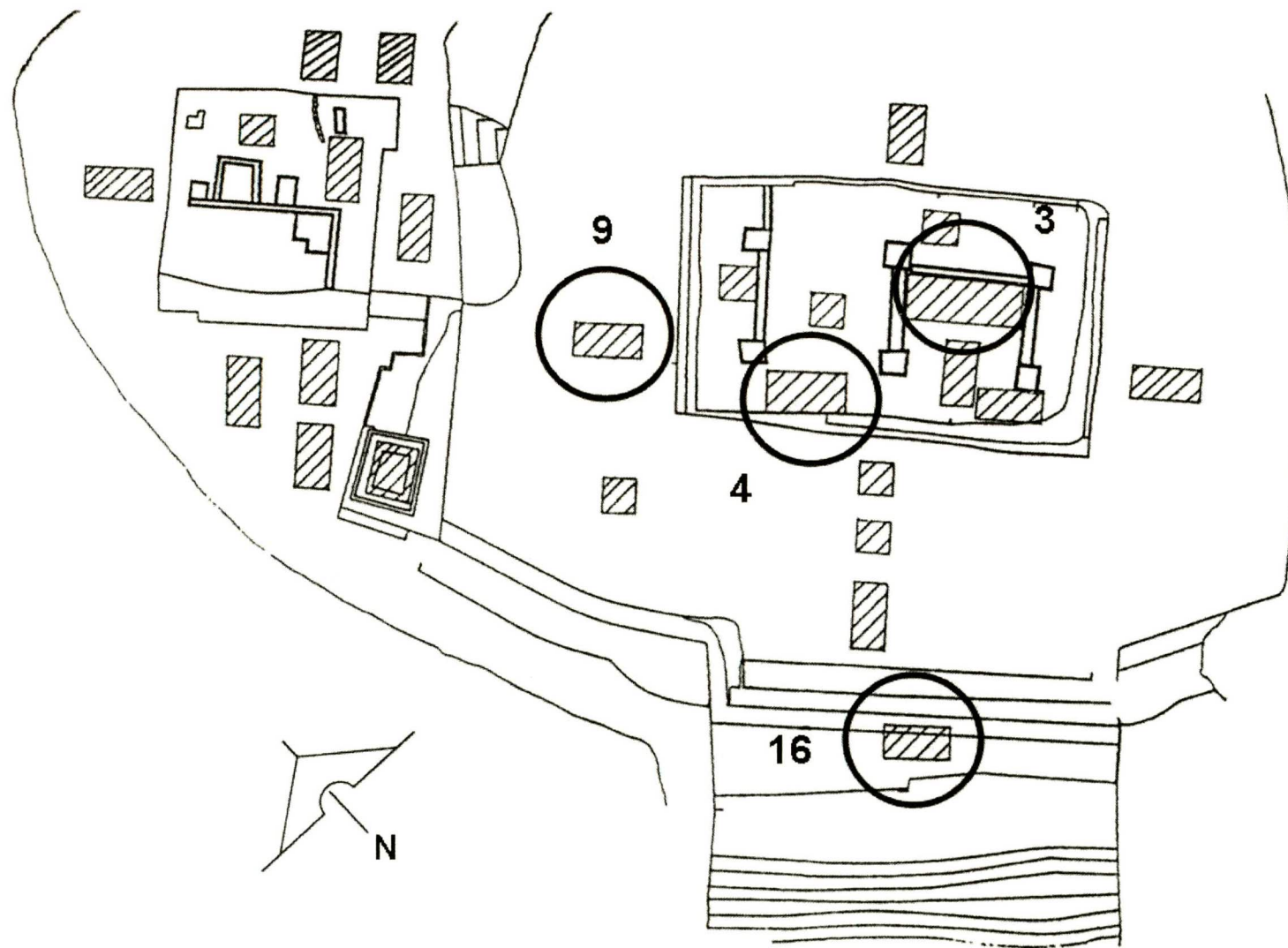
Entierro al interior de una cista. Entierro primario indirecto en posición cubito ventral con orientación al oriente. Cráneo sin mandíbula inferior, carece de pies, pelvis, vértebras, costillas. Presenta Ambos húmeros, y cubito derecho, fémures y tibias y peronés

No hay elementos asociados (Fig.10).

## **5.2. Muestras de control con DNA antiguo**

Las muestras empleadas para los controles y estandarización de metodologías en DNA antiguo partieron de los restos óseos de un individuo de temporalidad colonial procedente de la Ciudad de México (restos con antigüedad aproximada de 350 años), restos también concedidos por el INAH a cargo del Antropólogo Físico Adrián Martínez Meza, de estas muestras analizaron huesos esponjosos correspondientes a vértebras torácicos dorsales y epífisis de fémur.

**Figura 6.** Ubicación de pozos correspondientes a las muestras arqueológicas analizadas del grupo Frey en Bonampak



**Figura 7. Características del entierro 1 del grupo Frey en Bonampak**

**Proyecto Bonampak.**

**Edificio 1**

**Pozo 3.**

**Entierro 1.**

**Planta y cortes.**

Fig 1. Planta tapa cista

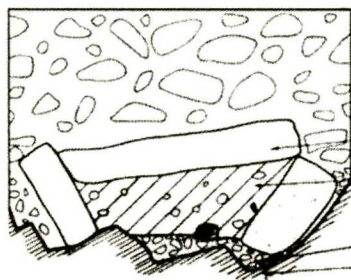
Fig 2. Planta entierro

Fig 3. Corte transversal del entierro

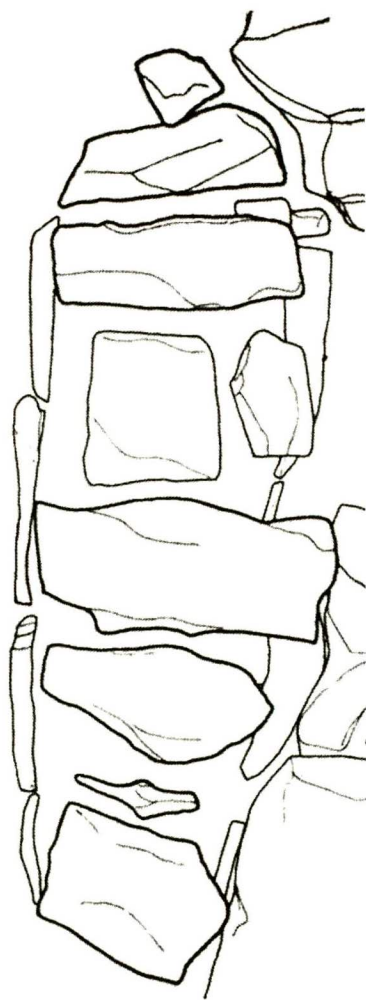
Fig 4 . Foto de planta entierro



**Fig 3.**



**Fig 1.**



**Fig 2.**



**Fig 4.**



**Figura 8. Características del entierro 2 del grupo Frey en Bonampak**

**Proyecto Bonampak.  
Edificio 1  
Pozo 4.  
Entierro 2.  
Planta y cortes.**

Fig 1. Planta tapa cista

Fig 2. Planta entierro

Fig 3. Corte transversal del entierro

Fig 4 a. Foto de planta entierro

Fig 4 b. Foto de detalle de cráneo

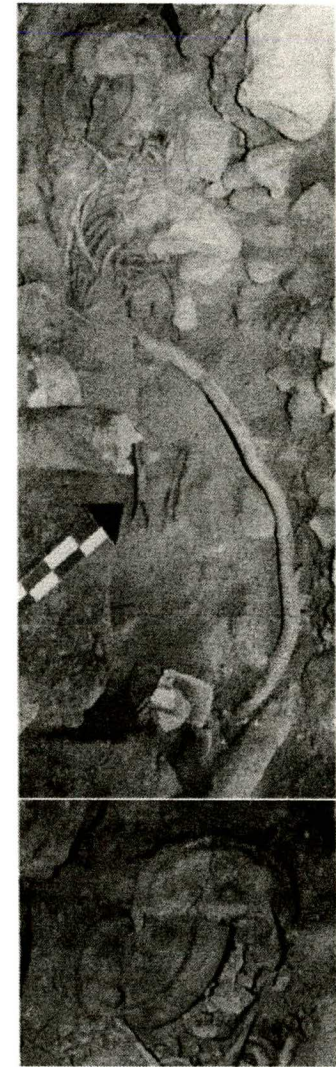
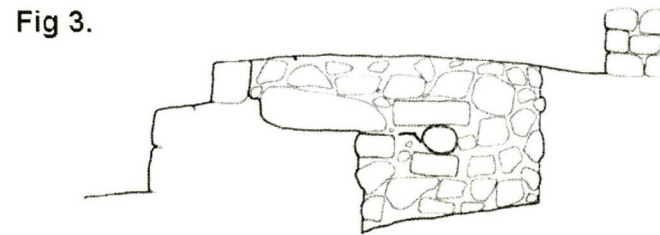
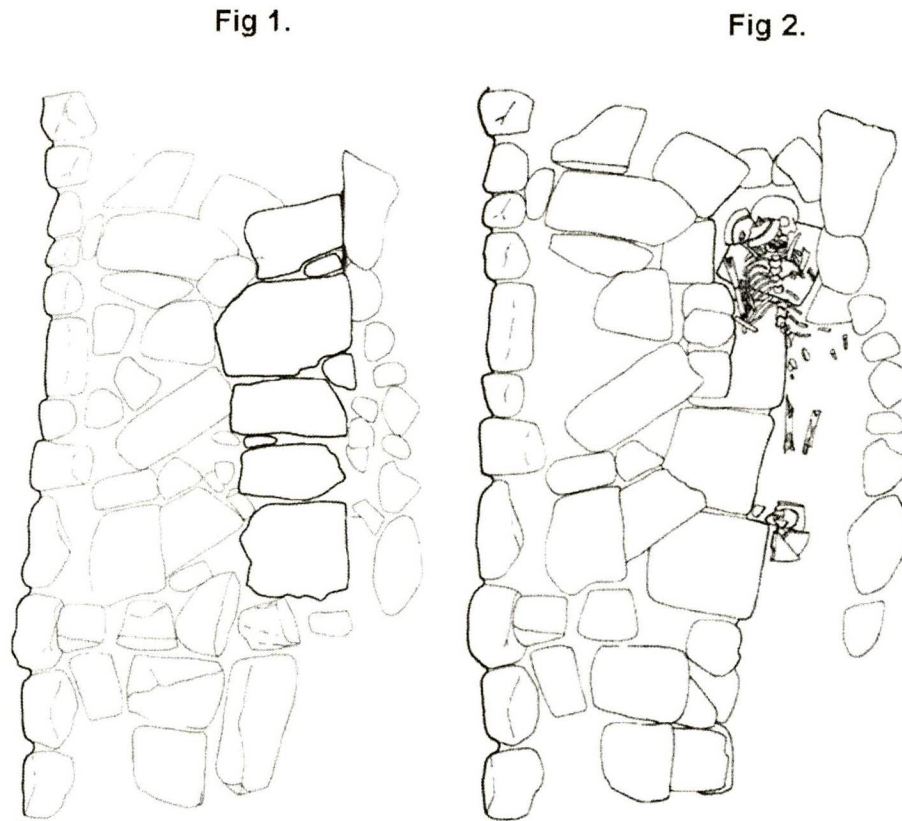
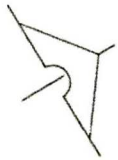


Figura 9. Características del entierro 3 del grupo Frey en Bonampak

Proyecto Bonampak.  
Plataforma superior  
Pozo 9.  
Entierro 3.  
Planta y cortes.

Fig 1. Planta tapa cista

Fig 2. Planta entierro

Fig 3. Corte transversal del entierro

Fig 4 a. Foto de planta entierro

Fig 4 b. Detalle de mandíbula

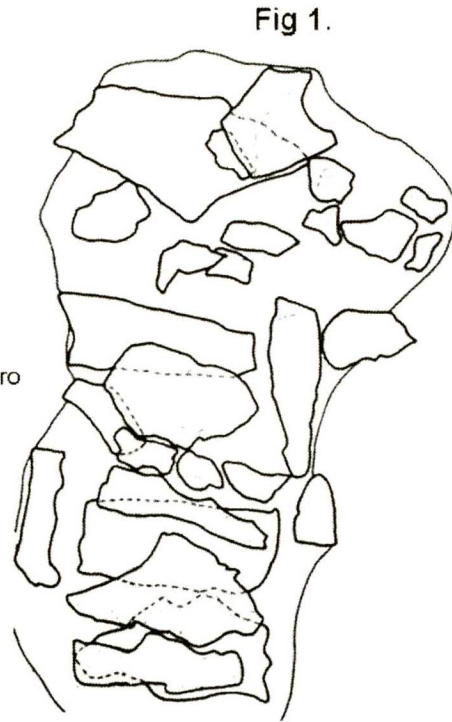


Fig 1.

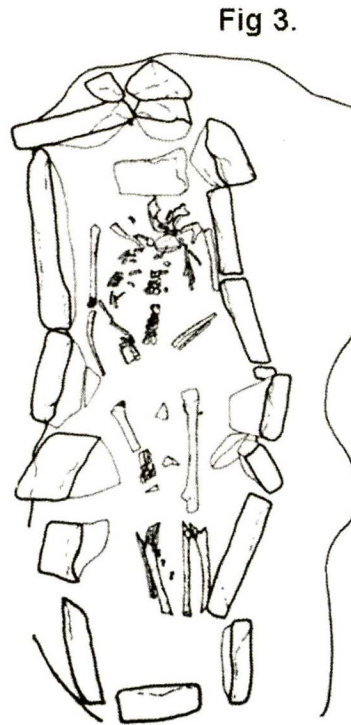


Fig 3.

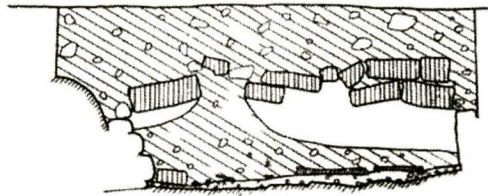


Fig 3.



Fig 4 b.



Fig 4 a.

**Figura 10.** Características del entierro 4 del grupo Frey en Bonampak

**Proyecto Bonampak.  
Quinto tramo de escalera  
Pozo 16.  
Entierro 4.  
Planta y cortes.**

Fig 1. Planta tapa cista

Fig 2. Planta entierro

Fig 3. Corte transversal del entierro

Fig 4 . Foto de planta entierro

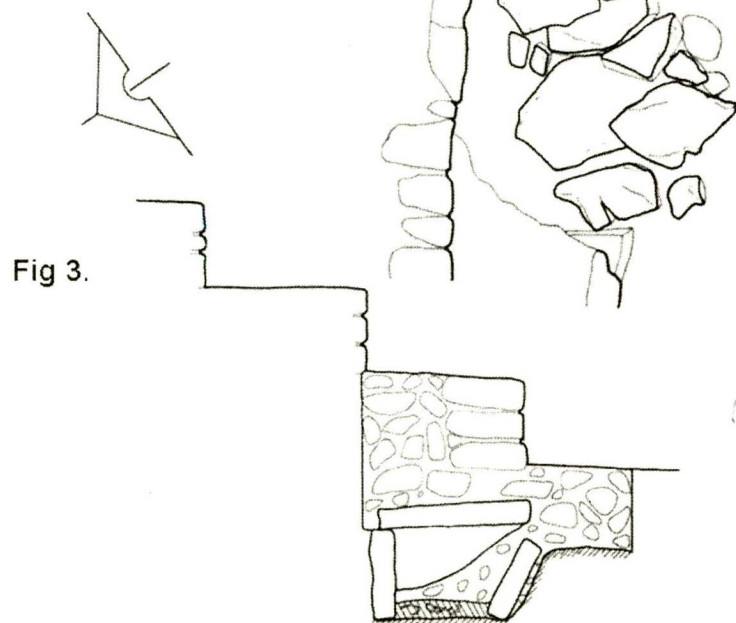


Fig 1.

Fig 2.

Fig 4.



**Tabla 1.** Muestras arqueológicas de restos óseos de Bonampak y Palenque del estado de Chiapas México, indicando la designación y tipo de entierro funerario.

Palenque Grupo Templo de la Cruz (PGTC)

Muestra	Designación	Tipo funerario / Individuo
(8)	PGTC-1	Tumba 7-B Individuo 2
(9)	PGTC-2	Tumba No. 10
(10)	PGTC-3	Tumba 7-B Individuo 1
(11)	PGTC-4	Tumba 7-C
(12)	PGTC-5	Tumba No. 7-B
(15)	PGTC-8	Entierro No. 7 Individuo A
(16)	PGTC-9	Tumba No. 7
(17)	PGTC-10	Tumba No. 6 Individuo A

Palenque Grupo Templo XV (PGTXV)

Muestra	Designación	Tipo funerario / Individuo
(19)	PGTXV-1	Entierro No. 3
(21)	PGTXV-3	Tumba No. 5
(22)	PGTXV-4	Tumba No. 6
(23)	PGTXV-5	Entierro No. 1
(24)	PGTXV-6	Entierro No. 6
(25)	PGTXV-7	Entierro No. 6 Individuo C

Bonampak Grupo Frey (BGF)

Muestra	Designación	Tipo funerario / Individuo
(42)	BGF-1	Entierro No.1
(43)	BGF-2	Entierro No.2
(44)	BGF-3	Entierro No.3
(45)	BGF-4	Entierro No.4

### 5.3. Muestras de control con DNA contemporáneo

Para descartar falsos positivos de DNA antiguo en las muestras de interés se consideró necesario el análisis de haplogrupos y región hipervariable de los integrantes que conforman el equipo de trabajo de DNA antiguo del CINVESTAV, de los cuales se procesaron muestras de pelo, saliva y sangre periférica completa.

**Tabla 2.** Muestras arqueológicas de restos momificados procedentes de los estados del Norte y Centro de México indicando sitio arqueológico de las muestras, designación y tipo de entierro funerario.

Momias

Muestra	Designación	Individuo	Tipo de Muestra
(1)	M-1	Tarahumara/ la ventana/col. I/momia No.II	Cabello
(2)	M-2	México/Ent.8/Est.4/Col. I/No.5	Piel
(3)	M-3	Momia/F-9	Piel
(4)	M-4	Tarahumara/ la ventana/momia No.V	Piel
(5)	M-5	Momia/No.5/Infantil	Piel
(6)	M-6	Momia/F-12	Piel
(7)	M-7	Tarahumara/ la ventana/momia No.IV/inf	Cabello
S/N*	<i>Pepita</i>	México/Querétaro	Músculo

\* Sin número.

#### 5.4. Estrategia experimental y metodología.

La estrategia experimental tiene por objeto el establecer la vía más adecuada y exitosa hacia los objetivos que se plantean, siendo en nuestro caso la determinación de variabilidad genética, es así que de los múltiples marcadores empleados en estudios moleculares se optó por el análisis de polimorfismos de longitud por fragmentos de restricción (RFLPs) y secuenciación directa del mtDNA, lo anterior con base en las características que el mtDNA presenta. Del estudio de RFLPs y secuenciación directa para las regiones hipervariables I y II se caracterizaron los haplotipos A, B, C y D, con objeto en ambos casos, de su posterior análisis *in silico* a fin de determinar las frecuencias de los haplotipos e inferencia de la relación filogenética entre y al interior de los grupos.

El análisis del polimorfismo presente en los haplotipos así como el de las secuencias de las regiones hipervariables, traen consigo una serie de pasos metodológicos ineludibles, que van desde la estandarización de técnicas de aproximación general y particular para la extracción de DNA en las muestras de interés hasta el procesamiento *in silico* de los datos obtenidos. En cada caso se eligió la

técnica y metodología que por sus características resultaron factibles de ser aplicadas con resultados prometedores.

Los principales pasos que enmarcan la estrategia experimental son señalados en la figura 11.

#### **5.4.1. Consideraciones para el manejo de DNA antiguo.**

En el manejo de DNA antiguo se deben considerar todos los aspectos que puedan influenciar su análisis, siendo la aplicación adecuada de las técnicas y la eliminación de contaminantes el principal reto.

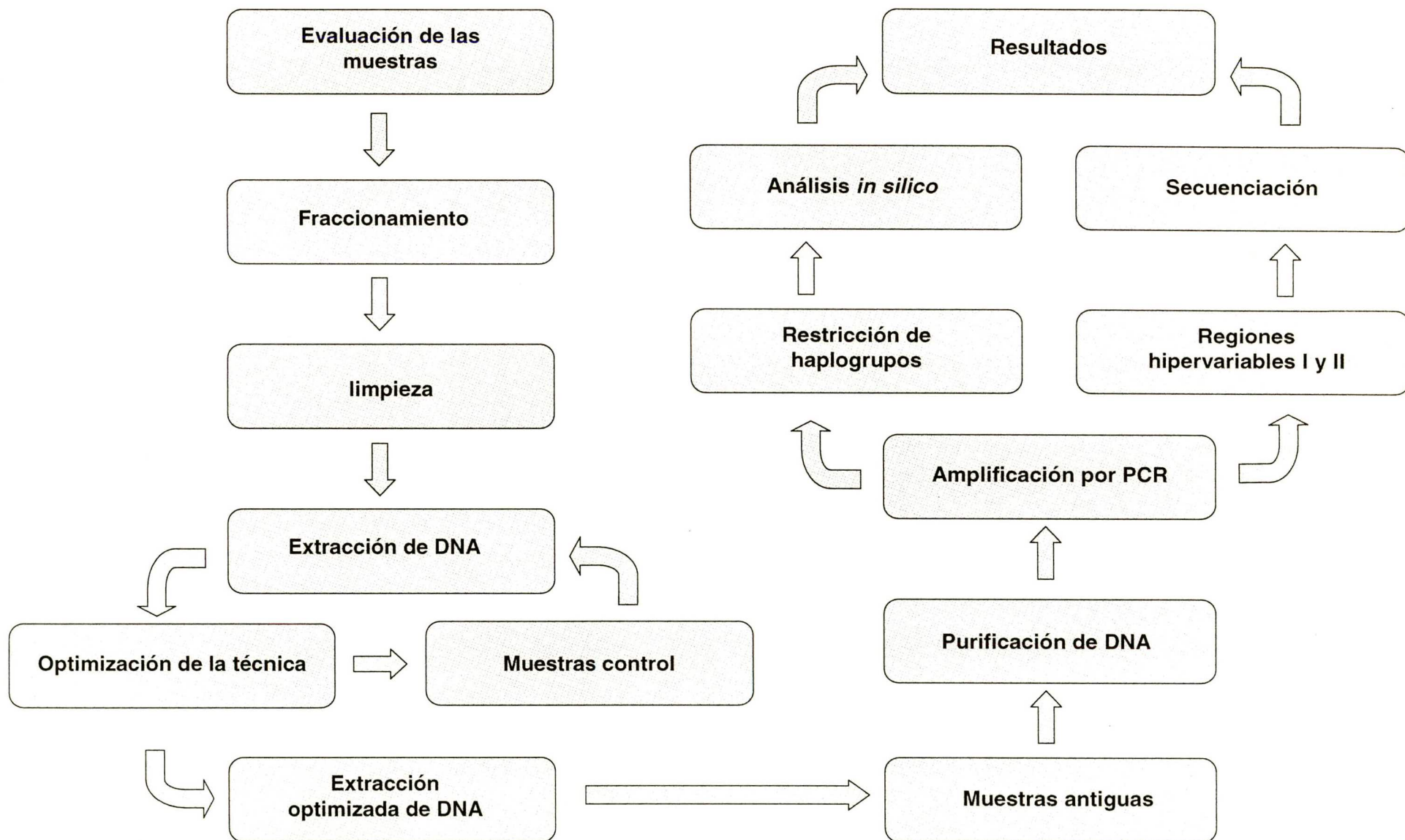
La aplicación adecuada de una técnica inicia desde la preparación de reactivos hasta su incidencia y reactividad con el material de interés en forma y tiempos indicados, ya sea por el señalamiento que los antecedentes bibliográficos ofrecen como por los resultados que el trabajo experimental genera. Así mismo, la eliminación de contaminantes juega un papel fundamental, pues implica la limpieza de las muestras, que si bien considera la eliminación de remanentes propios del suelo en que las muestras fueron encontradas, comprende también la eliminación de DNA contaminante (Gilbert M. T. et al. 2003; Mulligan C. J. 2005)

#### **5.4.2. Limpieza y consideraciones previas.**

Todas las muestras fueron manipuladas en forma independiente en campana de bioseguridad acrílicas. Tanto la campana como el área contigua estuvieron sujetas a limpieza antes y después del manejo de material mediante el empleo de una solución de hipoclorito de sodio en concentración al 10 %, buscando humedad constante por al menos 10 minutos, posteriormente las superficies fueron limpiadas con agua estéril por dos veces. El área asignada para este fin fue determinada en forma estratégica a fin de evitar fluctuaciones de temperatura y corrientes de aire.

Durante la manipulación de las muestras se hizo uso de los materiales mínimos necesarios para el manejo de DNA antiguo, esto es: bata de algodón, cubreboca, careta o lentes protectores, cofia así como uso de guantes quirúrgicos, estos últimos, sujetos a irradiación U.V por ambos lados previo uso.

Figura 11. Estrategia experimental.



Antes de cada práctica se verificó que todo el material reutilizable estuviera estéril antes de su empleo, para ello el material de vidrio fue enjuagado, lavado y pasado en solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 30 minutos, autoclaveado e irradiado con U.V en exposición mínima de 10 minutos. En los casos en que el material reutilizable no pudo ser autoclaveado se optó por irradiarlo con U.V en posiciones tales que todas las áreas de posible contaminación quedaran expuestas, cada una de ellas por tiempo mínimo de 10 minutos. Respecto de otros consumibles tales como tubos tipo eppendorf, falcon etc, se tuvo en cuenta de que fueran nuevos y de uso único, En el caso de puntas para micropipeta, que estas contaran con filtros, y al igual que los tubos no estuvieran sujetos a nuevo uso. (Yang D.Y., et al. 2003; Wisely S.M. et al. 2004; Yang D. Y. and Watt K. 2005).

#### **5.4.2.1. Limpieza de las muestras.**

Las muestras remitidas al laboratorio y que excedieron un área de 5 X 3 cm, debieron ser fraccionadas en un tamaño aproximado de 5 X 3 cm. El excedente de muestra fue entonces almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las muestras óseas seleccionadas fueron limpiadas con método mecánico de abrasión, consistente en cepillado y raspado mediante cepillo y escalpelo, siendo estos material de desecho inmediato por cada muestra.

En los casos en que se trabajo material momificado, y en particular pelo, la eliminación de contaminantes de su superficie se llevó a cabo mediante lavados de agua estéril. Los lavados se desarrollaron de forma cuidadosa y tantos como fueron necesarios, lo cual implicó que las muestras no fueran fraccionadas o disgregadas durante esta etapa, hecho que se tuvo presente cuando las muestras presentaron fragilidad extrema.

Realizada la limpieza mecánica en las muestras óseas como en las momificadas se procedió a su irradiación con U.V durante 3 minutos por lado. Para favorecer la incidencia de irradiación las muestras fueron colocadas en papel aluminio previamente radiado. Es importante señalar que en cada caso sólo se manipuló una muestra a la vez, repitiendo las condiciones de limpieza y esterilidad entre cada muestra.

#### **5.4.2.2. Molido de muestras**

Una vez que la muestra se halla libre de los contaminantes de superficie ésta se tritura, proceso que se facilita cuando la muestra se congela a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por al menos 24 horas. Para la trituración y molido de la muestra se hizo uso de mortero y pistilo. El triturado y molido de la muestra se hace, de ser posible, a punto de polvo. Posteriormente cada muestra es pesada, tomando de ella y de ser posible la cantidad de 1 g. En los casos en que la cantidad fue menor a la señalada se optó por procesar toda la muestra. La muestra una vez molida y pesada es entonces colocada en tubos eppendorf de 1.5 ml. Las muestras fueron entonces almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción.

#### **5.4.3. Extracción de DNA**

Es importante aclarar que no existe un protocolo estándar para la extracción DNA antiguo, por lo que las muestras a analizar en este trabajo fueron sujetas según los métodos de extracción de DNA contemporáneo y modificación de los mismos de acuerdo a lo que se señala en trabajos previos, siendo el método de fenol-cloroformo la técnica de inicio para deliberar las adecuaciones pertinentes o empleo de otros métodos de extracción cada vez que se consideró necesario, ya fuera para la extracción o en la purificación del DNA. Entre las técnicas de extracción y purificación de las que se hizo uso, se encuentran los métodos de Chelex, isotiocianato de guanidina y los sistemas comerciales con base en gel o matriz de sílice GeneClean y QIAquick respectivamente. La consideración de contar con una batería de métodos de extracción o purificación obedece a que las variables que influyen en la preservación del DNA no son bien conocidas, lo que implica que no sea posible la estandarización de un método, incluso para las muestras obtenida de un mismo individuo.

##### **5.4.3.1. Método de extracción por fenol/cloroformo para DNA antiguo.**

La obtención de DNA en muestras antiguas mediante extracción orgánica ha resultado ser uno de los principales métodos de uso. Este procedimiento generalmente se conoce como "fenol/cloroformo" y tiene como fundamento tres etapas que consisten en digestión, extracción y precipitación, etapas que son continuamente modificadas,

tanto en sus componentes como sus procedimientos, cada vez que lo que se busca es la optimización de rendimiento y calidad cuando se procesan muestras antiguas. La técnica que aquí se presenta es una más de las adecuaciones desarrolladas, la cual ha sido puesta a punto por el laboratorio de la Dra. Ma. Lourdes Muños Moreno del CINVESTAV.

#### **5.4.3.1.1. Lisis celular.**

La muestra una vez pesada, trátase de 1 g. o menos es puesta en un tubo para centrifuga de 20 ml. Se agrega a la muestra 5 ml de solución amortiguadora para extracción (Tris-HCl 10 mM; EDTA 0.1 M; SDS al 0.5%). Se añaden 40 µl de la solución de Proteinasa K en concentración de 20 mg/ml. El tubo es sellado con parafilm y la muestra se incuba por 1 hora a 37°C, al término del tiempo la muestra se incuba 2 horas a 50°C.

#### **5.4.3.1.2. Extracción del DNA.**

La extracción de DNA se realizó en tres pases. El oligonucleótido pase con 5 ml de fenol saturado (pH 8), segundo pase con 5 ml de fenol/cloroformo (1:1) y tercer pase con 5 ml de fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico (25:24:1). En cada pase se agita la muestra con movimiento suave por 15 minutos, posteriormente la muestra es centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm, para finalmente recuperar la fase acuosa. Tanto agitación como centrifugado se hace a temperatura ambiente.

#### **5.4.3.1.3. Precipitación.**

La fase acuosa que fue recuperada en el último pase de extracción de DNA se le adiciona etanol absoluto y acetato de sodio 3 M. en proporción de 2.5 y 0.1 volumen por muestra recuperada, es decir 12.5 ml de etanol y 0.5 ml de acetato de sodio. La mezcla se guarda a -20 °C una noche ó de 1 a 2 horas a -70 °C. Finalmente se centrifuga por 30 minutos a 4 °C a 10 000 rpm. Se elimina el sobrenadante y se lava la pastilla con etanol al 70%, posteriormente se centrifuga por 10 minutos a 10 000 rpm. Nuevamente se elimina el sobrenadante. La pastilla se deja secar a temperatura ambiente y se

resuspende posteriormente en 0.5 ml de agua estéril libre de nucleasas durante una noche a 4 °C.

### **5.5.3.2. Variaciones de la técnica.**

Como parte de los métodos alternativos se procedió a la estandarización del método fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico en la variante de descalcificación con EDTA 0.5 M, pH 8 y lisis celular mediante adición de ditioneitol (DTT) 1 M, el cual es un detergente iónico que permite solubilizar componentes celulares.

#### **5.5.3.2.1. Descalcificación.**

En el método de descalcificación la muestra ósea que ha sido molida es puesta en un tubo falcon de 50 ml al cual se le adicionan 10 volúmenes de EDTA 0.5 M, pH 8 por peso de muestra, lo que implica que a 1 g de muestra se le adicionen 10 ml de EDTA 0.5 M, pH 8. La muestra entonces es incubada a temperatura ambiente con agitación suave y constante por 24 horas, al término de este tiempo la muestra es centrifugada a temperatura ambiente durante 10 minutos a 5 000 rpm, al término del centrifugado el sobrenadante es desechado. La muestra que se halla en forma de pastilla entonces es lava con agua estéril mediante agitación suave por 1 minuto y se centrifuga en las condiciones antes señaladas y el sobrenadante se elimina de nueva cuenta. Finalmente el DNA es extraído de la muestra a través del método de fenol/cloroformo.

#### **5.5.3.2.2. Lisis celular mediante adición de DTT.**

Aunque la aplicación de DTT suele estar confinado para la eliminación de puentes disulfuro en células espermáticas procedentes de muestras relacionadas a delitos sexuales, o bien en la eliminación de la matriz de colágena de hueso relativamente contemporáneo, se optó su aplicación para material antiguo, asumiendo que pequeñas cantidades de colágena y queratina pudieran estar aún presentes en muestras de pelo y piel momificada (Urist, M. R. et al, 1975). Las muestras fueron sujetas a la extracción por el método de fenol/cloroformo en donde se incluyó la adición

de 15  $\mu$ l de DTT 1M por cada 0.5 ml de la solución amortiguadora de extracción mediante el procedimiento ya señalado.

#### **5.5.3.3. Extracción de DNA de pelo con raíz mediante Chelex .**

Chelex es una resina quelante con alta afinidad por iones metálicos polivalentes. La resina Chelex está compuesta de copolímeros de acrilato de divinilbenzeno que contiene iones de iminodiacetato los cuales actúan quelando los grupos metálicos. La presencia de Chelex durante el incremento de temperatura cercano al punto de ebullición previene la degradación del DNA por quelación de los iones metálicos que pueden catalizar la ruptura del ADN en soluciones con fuerza iónica baja (Singer-Sam, J., Tanguay, R., 1989).

El procedimiento básico de extracción por Chelex consiste en la incubación a 56°C (por al menos 6 a 9 horas) o toda la noche de la raíz del pelo (5 pelos son suficientes) en una solución de 200  $\mu$ l de Chelex al 5 %, al término del tiempo la muestra se mezcla en vortex a alta velocidad por 5 a 10 segundos para posteriormente ser incubada en un baño de agua hirviendo durante 8 minutos, la mezcla se deja enfriar para luego centrifugarla a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos a 10 000 rpm. Finalmente una fracción del sobrenadante consistente de 5  $\mu$ l es adicionada directamente a la mezcla de PCR (Singer-Sam et al 1989).

#### **5.5.3.4. Extracción de DNA de sangre completa.**

La sangre completa fue recolectar por punción venosa en 1 tubo vacutainer de 5 ml con EDTA. 100  $\mu$ l de sangre fueron adicionados en 1 tubo eppendorf de 1.5 ml al cual previamente se había adicionado 1 ml de agua bidestilada, luego la sangre fue mezclada en vortex a alta velocidad hasta que ésta se mezcló perfectamente para posteriormente centrifugarse por 3 minutos a 11 500 rpm a temperatura ambiente. Con mucho cuidado y sin disolver la pastilla se eliminó todo el sobrenadante menos unos 50  $\mu$ L de éste. El procedimiento de lavado se repitió por dos a tres veces hasta eliminar la mayor cantidad de eritrocitos. La extracción de DNA se realizó mediante la técnica de fenol/cloroformo en proporción de 0.5  $\mu$ L de solución amortiguadora de extracción, realizando todo los pases de la extracción en tubos eppendorf de 1.5 ml.

#### **5.5.4. Análisis de la calidad del DNA extraído.**

Dado el estado de degradación en que comúnmente se encuentra el DNA antiguo, además de los contaminantes presentes, se optó necesario evaluar la condición del DNA previo al proceso de amplificación de las regiones de interés. Para ello, se procedió al corrimiento electroforético del DNA en geles de agarosa al 1 % en solución amortiguadora TAE con 5  $\mu$ l de bromuro de etidio por 100 ml de gel de agarosa con un volumen de adición de 20  $\mu$ l de DNA extraído más 1  $\mu$ l de solución amortiguadora de carga y aplicación de carga eléctrica de 100 voltios durante 1 hora. La visualización se realizó en un transiluminador con irradiación U.V. Cada corrimiento fue acompañado por un marcador de peso molecular de 1000 pb. En los casos en que observó trazas de contaminación (perceptibles por fluorescencia en luz U.V.), las muestras fueron sometidas a métodos de purificación, procedimientos que a continuación serán descritos. En los casos en que se observaron grandes cantidades de DNA (situación poco común), las muestras fueron diluidas.

#### **5.5.5. Eliminación de contaminantes por método de dilución.**

Uno de los métodos más simples pero quizá más efectivo consiste en la dilución de la muestra extraída, de este modo los inhibidores son reducidos a cantidades mínimas tales que el efecto de inhibición no se presenta, sin embargo se corre el riesgo de reducir también la cantidad de DNA y que en muchos casos suele ser poco, dando lugar a pérdida de amplificadores necesarios para su posterior análisis. El método de dilución se realiza por adición del eluyente en que la muestra fue suspendida luego del proceso de precipitación en orden creciente que puede ir de 1:10, 1:20, 1:40, etc.

#### **5.5.6. Eliminación de sales mediante Chelex**

El exceso de sales presentes en forma de iones que coprecipitan con el DNA suele comprometer el proceso de amplificación de PCR al modificar el pH y molaridad de la mezcla de reacción. En algunos casos este fenómeno puede ser aminorado e incluso corregido cuando el DNA se eluye en una solución iónica baja, siendo el agua bidestilada y libre de nucleasas el eluyente más adecuado. Sin embargo, esto no

necesariamente es posible cada vez que dichas sales se encuentran en cantidades que superan las condiciones estándar de la mezcla de reacción. El empleo de Chelex puede en cierta medida solucionar tal problema. El procedimiento consiste en preparar una solución madre de Chelex al 15 %, la solución se mezcla perfectamente y se toman de ella 67  $\mu$ l los cuales se adicionan a un tubo eppendorf nuevo y estéril de 1.5 ml, para posteriormente adicionar 133  $\mu$ l del DNA extraído, a fin de obtener una concentración final de Chelex al 5 %, la mezcla entonces se procesa tal como se indicó en la extracción de DNA de pelo con raíz mediante Chelex.

#### **5.5.7. Eliminación de sales mediante columnas concentradoras.**

Otro de los métodos de eliminación de sales puede llevarse a cabo a través de columnas concentradoras, el sistema comercial de columnas centricon (Amicon) consistente en membranas anisotropicas permite la retención de solutos con tamaño superior al de cohorte que la membrana establece, de este modo las sales en forma de iones pasan libremente a través de la membrana. Su aplicación evita el paso de precipitación con etanol luego de la extracción orgánica, así mismo, la cantidad de DNA es concentrada en un volumen no superior de 70  $\mu$ l que puede ser diluido posteriormente pues el volumen retenido depende del ángulo del rotor en que se lleva el centrifugado. Si bien las columnas Centricon 100 muestran eficacia en muestras con DNA en tamaño superior a los 150 pb, es recomendable el empleo de columnas Centricon 50 cuando se presume DNA sumamente degradado. En el presente trabajo se hizo uso de columnas centricon 100 según las recomendaciones del fabricante, detalles de su aplicación son discutidos en resultados.

#### **5.5.8. Purificación por electroforésis.**

Muchos inhibidores suelen ser contaminantes que al igual que las sales copurifican con el DNA, hecho que los identifica como sustancias polares, muchas de ellas moléculas de bajo peso molecular y que pueden ser observadas durante el análisis de calidad del DNA. Su eliminación inicia con la reducción del volumen del DNA extraído, procedimiento que se lleva a cabo mediante centrifugación con vacío controlado hasta un volumen de 50  $\mu$ l, la muestra entonces es corrida en geles de

agarosa al 1 % en condiciones iguales a la realizada para el Análisis de la calidad del DNA. El mtDNA se identifica por migración en el rango de 15 000 a 16 000 pb teniendo como referencia el marcador de peso molecular de 1000 pb. El gel es recortado alrededor de la banda con ayuda de una navaja nueva y estéril y el DNA es entonces purificado con auxilio de los sistemas comerciales basados en sílica, trátase de columnas o geles. Finalmente el DNA se eluye en agua libre de nucleasas con 20 % menos del volumen en que el DNA se encontrara hasta antes de la reducción de volumen con vacío controlado

### 5.5.9. Aplicación de Albúmina Sérica Bovina

Otro método comúnmente empleado en la eliminación de contaminantes en DNA antiguo consiste en la adición de Albúmina Sérica Bovina (BSA) a la mezcla de reacción (Pääbo et al. 1988; Hagelberg et al. 1989), con ello se busca evitar la inhibición que generan los contaminantes con grupos fenólicos, capaces de formar puentes de hidrógeno con el oxígeno del enlace peptídico de múltiples proteínas, entre ellas la polimerasa. La BSA secuestra este tipo de contaminantes y detiene la inhibición a la que puede estar sujeta polimerasa, además de impedir que los componentes de PCR se adhieran a las paredes de los tubos en que se lleva a cabo la reacción, haciendo que estos estén disponibles durante la reacción.

### 5.5.10. Amplificación de DNA por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los haplotipos se utilizó una mezcla de reacción de 30 µl por muestra con los siguientes componentes:

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
Solución amortiguadora 10 X	3	1 X
dNTPs	0.4	200 µM
Oligo (A1,B1,C1 y D1)*	0.22	22 pmoles
Oligo (A2,B2,C2 y D2)*	0.22	22 pmoles
BSA 2 %	1	0.06 %
Agua estéril libre de nucleasas	19.31	
DNA	5	
Taq polimerasa	0.9	3 U

\*Donde A1-2, B1-2, C1-2 y D1-2 corresponden a cada juego de oligonucleótidos de su respectivo haplogrupo y reacción de PCR

Para la amplificación de los cuatro haplotipos se utilizaron las siguientes condiciones de termociclado:

5 minutos a 94 °C para activación de la polimerasa y 30 ciclos que comprenden:

	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Desnaturalización	1	94
Alineamiento	1	59
Elongación	1	72

y 10 minutos a 72 °C de elongación final.

Para la amplificación de las regiones hipervariables I y II se utilizó una mezcla de reacción de 30 µl por muestra con los siguientes componentes:

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µl)</b>	<b>Concentración final</b>
Solución amortiguadora 10 X	3	1 X
dNTPs	0.4	200 µM
Oligo (RHVI 1 A-B, VHII 1 A-B)*	0.4	22 pmoles
Oligo (RHVII 2 A-B, RHHV 2 A-B)*	0.45	22 pmoles
BSA 2 %	1	0.06 %
Agua estéril libre de nucleasas	18.85	
DNA	5	
Taq polimerasa	0.9	3 U

\*Donde RHVI 1 A-B, VHII 1 A-B, RHHV 2, A-B, RHHV 2 A-B corresponden a cada juego de oligonucleótidos para su respectiva reacción de PCR.

Para la amplificación de las regiones hipervariables I y II se utilizaron las siguientes condiciones de termociclado:

5 minutos a 94 °C para activación de la polimerasa y 30 ciclos que comprenden:

	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Desnaturalización	1	94
Alineamiento	1	56
Elongación	1	72

y 7 minutos a 72 °C de elongación final.

Cada corrida de amplificación para los haplotipos A, B, C y D como de las regiones hipervariables I y II estuvieron acompañada de dos controles: un control positivo consistente en un muestra de DNA contemporáneo previamente evaluado, así como un control negativo, siendo este último un blanco en que se sustituye la parte correspondiente de DNA por agua estéril libre y de nucleasas. En la tabla 3. se indican los oligonucleótidos empleados, señalando el fragmento a amplificar del haplogrupo o región hipervariable dada así como su ubicación en el genoma mitocondrial y respectiva secuencia, cabe mencionar que en todos las amplificaciones se utilizó termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

#### **5.5.11. Análisis de los productos de PCR**

El análisis de los productos de PCR se realizará obligadamente por dos razones, la primera obedece a que frecuentemente la cantidad de DNA extraído es tan poco que no puede ser visto de manera perceptible durante el corrimiento electroforético post extracción, es por ello que no es sino hasta su amplificación que la condición del DNA puede ser evaluado; y en segundo lugar, por que pese se observe suficiente cantidad de DNA, este puede no amplificarse según cantidad y tipo de contaminantes presentes en la muestra. Sea cual fuese el caso, este segundo análisis permitirá establecer la directriz sobre la purificación o reamplificación requerida.

El corrimiento electroforético del DNA se hará en geles de agarosa al 2 % en solución amortiguadora de electroforésis TAE con 5 µl de bromuro de etidio por 100 ml de gel de agarosa con un volumen de carga de 7 µl de DNA extraído más 1 µl azul de bromofenol, y aplicación de carga eléctrica de 100 voltios durante 1 hora. La visualización se realizará en un transiluminador con irradiación U.V. Cada corrimiento estará acompañado por un marcador de peso molecular de 100 pb, así como de sus controles correspondientes.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación de fragmentos para el reconocimiento de los haplogrupos amerindios y oligonucleótidos empleados para la amplificación de segmentos de las regiones hipervariables I y II.

**haplogrupos amerindios**

Haplogrupo	Ubicación	Oligonucleótidos
		Secuencia (5' → 3')
A	L633 H712	TGAAAATGTTTAGACGGGCTCACA TAGAGGGTGAACACTCACTGG
B	L8215 H8297	ACAGTTTCATGCCCATCGTC ATGCTAAGTTAGCTTTACAG
C	L13227 H13435	CGCCCTTACACAAAATGAC GGGAGGTTGAAGTGAGAGG
D	L5120 H5230	TAACTACTACCGCATTCCTA TGTGGGAATTAAGGTAGGTGG G

**Regiones hipervariables I y II**

Designación	Ubicación	Oligonucleótidos
		Secuencia (5' → 3')
RHVI-A	L-15997 H-16236	CACCATTAGCACCCAAAGCT CTTTGGAGTTGCAGTTGATG
RHVI-B	L-16159 H-16391	TACTTGACCACCTGTAGTAC GAGGATGGTGGTCAAGGGAC
RHVII-A	L-048 H-285	CTCACGGGAGCTCTCCATGC GGGGTTTGGTGGAAATTTTTTTTG
RHVII-B	L-172 H-408	ATTATTTATCGCACCTACGT CTGTTATTTGTGCATACCGCC

### **5.5.12. Análisis de polimorfismo de longitud por fragmentos de restricción (RFLPs)**

La digestión por enzimas de restricción es un método sencillo que permite caracterizar mutaciones puntuales de interés poblacional. Este método también denominado análisis de polimorfismo de longitud por fragmentos de restricción o RFLPs permite entonces advertir los polimorfismos presentes en una región de DNA sin necesidad de secuenciar el fragmento de interés. Su metodología es la siguiente:

Cada fragmento amplificado es sometido a restricción con la enzima correspondiente, utilizando de 5 a 10  $\mu$ l de muestra amplificada según la concentración del producto, y que habrá sido determinada mediante electroforésis en gel de agarosa. La mezcla de reacción se prepara en un tubo estéril de 0.5 ml añadiendo: 5 a 10  $\mu$ l de muestra amplificada, 1.5  $\mu$ l de solución amortiguadora, 1  $\mu$ l de enzima y agua estéril libre de nucleasas hasta un volumen de 15  $\mu$ l. La incubación se lleva a cabo en un baño maría termostático sobre una placa de calentamiento durante 1 a 3 horas a 37 °C. Para su análisis se procede a un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 4 % en solución amortiguadora TAE con 5  $\mu$ l de bromuro de etidio por 100 ml de gel de agarosa con un volumen de carga de 10  $\mu$ l de DNA extraído más 1  $\mu$ l azul bromofenol, y aplicación de carga eléctrica de 100 voltios durante 1 hora. Cada corrimiento estará acompañado por un marcador de peso molecular de 100 pb como referencia para los fragmentos generados.

La tabla 4. y figura 12. señalan el haplogrupo, su posición, cambio de bases, la enzima con que se determina el haplogrupo (secuencia que reconoce y sitio de corte) así como la región amplificada que se espera y los fragmentos por restricción que sus respectivas enzimas generan con lo cual se determina el polimorfismo.

### **5.5.13. Limpieza de fragmentos**

Para la obtención de las secuencias de las regiones hipervariables se procedió a limpiar los fragmentos amplificados en sus dos segmentos por cada región hipervariable así como el amplificado de cada región completa a través de post-electroforésis en geles de agarosa al 1 % mediante el kit comercial GENCLEAN III (Q-biogene, siguiendo las indicaciones de su protocolo)

**Tabla 4.** Polimorfismo de los fragmentos de restricción para la designación de haplogrupos para amplificados por PCR.

**Polimorfismo por Fragmentos de Restricción**

Haplogrupo	Posición	Cambio	Enzima, secuencia que reconoce y sitio de corte [ I ]	Región amplificada	Polimorfismo
A	663	A por G	Hae III [GG I CC]	122 pb	54 y 68 pb
B	8271 a 8281	Pérdida de 9 pb		122 pb (sin pérdida)	113 pb
C	13259	A por G	Hinc II [GT(T/C) I (A/G)AC]	246 pb	70 y 176 pb
D	5176	C por A	Alu I [AG I CT]	150 pb	Sin polimorfismo: 96 y 54 pb

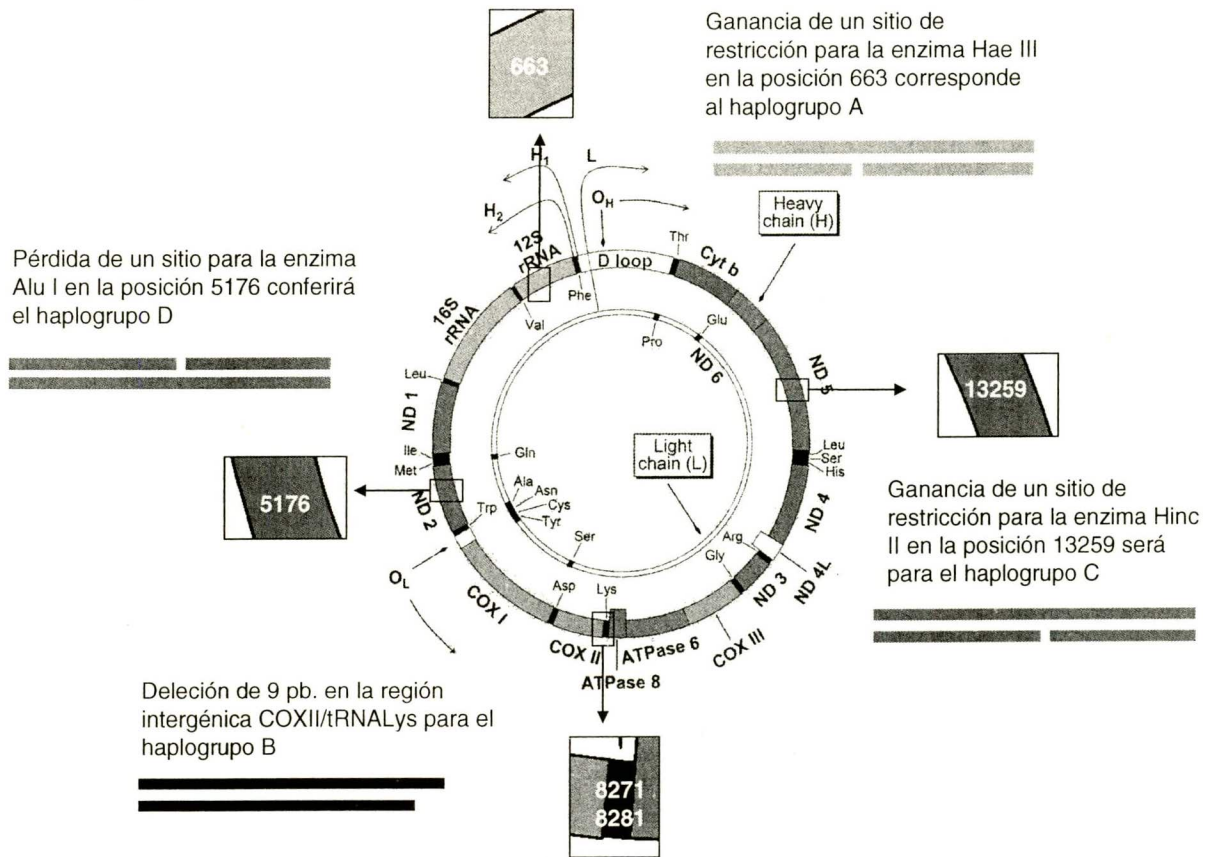
**5.5.14. Marcaje de terminadores fluorescentes**

Los fragmentos limpios fueron entonces marcados por el método de terminadores fluorescentes empleando el kit comercial BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems aplicando las indicaciones de su protocolo) en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), finalmente los fragmentos marcados fueron purificados con isopropanol.

**5.5.15. Secuenciación.**

La secuenciación fue llevada a cabo en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, mediante un secuenciador de electroforésis capilar ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Cada fragmento fue secuenciado por duplicado, así mismo se secuenció tanto la región sentido como antisentido por cada fragmento amplificado de los cuales se corrobora la secuencia obtenida.

**Figura 12.** Localización de los polimorfismos que determinan los cuatro haplogrupos amerindios



### 5.5.16. Análisis filogenético

El análisis filogenético estuvo confinado a estimar la diversidad genética y consecuente comparación intrapoblacional e interpoblacional a través de los programas de análisis filogenéticos BioEdit versión 7.0.5.3, (Hall, T.A. 1999), Clustal W a través del portal del European Bioinformatics Institute (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y MEGA versión 3.1. (Kumar S. et al, 2004).

### 5.5.17. Haplogrupos

Para la comparación interpoblacional se utilizó la frecuencia de los haplogrupos de cada población, siendo los haplogrupos considerados alelos de un mismo locus, bajo el supuesto de que no existe recombinación significativa en el modo hereditario del mtDNA y que los sitios que definen los haplogrupos son

suficientemente estables, es decir, que presentan una tasa de mutación relativamente baja. La frecuencia se calculó dividiendo el número de individuos de cada haplogrupo entre el número total de individuos analizados.

#### **5.5.18. Análisis de secuencias de las regiones hipervariables I y II**

Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante Clustal W a través de BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, T.A. 1999) empleando la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (rCRS: HUMMTCG J01415.2 gi:113200490, con última actualización del 08/25/2006, <http://www.mitomap.org/mitoseq.html>), en cada caso las secuencias fueron corroboradas manualmente. Las secuencias resultantes de cada región hipervariable fueron retadas en el GenBank mediante BLAST por búsqueda de nucleótido-nucleótido (blastn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Las secuencias encontradas fueron alineadas mediante Clustal W a través del portal del European Bioinformatics Institute (Chenna et al. 2003. EBI, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), los alineamientos resultantes fueron entonces empleados para el análisis filogenético mediante el software MEGA versión 3.1. (Kumar S. et al, 2004). La ubicación geográfica reportada en GenBank para cada secuencia fue empleada para la construcción de un mapa en que se dilucido de forma hipotética la ruta de los asentamientos.

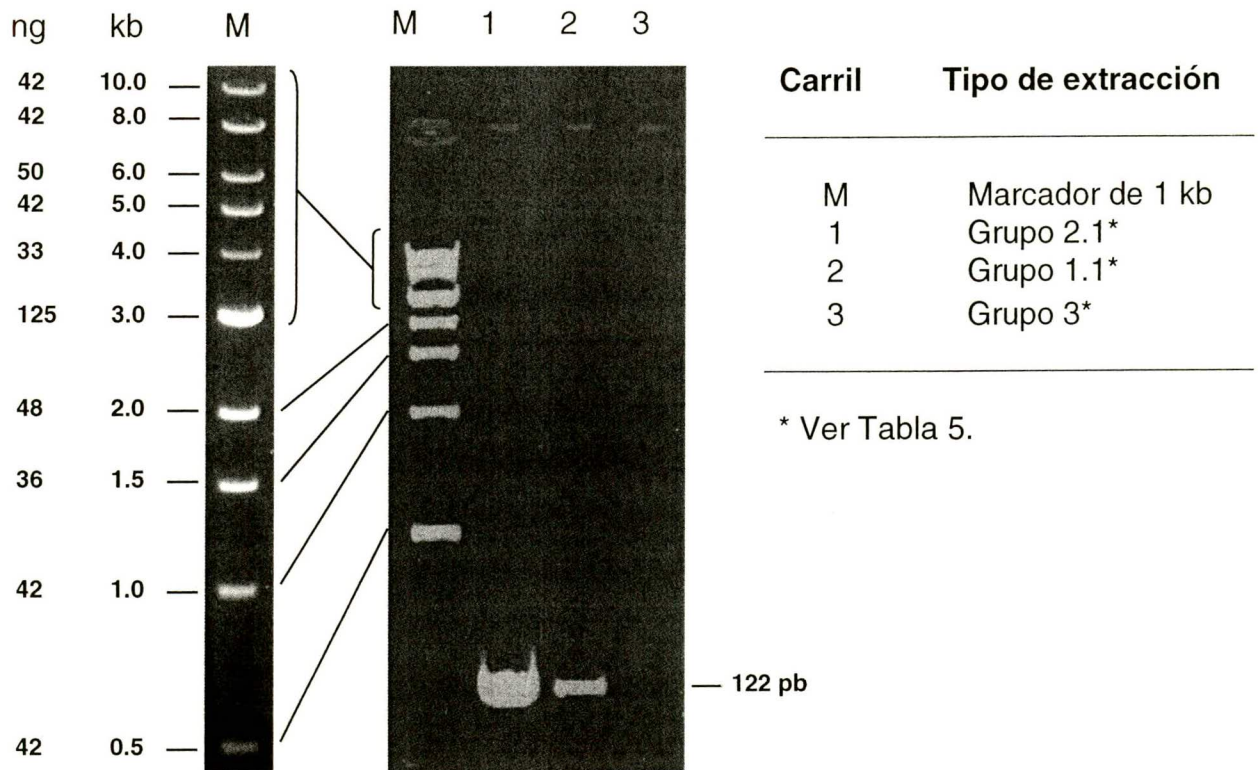
## VI. RESULTADOS.

### 6.1. Aproximaciones de estandarización para el método de extracción con DNA antiguo.

Se ha señalado en materiales y métodos que no existe un protocolo estándar en la extracción de DNA antiguo, debido a ello fue necesaria la evaluación de diferentes técnicas que permitieran establecer un patrón de referencias, consistentes en variación de la técnica descrita como fenol/cloroformo. Para ello se empleó material óseo de un mismo individuo de temporalidad colonial. Para todos los ensayos se utilizó material de la misma muestra, consistente en hueso esponjoso de epífisis de fémur empleando 1g de hueso pulverizado por extracción. Las muestras fueron evaluadas por grupos y subgrupos. Debido a que la cantidad de DNA extraído no fue suficiente para ser visualizado directamente en geles de agarosa se empleó como referencia de rendimiento la cantidad de DNA amplificado mediante PCR correspondiente al haplogrupo A. El criterio de selección se basa en que los fragmentos amplificados del haplogrupo A al igual que el B respecto de los haplogrupos C y D como de los fragmentos de la región hipervariable tanto I como II o sus subfragmentos, permiten generar amplicones de menor tamaño, tan sólo 122 pb, lo cual implica que aún cuando el DNA estuviese degradado (fragmentos no menores a 150 pb) podrían ser amplificados y consecuentemente evaluados.

La asignación de rendimiento basada en amplificados designados como pobres (+), regulares (++) , abundantes (+++) o sin amplificar (-), se hizo por correlación indirecta de la cantidad de DNA contenido en la banda de 500 pb de un marcador de peso molecular de 1 kb con equivalencia de 42 ng/ $\mu$ l (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L del marcador de 1 kb, New England Biolabs, Inc. Ver fig. 13, y tab. 5). En la figura 13. se señala mediante dos imágenes, una de ellas el marcador de peso molecular y gel resuelto, parte del procedimiento mediante el cual, se estableció la designación de los amplificados como procedimiento correlativo a la cantidad de DNA obtenido y cuantificado indirectamente.

**Figura 13.** Electroforésis en geles de agarosa al 1 % para el análisis de amplificados por PCR del fragmento que revela el haplogrupo A, en que se observa el rendimiento de DNA en forma indirecta por correlación de la cantidad de DNA del marcador de peso molecular.



La cantidad de marcador de peso molecular cargado por poso fue de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , mientras que el DNA amplificado que se cargó también por poso fue de 5  $\mu\text{l}$ . En la figura 13. se aprecia el amplificado del fragmento que revelará el haplogrupo del DNA extraído de los grupos 2.1 y 1.1 (carriles 1 y 2 respectivamente). En el caso del grupo 2.1 la cantidad observada es aproximadamente 3 veces mayor respecto la banda de 0.5 kb del marcador de peso molecular, es decir, una cantidad de “abundante” que le enmarca con la mayor asignación de rendimiento (+++), siguiendo este criterio se tiene para la muestra del grupo 1.1 una cantidad de “regular” con asignación de rendimiento medio (++), mientras que para muestra del grupo 3. asignación de rendimiento nulo (-), El patrón de de rendimiento y su asignación como método arbitrario se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Referencia sobre asignación rendimiento mediante cantidad de DNA amplificado vista por electroforésis como método indirecto.

Rendimiento	Cantidad aproximada de DNA amplificado
+++	Abundante
++	Regular
+	Pobre
-	No observado

La determinación indirecta de la cantidad de DNA antiguo extraído es un método gran utilidad cuando se tiene presente en la muestra trazas de contaminantes y/o DNA contaminante no humano. Otros métodos de cuantificación tradicionales tales como espectrofotometría pueden dan lugar a falsos positivos o lecturas erróneas en la cantidad estimada para el DNA extraído. Es así que el método indirecto de cuantificación funge como un sistema de aproximación más certero al proporcionar información no sobre el DNA total sino sobre la cantidad de DNA amplificable. Debe tenerse presente que la cantidad de DNA estimada por este método sólo proporciona un acercamiento mismo que puede variar según la cantidad de cantidad y tipo de contaminantes inhibidores de PCR, donde su eliminación depende directamente del tipo o método de extracción empleado, por tanto, siendo útil como método para evaluar un procedimiento de extracción estándar de partida, bajo consideración que el sistema de partida o método inicial preferencial no será excluyente de otros métodos alternativos, cada vez que una muestra puede variar significativamente entre un sitio de hallazgo y otro, individuos de un mismo sitio e incluso muestras de un mismo individuo pero recabadas de diferentes partes. En la tabla 6. se señala el rendimiento en la extracción de tres sistemas y sus variantes, métodos confinados a establecer aquel con mayor posibilidad o éxito para la extracción.

Del Análisis comparativo de Rendimiento por método indirecto entre los diferentes sistemas de extracción de DNA antiguo de restos óseos se estableció como método de extracción inicial el sistema fenol/cloroformo con tratamiento previo de EDTA sobre la mayoría de las muestras. Sin embargo, y dado que cada muestra representa condiciones únicas se tomó un grupo de muestras para su extracción por

fenol/cloroformo sin tratamiento previo de EDTA. Las muestras y tipo de extracción realizadas en el presente proyecto se precisan en la siguiente tabla 7 y 8, correspondientes a muestras de resto óseos y muestras momificadas, en cada caso, indicando el tipo de extracción de DNA, cantidad y promedio de muestra extraída.

**Tabla 6.** Análisis comparativo de Rendimiento por método indirecto entre los diferentes sistemas de extracción a través de amplificadores por PCR para el fragmento que revela haplogrupo A.

---

Grupo 1. Extracción por fenol/cloroformo sin tratamiento previo de EDTA

	Rendimiento*
Grupo 1.1. precipitación con etanol	++
Grupo 1.2. precipitación con etanol	++

---

Grupo 2. Extracción por fenol/cloroformo con tratamiento previo de EDTA

	Rendimiento*
Grupo 2.1. precipitación con etanol	+++
Grupo 2.2. precipitación con isopropanol	+++

---

Grupo 3. Sílica gel mediante Isotiocinato de guanidina

	Rendimiento*
Grupo 3. Sílica gel mediante Isotiocinato de guanidina	-

---

\***Rendimiento:** +, Amplificados pobres; ++, Amplificados regulares; +++, Amplificados abundantes; -, sin amplificados

Para el caso de muestras procedentes de momias en que existe posibilidad de hallar trazas de colágena y queratina el sistema de extracción fenol/cloroformo fue sujeto a una variante, consistente en la modificación de la solución amortiguadora de extracción por adición de 15 µl DTT 1.0 M por cada 0.5 ml de solución amortiguadora de extracción. Las muestras procesadas se indican en la tabla 8.

**Tabla 7.** Datos generales de muestras de restos óseos procesadas en que se incluye tipo de extracción de DNA, cantidad y promedio de muestra extraída.

<b>Extracción por fenol/cloroformo con tratamiento previo de EDTA</b>			
Palenque Grupo Templo de la Cruz (PGTC)			
Muestra	Designación	Tipo funerario / Individuo	Cantidad de Muestra (g)
(8)	PGTC-1	Tumba 7-B Individuo 2	0.55
(9)	PGTC-2	Tumba No. 10	0.87
(10)	PGTC-3	Tumba 7-B Individuo 1	0.75
(11)	PGTC-4	Tumba 7-C	1.33
(12)	PGTC-5	Tumba No. 7-B	0.73
(15)	PGTC-8	Entierro No. 7 Individuo A	0.63
(16)	PGTC-9	Tumba No. 7	0.97
(17)	PGTC-10	Tumba No. 6 Individuo A	0.97
Promedio de muestra extraída			0.85
Palenque Grupo Templo XV (PGTXV)			
Muestra	Designación	Tipo funerario / Individuo	Cantidad de Muestra (g)
(19)	PGTXV-1	Entierro No. 3	0.31
(21)	PGTXV-3	Tumba No. 5	0.70
(22)	PGTXV-4	Tumba No. 6	0.64
(23)	PGTXV-5	Entierro No. 1	0.50
(24)	PGTXV-6	Entierro No. 6	0.65
(25)	PGTXV-7	Entierro No. 6 Individuo C	0.70
Promedio de muestra extraída			0.58
<b>Extracción por fenol/cloroformo sin tratamiento previo de EDTA</b>			
Bonampak Grupo Frey (BGF)			
Muestra	Designación	Tipo funerario / Individuo	Cantidad de Muestra (g)
(42)	BGF-1	Entierro No.1	0.42
(43)	BGF-2	Entierro No.2	0.60
(44)	BGF-3	Entierro No.3	0.77
(45)	BGF-4	Entierro No.4	0.37
Promedio de muestra extraída			0.54
Promedio total de muestra extraída en restos óseos			0.69

**Tabla 8.** Datos generales de muestras de restos momificados procesadas en que se incluye la cantidad y tipo de extracción de DNA.

No de Muestra	Designación	Individuo	Tipo de Muestra	Cantidad de Muestra (g) o No. de piezas
(1)	M-1	Tarahumara/ la ventana/col. I/momia No.II	Cabello	5 pelos ~ 4 cm
(2)	M-2	México/Ent.8/Est.4/Col. I/No.5	Piel	0.04
(3)	M-3	Momia/F-9	Piel	0.03
(4)	M-4	Tarahumara/ la ventana/momia No.V	Piel	0.02
(5)	M-5	Momia/No.5/Infantil	Piel	0.01
(6)	M-6	Momia/F-12	Piel	0.04
(7)	M-7	Tarahumara/ la ventana/momia No.IV/inf	Cabello	5 pelos ~ 4 cm
S/N*	<i>Pepita</i>	México/Querétaro	Músculo	0.07
Promedio total de muestra de tejido extraída en restos momificados				0.035
Promedio total de muestra pelo extraída en restos momificados				~ 20 cm de pelo

## 6.2. Porcentajes de éxito en la extracción de DNA antiguo.

El porcentaje de éxito en la extracción de DNA antiguo fue determinado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de éxito} = (\text{No. muestras con extracción exitosa} / \text{No. total de muestras})(100) \dots \text{ec 1.}$$

Sustituyendo los valores observados en la ec 1. El éxito total de extracción de DNA antiguo se tiene en las siguientes tablas:

**Tabla 9.** % de éxito por grupo.

Muestra		% de éxito	Promedio total de muestra extraída en g.
(PGTC)	= (8/8)(100)	= 100.0 %	0.85
(PGTXV)	= (0/6)(100)	= 0.0 %	0.58
(BGF)	= (4/4)(100)	= 100.0 %	0.69
restos momificados	= (5/8)(100)	= 62.5 %	0.035

**Tabla 10.** % de éxito por tipo de tejido.

Muestra		% de éxito	Promedio total de muestra extraída en g.
restos óseos	= (12/18)(100)	= 66.6 %	0.69
tejido de restos momificados	= (4/6)(100)	= 66.6 %	0.035
pelo de restos momificados	= (1/2)(100)	= 50.0 %	~ 20 cm de pelo

**Tabla 11.** % de éxito por rango de muestra ( $>0.7 \text{ g} \leq$ ) en restos óseos.

Muestra		% de éxito	Promedio total de muestra extraída en g.
muestras $> 0.7 \text{ g}$	= (7/7)(100)	= 100.0 %	0.91
muestras $\leq 0.7 \text{ g}$	= (5/11)(100)	= 45.4 %	0.55

**Tabla 12.** % de éxito por método de extracción en restos óseos.

Muestra	% de éxito	Promedio total de muestra extraída en g.
Fenol/cloroformo con tratamiento previo de EDTA	$= (8/14)(100) = 57.1 \%$	0.74
Fenol/cloroformo sin tratamiento previo de EDTA	$= (4/4)(100) = 100.0 \%$	0.54

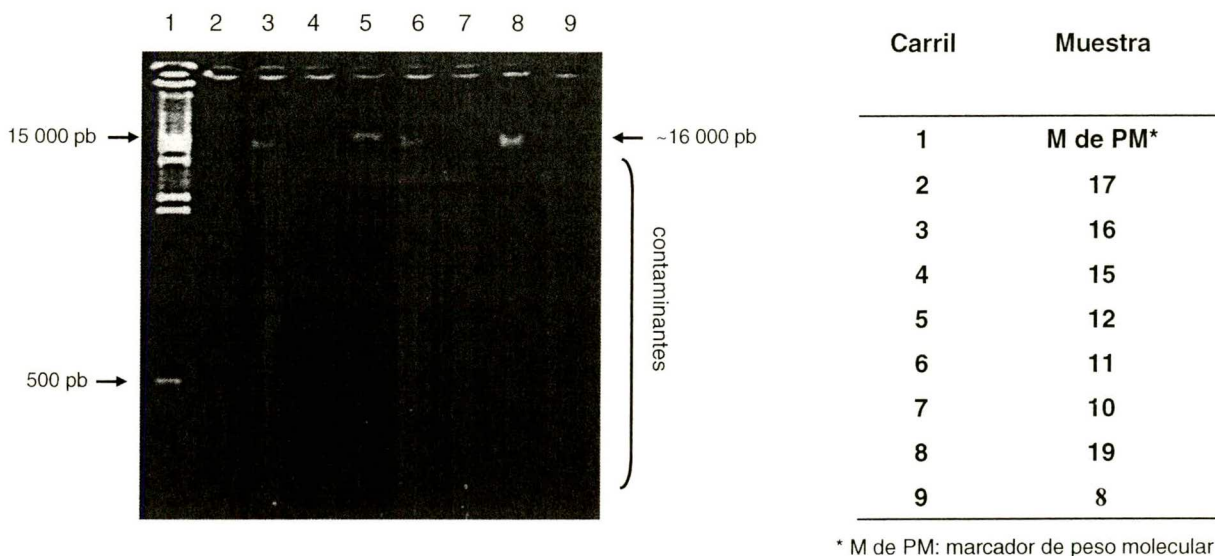
**Tabla 13.** % de éxito total de DNA extraído.

Muestra	% de éxito	Promedio total de muestra extraída en g.
% de éxito total	$= (17/26)(100) = 65.3 \%$	0.53

### 6.3. Análisis de calidad.

El análisis de calidad del DNA extraído es un proceso necesario que permite la planeación sobre los métodos y sistemas que habrán de llevarse a cabo para incrementar el éxito en el análisis general del DNA. El análisis de calidad es un indicador sobre el estado físico en que se encuentra el DNA, básicamente comprende dos parámetros; cantidad y tamaño de los fragmentos de DNA contenidos en la muestra. La cantidad se manifiesta por la intensidad de fluorescencia que la muestra presenta cuando esta es revelada con bromuro de etidio (u otro agente de revelador) respecto un control, el cual puede ser el marcador de peso molecular con que se corre la muestra, el tamaño por su parte se manifiesta por el peso molecular con que cuenta la mayoría de los fragmentos de DNA que se hallan en la muestra. Otro elemento de importancia que puede ser advertido en el análisis de calidad del DNA es la presencia de contaminantes, muchos de ellos moléculas de bajo peso molecular y fluorescencia característica.

**Figura 14.** Análisis de calidad de DNA antiguo para muestras de Palenque mediante electroforésis en geles de agarosa al 1% (método de Extracción Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico en variante de quelación con EDTA).



En la figura 14. se observan los elementos básicos a considerar cuando se trabaja con DNA antiguo. Los carriles 3, 5, 6 y 8 representan muestras con cantidad suficiente de DNA para ser observadas en primera instancia mediante electroforésis, también puede observarse que la cantidad de DNA en cada muestra es variable, ejemplo significativo son las muestras de los carriles 3 y 8, este ultimo con una mayor cantidad de DNA. El tamaño de los fragmentos de DNA es otro factor que puede ser apreciado, véanse por ejemplo las muestras de los carriles 5 y 6, siendo la muestra del carril 6 aquella con fragmentos de DNA de menor peso molecular. La contaminación es otro elemento que puede ser advertido, su presencia depende múltiples factores, por tanto siendo variable de una muestra a otra, nótese que en la muestra del carril 5 no hay presencia aparente de contaminación, no así en los carriles 3, 6 y 8.

#### 6.4. Inhibidores.

La presencia de inhibidores de PCR en DNA antiguo se manifestó de manera constante, aunque no en todos los casos. En algunas muestras los inhibidores fueron advertidos de manera directa durante el análisis de calidad por electroforésis para el

DNA extraído, mientras que en otros casos hasta llevarse a cabo la PCR misma. Para asegurar que la inhibición era producto de los contaminantes coprecipitados durante la extracción y no debido a otros fenómenos tal como un error humano durante la ejecución de PCR se optó por realizar pruebas de inhibición mediante dilución y coamplificación con DNA moderno, a fin de poder deliberar cuales serían los métodos más adecuados para su reducción y/o eliminación.

### **6.5. Diluciones de DNA antiguo.**

La dilución del DNA y consecuentemente de los contaminantes que se encuentran contenidos en la muestra representa un método sencillo que permite en algunos casos amplificaciones exitosas. La figura 15. representa uno de los ensayos de dilución con resultados favorables.

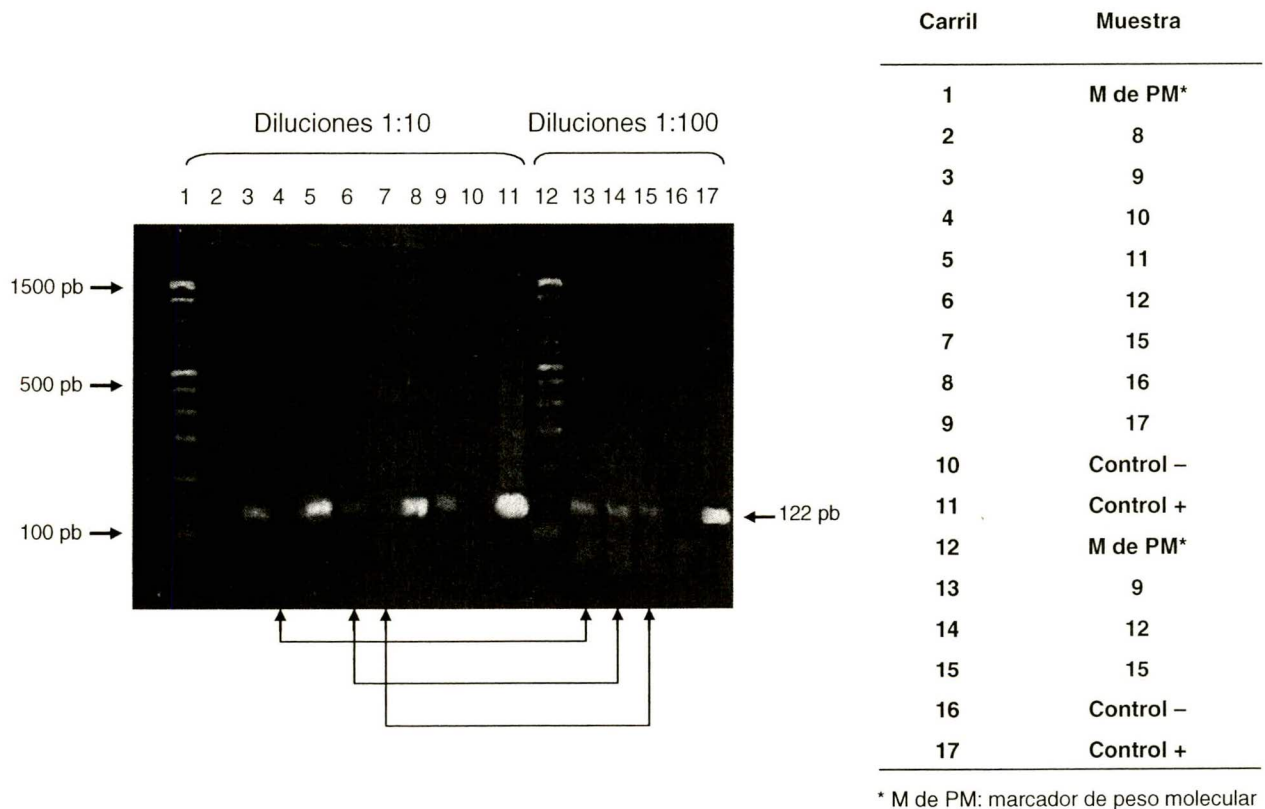
Según se indica en la figura 15. las muestras contenidas en los carriles 2 a 10 representan muestras que no pudieron ser amplificadas cuando estas se hallaban sin dilución, pero que diluidas pueden amplificar, en algunos casos los contaminantes se hallaron en concentraciones tales que las muestras debieron ser diluidas nuevamente para poder ser amplificadas, tal como se indica en los carriles 13 a 16. La variación en los amplificados por efecto de la dilución puede ser vista en las muestras correspondientes a los carriles 4 y 13, 6 y 14, como en los carriles 7 y 15, muestras sometidas a diluciones 1:10 y 1:100 previa amplificación, su resultado se señala con líneas flechadas (parte inferior de la fig.15) que ligan la misma muestra.

### **6.6. Evaluación sobre el efecto de inhibidores en presencia de DNA moderno.**

Los inhibidores de PCR forman tan sólo una parte del total de los contaminantes que una muestra lleva consigo, aunque la mayoría de ellos son eliminados durante la extracción y purificación del DNA, se puede observar experimentalmente que estos copurifican junto al DNA extraído. Los inhibidores comprenden diversos agentes, algunos de ellos con capacidad de inhibición pese a estar en pequeñas cantidades, es por ello que aún cuando se han llevado las prácticas pertinentes de limpieza sobre los contaminantes y en consecuencia inhibidores que pudiera contener la muestra, debe evaluarse su efecto sobre DNA susceptible a una amplificación positiva, siendo DNA de individuos contemporáneo el más adecuado para este tipo de prácticas. La figura 16

representa un ejemplo significativo cuando se tienen muestras en presencia de inhibidores de PCR.

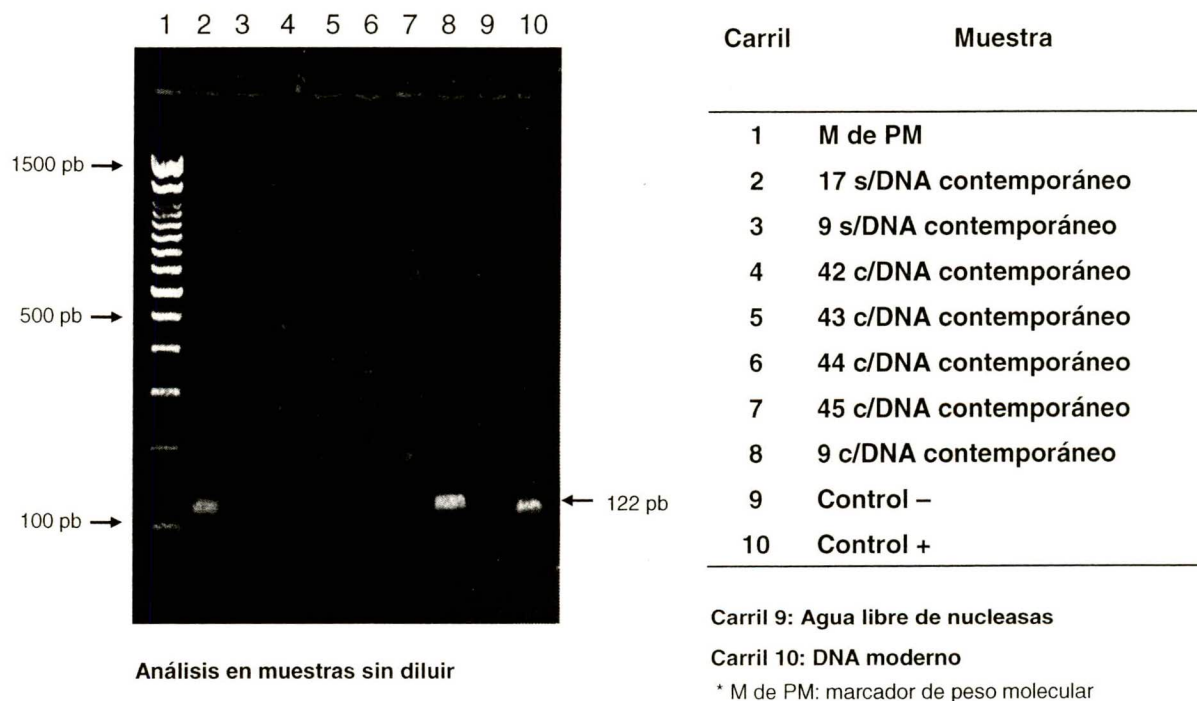
**Figura 15.** Electroforésis en geles de agarosa al 2 % para el análisis de amplificadas por PCR de haplogrupo A de muestras de Palenque para la determinación de un posible efecto Inhibidor (método de Extracción Fenol/cloroforno/alcohol-isoamílico en variante de quelación con EDTA)



En la figura 16. se pueden observar cual es el comportamiento que una muestra problema presenta cuando esta se halla en condiciones adecuadas para su amplificación (carril 17, muestras sin DNA contemporáneo), contrariamente se presenta una muestra problema sin cantidad suficiente de DNA para amplificarse exitosamente (carril 3, muestra sin DNA contemporáneo), siendo en este último de los casos un problema exclusivo por falta de DNA y no como resultado de un falso negativo por efecto de inhibidores, situación que se comprueba al amplificar la muestra con DNA contemporáneo (carril 8 con DNA contemporáneo). La inhibición en PCR como

resultado de los contaminantes queda corroborada, pues además de la inhibición del DNA propio de la muestra también se inhibe el DNA contemporáneo adicionado a la muestra (carriles 4-9, muestras con DNA contemporáneo).

**Figura 16.** Electroforésis en geles de agarosa al 2 % para el análisis de amplificadas por PCR del haplogrupo B para muestras de Palenque con DNA contemporáneo para la determinación de un efecto Inhibidor (método de Extracción Fenol/cloroforno/alcohol-isoamílico, muestras 9 y 17 en variante de quelación con EDTA)



### 6.7. Sistemas de purificación basados en sílica gel.

Una vez que se determina la presencia de inhibidores en una muestra es importante considerar cual o cuales serán los métodos más adecuados para su purificación. Entre los métodos que ofrecen mejores resultados se encuentran los sistemas basados en sílica gel, siendo los sistemas comerciales la mejor opción. En el presente proyecto se evaluaron los sistemas comerciales GenClean II (Q-biogene) bajo presentación de resina y QIAquick (QIAGEN) en presentación de columna, en ambos casos para su aplicación como métodos limpieza directo y postelectroforésis.

# BIBLIOTECA UACM

En un ensayo comparativo para determinar si alguno de los sistemas era más efectiva cuando se aplicaba directamente al DNA recién extraído o luego de haber sido corrido por electroforésis en geles de agarosa para determinar su calidad, se observó que en las muestras de las que se había advertido efecto de inhibición, estas amplificaban pobremente cuando la purificación se había realizado directamente, mientras que cuando la purificación se efectuaba sobre geles de agarosa en las mismas muestras pero en ensayos independientes, podían observarse mejores amplificados, lo que sugiere que ciertos inhibidores habrían sido copurificados cuando los sistemas eran aplicados directamente, pero no así cuando la limpieza se realizaba en el DNA contenido en la agarosa luego de la aplicación electroforética. Por lo tanto, queda establecido que para una mejor purificación, es mejor realizarla posteriormente a la corrida electroforética, y no directamente en el DNA recién extraído.

Cabe destacar que no se advirtieron diferencias entre cada uno estos sistemas, por lo que se considera que ambos métodos, GenClean II (Q-biogene) y QIAquick (QIAGEN) son una alternativa viable en la purificación. Siendo su aplicación un método necesario para el análisis de DNA antiguo al permitir o mejorar la amplificación del mismo.

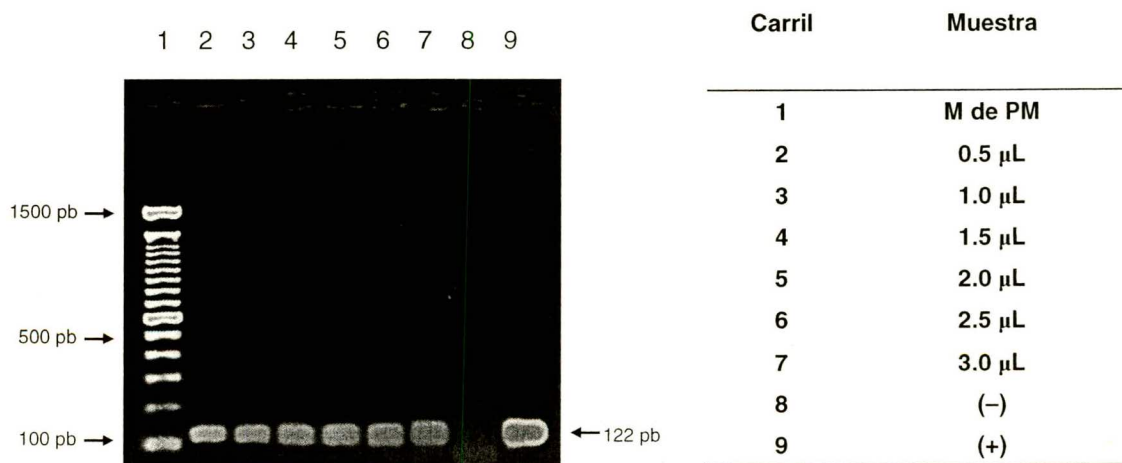
## **6.8. Adición de Albúmina de Suero Bovino (BSA)**

La aplicación de BSA en muestras con inhibidores de PCR es una práctica que mejora sustancialmente la obtención de amplificados. La cantidad de BSA que debe aplicarse puede variar dependiendo del tipo de muestra. Se ha establecido como un patrón general la adición de 1  $\mu$ l de BSA (0.1 mg/ml) por mezcla reacción cuanto esta es de 25 o 30  $\mu$ l, sin embargo, la cantidad de BSA debe ser precisada experimentalmente. Aunque se sugiere que la estandarización sea por cada muestra, suele no ser posible cuando la cantidad de DNA extraído es poca y en consecuencia confinada a un pequeño volumen ya que el gasto de muestra suele comprometer futuros ensayos, situación advertida en casi todas las muestras procesadas las cuales en ninguno de los casos supero los 500  $\mu$ L de volumen total sobre el cual el DNA extraído fue diluido. Para resolver este problema se procedió a evaluar las muestras con problemas de inhibición o de amplificados pobres mediante la adición de DNA

contemporáneo. Como resultado de estos ensayos se observó que dichas muestras podían dar mejores amplificadas cuando la cantidad de BSA (en concentración de 0.1 mg/ml) se incrementaba hasta en 3  $\mu$ l por mezcla de reacción. Se observó que cantidades mayores de BSA no mejoraron la amplificación, además de que generan precipitados que reducen el volumen de producto de PCR, estableciendo que las cantidades de BSA por mezcla de reacción (30  $\mu$ l) fueran entre 1 y 3  $\mu$ l, variando esta cantidad según el tipo de muestra, un ejemplo de este tipo de ensayos se muestra en la figura 17. en el cual se busca optimizar la amplificación empleando un juego de oligonucleótidos para la amplificación del haplogrupo B.

En la figura 17. se observa el efecto que tiene el BSA sobre los inhibidores de PCR de una muestra. Puede verse que su aplicación genera mejoras en la obtención de amplificadas. Obsérvese un incremento consecutivo cuando aumenta la cantidad de BSA que es significativo si se compara los carriles inicial y final donde el carril 7 presenta casi el doble de DNA amplificado cuando se compara con la cantidad de DNA amplificado del carril 2.

**Figura 17.** Electroforésis en geles de agarosa al 2 % para el análisis de amplificadas por PCR de haplogrupo B de una muestra de Palenque con DNA contemporáneo para la determinación de un efecto Inhibidor, así como la optimización de amplificadas mediante la adición creciente de BSA (método de Extracción Fenol/cloroforno/alcohol-isoamílico en variante de quelación con EDTA)



\* M de PM: marcador de peso molecular

Carriles 2 a 7: Adición creciente de BSA (0.1 mg/ml) para la muestra 9 con DNA moderno

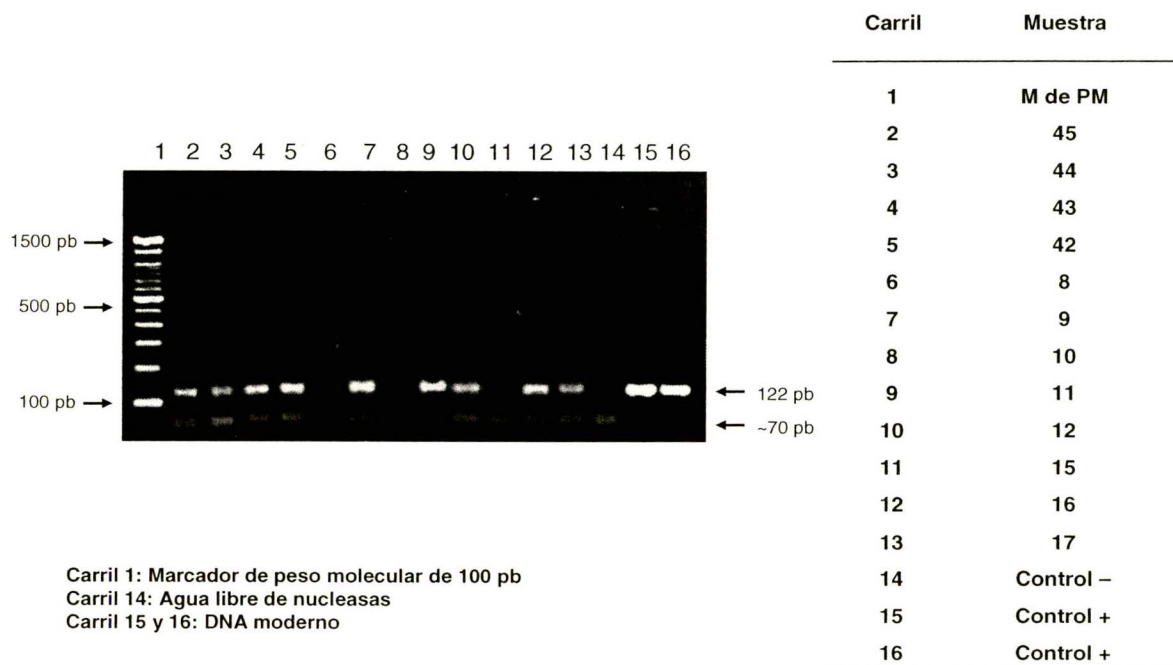
Carril 8: Agua libre de nucleasas

Carril 9: DNA moderno

## 6.9. Determinación de haplogrupos mediante Análisis de polimorfismo de longitud por fragmentos de restricción (RFLPs)

La determinación del haplogrupo correspondiente a una muestra permite que esta pueda ser agrupada dentro de una población caracterizada por la marca molecular o polimorfismo que el haplogrupo presenta. En el caso del mtDNA tales polimorfismos están definidas por la pérdida o ganancia de un sitio de restricción, el cual es excluyente de cualquier otro haplogrupo y consecuentemente incluyente de una población, sin embargo debe contemplarse la posibilidad de que exista o este presente algún otro haplogrupo sobre una misma muestra como un caso excepcional. El oligonucleótido paso en la determinación de un haplogrupo es la amplificación mediante PCR del fragmento que lo contiene, el cual puede ser visto a través de electroforésis en geles de agarosa. Un ejemplo de éxito en que se muestra la amplificación del fragmento en que podría ubicarse el haplogrupo A se advierte en la figura 18.

**Figura 18.** Electroforésis en geles de agarosa al 2 % como análisis previo a la restricción del haplogrupo A de muestras de Bonampak y Palenque (método de Extracción Fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico, muestras 9, 11, 12, 16, 17 en variante de quelación con EDTA)



Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb  
 Carril 14: Agua libre de nucleasas  
 Carril 15 y 16: DNA moderno

\* M de PM: marcador de peso molecular

Los amplificadores que contienen el haplogrupo A están caracterizados por fragmentos de 122 pb. En el DNA antiguo existen múltiples factores que pueden afectar la amplificación, en algunos casos los contaminantes pueden alterar la unión de entre los oligonucleótidos y el DNA, es por ello que suele utilizarse un excedente de oligonucleótidos tal que se pueda favorecer la unión en la cadena molde que representa el DNA antiguo, sin embargo con riesgo de generar la formación de dímeros, heterodímeros e incluso heterotrímeros entre los oligonucleótidos empleados, siendo los heterotrímeros estructuras muy probables de ser generadas según apuntan las bandas de peso molecular ( ~ 70 pb) que se registran en los geles (ver tabla 14).

Una vez que se ha conseguido la amplificación del fragmento que identificará positiva o negativamente el haplogrupo, este es puesto a restricción por su correspondiente enzima. Para el haplogrupo A, la restricción se lleva a cabo con la enzima *Hae III*. En condiciones idóneas la restricción del haplogrupo A genera dos fragmentos de 68 y 54 pb, sin embargo, en DNA antiguo las restricciones son generalmente parciales, lo que da lugar a fragmentos de 122, 68 y 54 pb tal como se aprecia en la figura 19.

#### **6.10. Análisis electroforético de amplificadores de las regiones hipervariables I y II.**

La secuencia que representa la región hipervariable es quizá la más importante en cuanto a estudios de filogenia refiere, además, mediante ella se puede dilucidar a través de su haplotipo, el haplogrupo al que corresponde la muestra en cuestión. Un oligonucleótido paso en la secuenciación de la región hipervariable es la amplificación sus fragmentos, los cuales están caracterizados por dos segmentos de 434 y 402 pb, mismos que se ubican en la región D-loop correspondiente a un fragmento de 1022 pb. En muestras degradadas, donde el DNA se encuentra en tamaños inferiores a 400 pb no cabe posibilidad de obtener amplificadores de fragmentos completos, como alternativa se procede a la amplificaciones de fragmentos menores, así la región hipervariable I o RHVI se subdivide en RHVI-A y RHVI-B de 279 y 272 pb respectivamente, en tanto que la región hipervariable II o RHVII habrá de subdividirse así mismo en RHVII-A y RHVII-B de 280 y 277 pb (véase tabla de oligonucleótidos, tab. 3). En la figura 19. se observan

los amplificados generados para la región hipervariable I en sus dos fragmentos sobre la muestra de la momia denominada *Pepita*, en dicha muestra se evaluaron los métodos de extracción empleados, todos ellos como variantes de la técnica de extracción fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico, siendo el método en que se emplea columnas concentradoras Centricon el adecuado para su análisis.

**Tabla 14.** Dimerizaciones hipotéticas de los oligonucleótidos empleados para el haplogrupo A, en que se señalan sólo aquellos con la mayor delta G de acuerdo al programa OligoAnalyzer Version 3.0\*

---

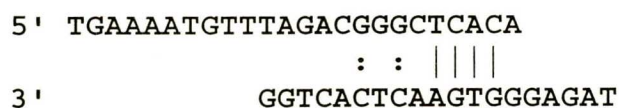
Dímero del oligonucleótido en posición directa (forward). Tamaño 48 pb



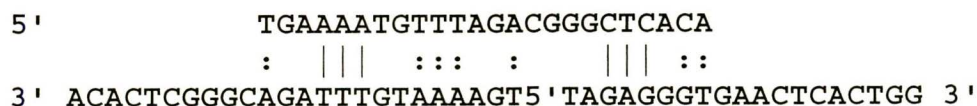
Dímero del oligonucleótido en posición reversa (reverse). Tamaño 38 pb



Heterodímero forward/reverse. Tamaño 43 pb



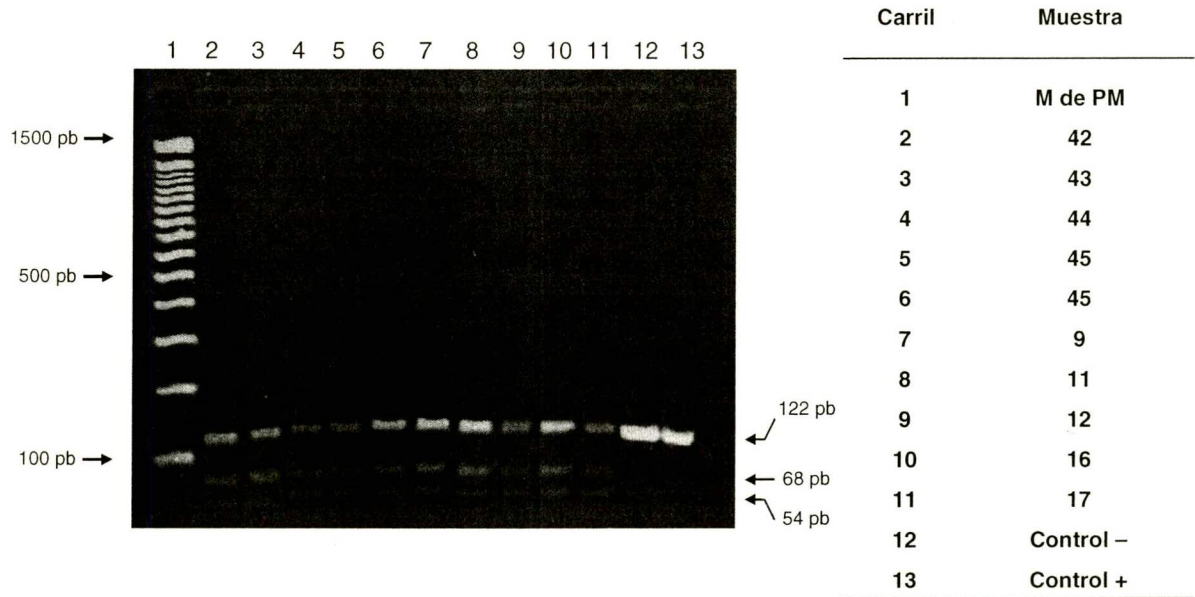
Heterotrímero forward/forward/reverse (complemento). Tamaño 67 pb




---

\* Integrated DNA Technologies SciTools OligoAnalyzer Version 3.0  
(<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>)

**Figura 19.** Electroforésis en geles de agarosa al 2 % para el análisis de restricción del haplogrupo A de muestras de Bonampak y Palenque (método de Extracción Fenol/cloroforno/alcohol-isoamílico, muestras 9, 11, 12, 16, 17 en variante de quelación con EDTA)



\* M de PM: marcador de peso molecular

**Figura 20.** Electroforésis en geles de agarosa para el análisis de amplificados por PCR de la región hipervariable I en sus dos fragmentos de la muestra denominada *Pepita*, ubicados en las posiciones L-15997/H-16236 (RHVI-A) y L-16159/H-16391 (RHVI-B) respecto a la secuencia de DNA mitocondrial humano revisado de la referencia de Cambridge (rCRS).

Fig. 20. A. Región hipervariable I-A

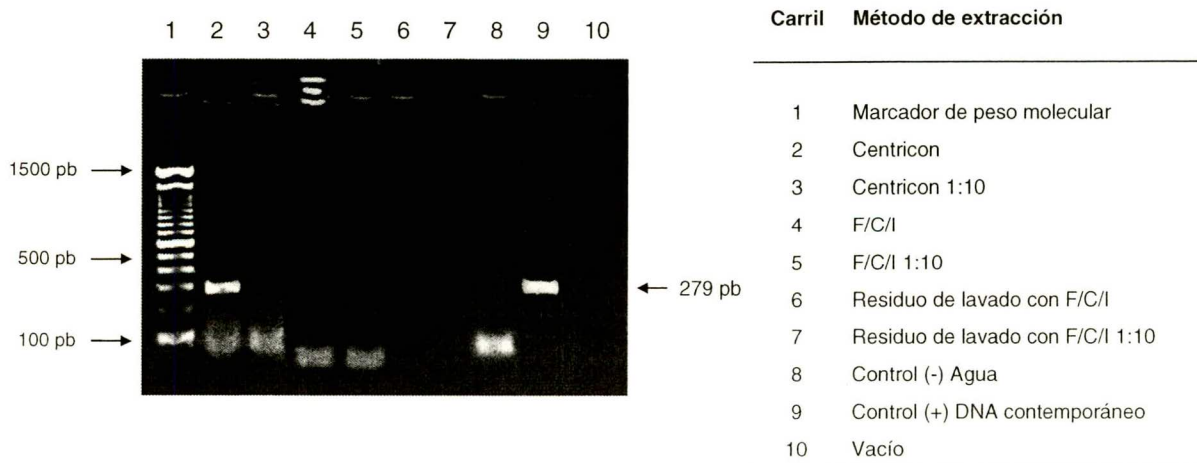
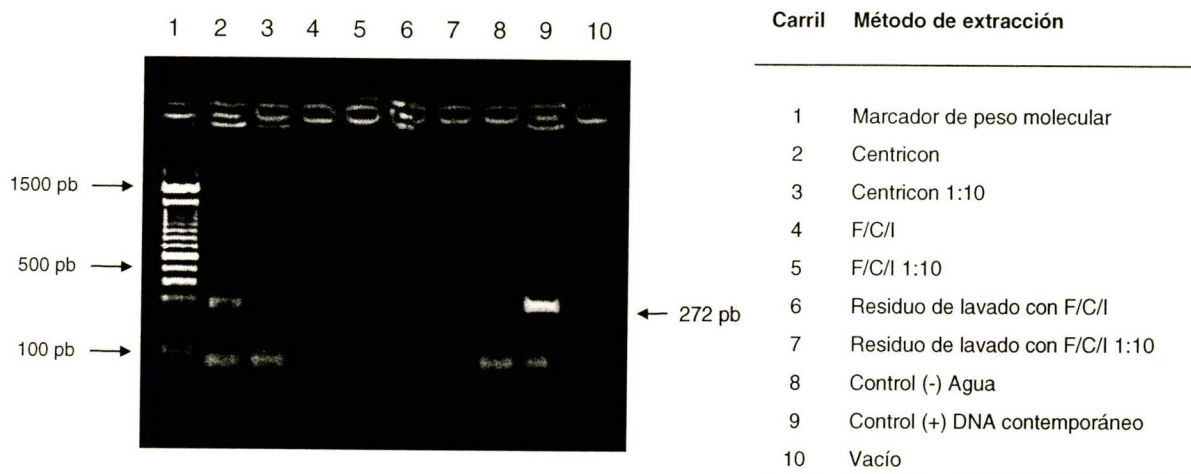
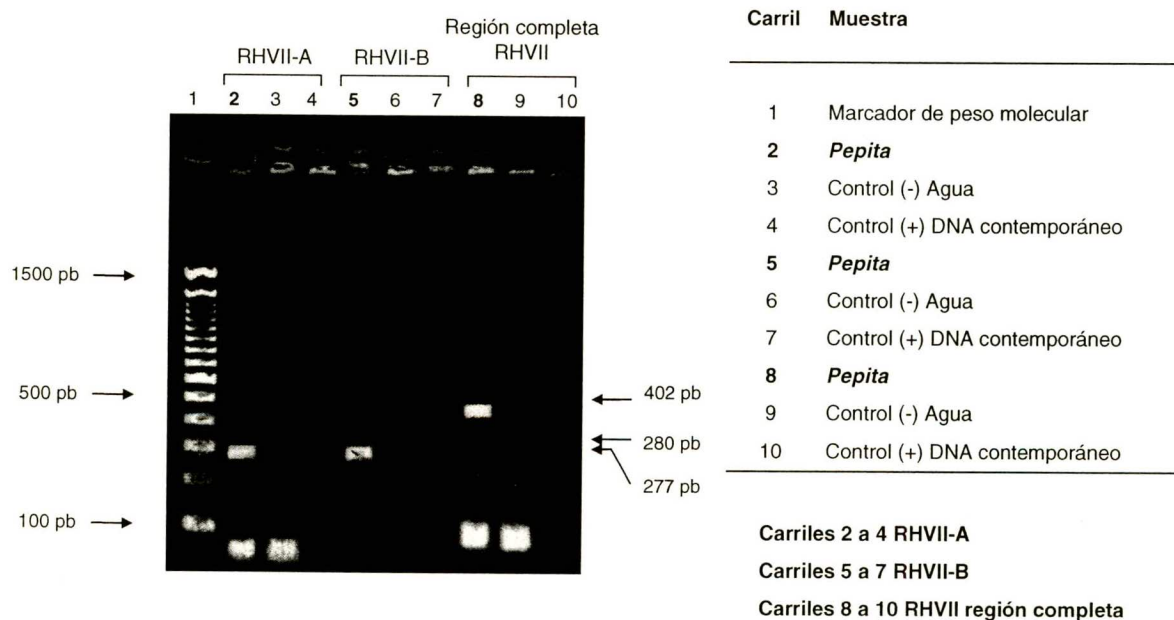


Fig. 20. B. Región hipervariable I-B



Cuando el método de extracción fue evaluado, se procedió a la amplificación de los fragmentos restantes. En la figura 21. se observan los fragmentos de la región hipervariable II, subdividida en sus dos segmentos y región completa.

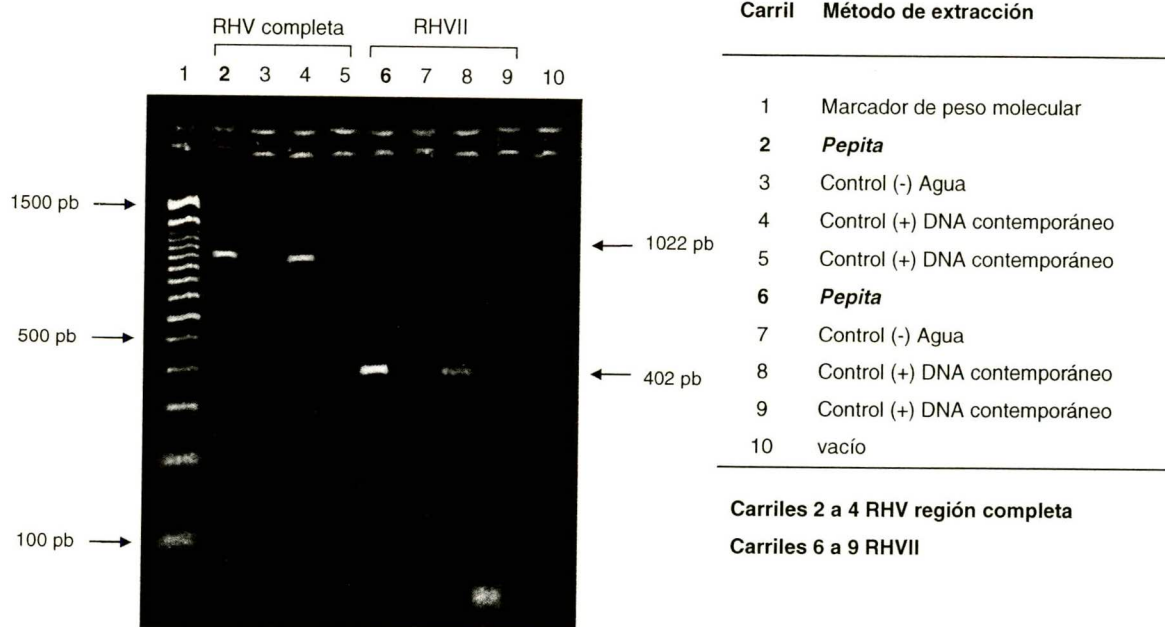
**Figura 21.** Electroforésis en gel de agarosa para el análisis de amplificados por PCR de la región hipervariable completa y región hipervariable II completa de la muestra denominada *Pepita*, ubicadas en las posiciones L-15997/H408 (RHV), y L-048/H-408 (RHVII) respecto a la secuencia de DNA mitocondrial humano revisado de la referencia de Cambridge\* (rCRS).



\* Número de acceso: J01415.2 gi:113200490 (www.mitomap.org)

En especímenes de importancia arqueológica, la muestra obtenida o que es enviada para su estudio suele consistir de cantidades pequeñas, ello implica que la cantidad de DNA obtenido sea tal que se imposibilita un análisis de calidad directo, en consecuencia la calidad debe ser evaluada mediante la amplificación de fragmentos cada vez mayores, en vista de estas vicisitudes fue necesaria la amplificación de tanto de los fragmentos de la RHVI y RHVII como de la región D-loop completa, encontrando posible en cada caso su amplificación, lo cual permitió establecer que el DNA obtenido fuera de al menos 1022 pb (ver fig. 22).

**Figura 22.** Electroforésis en gel de agarosa para el análisis de amplificados por PCR de la región hipervariable completa y región hipervariable II completa, ubicadas en las posiciones L-15997/H408 (RHV), y L-048/H-408 (RHVII) respecto a la secuencia de mtDNA humano revisado de la referencia de Cambridge\* (rCRS).



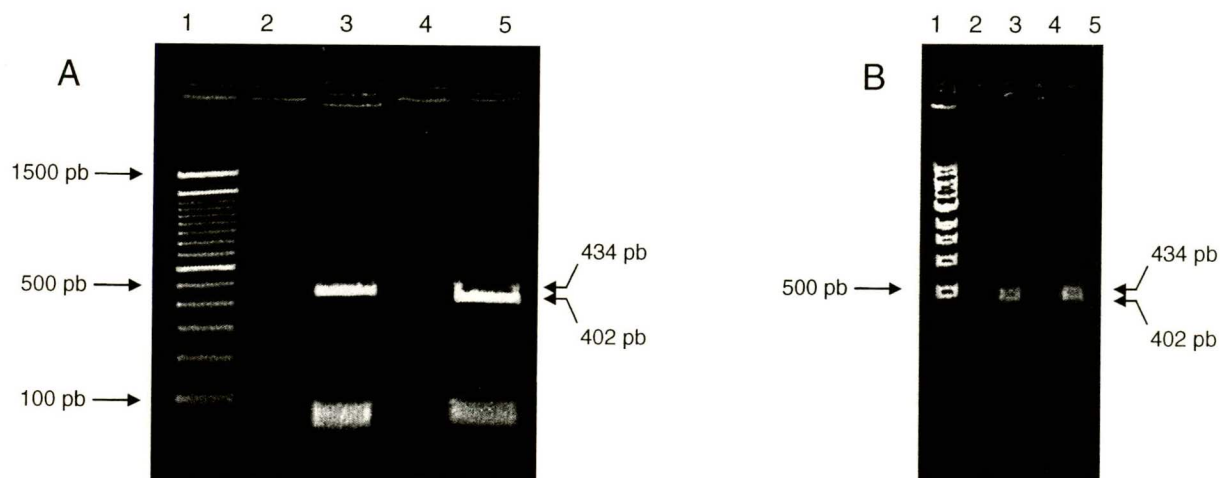
\* Número de acceso: J01415.2 gi:113200490 (www.mitomap.org)

### 6.11. Marcaje por el método de terminadores fluorescentes

Debido a que la secuenciación mediante electroforésis capilar no puede ser realizado directamente tal como ocurre con otros sistemas de secuenciación, se procede como paso previo al marcaje por el método de terminadores fluorescentes en los amplicones generados, para ello deben eliminarse toda traza de excedentes de reacción que hubieran podido quedar durante PCR. En el presente trabajo la limpieza

de los amplicones para el marcaje de terminadores fluorescentes se realizó mediante corrimiento electroforético en geles de agarosa y purificación por el sistema de GenClean III (Q-biogene), su importancia en la eliminación de oligonucleótidos puede ser vista en la figura 23. Como parte final de la metodología, los amplicones con marca fueron sometidos a limpieza por el método de isopropanol.

**Figura 23.** limpieza de los fragmentos L-15997/H-16391 (RHVI) y L-048/H-408 (RHVII), mediante GenClean post-electroforésis en geles de agarosa para la eliminación de dNTPs, oligonucleótidos y enzima.



Carriles 1; marcador de peso molecular, carriles 2 y 4; vacíos, carril 3; RHVI, carril 5; RHVII

**Fig A.** Análisis de productos de PCR antes de la limpieza.

**Fig B.** Análisis de productos de PCR después de la limpieza mediante QIAquick post-electroforésis.

## 6.12. Haplotipos y regiones hipervariables observadas.

Como parte de los resultados se presenta un resumen dispuesto en tablas de las muestras procesadas, en ellas se indica el éxito obtenido en la amplificación de fragmentos para la designación de haplogrupos y amplificados de segmentos para secuenciación de las regiones hipervariables de muestras de restos óseos de mayas del estado de Chiapas (tab. 15.), restos momificados del Centro y Norte de México (tab. 16) y frecuencia de haplogrupos reportados respecto a la obtenida en el presente estudio (tab. 17).

**Tabla 15.** Resumen de resultados de la amplificación de fragmentos para la designación de haplogrupos y amplificadas de segmentos para secuenciación de las regiones hipervariables de muestras de restos óseos de mayas del estado de Chiapas.

**Palenque Grupo Templo de la Cruz (PGTC)**

Muestra	Haplogrupo				RHVI		RHVII	
	A	B	C	D	Fg. A	Fg. B	Fg. A	Fg. B
(8)	+	-	-	-	-	+	-	-
(9)	++	-	-	-	-	+	-	-
(10)	-	-	-	-	-	+	-	-
(11)	++	-	-	-	-	+	-	-
(12)	++	-	-	-	-	-	-	-
(15)	+	-	-	-	-	-	-	-
(16)	++	-	-	-	-	-	-	-
(17)	++	-	-	-	-	-	-	-

**Palenque Grupo Templo XV (PGTXV)**

Muestra	Haplogrupo				RHVI		RHVII	
	A	B	C	D	Fg. A	Fg. B	Fg. A	Fg. B
(19)	-	-	-	-	-	-	-	-
(21)	-	-	-	-	-	-	-	-
(22)	-	-	-	-	-	-	-	-
(23)	-	-	-	-	-	-	-	-
(24)	-	-	-	-	-	-	-	-
(25)	-	-	-	-	-	-	-	-

**Bonampak Grupo Frey (BGF)**

Muestra	Haplogrupo				RHVI		RHVII	
	A	B	C	D	Fg. A	Fg. B	Fg. A	Fg. B
(42)	++	+	-	-	-	++	-	-
(43)	++	+	-	-	-	++	-	-
(44)	++	+	-	-	-	++	-	-
(45)	++	+	-	-	-	++	-	-

Fg; fragmentos A y B de las respectivas regiones hipervariables (RHV I y II), +; muestras amplificadas, ++ muestras amplificadas y con resultados de digestión, --; muestra sin resultados por nula amplificación.

**Tabla 16.** Resumen de resultados de la amplificación de fragmentos para la designación de haplogrupos y amplificados de segmentos para secuenciación de las regiones hipervariables de muestras de restos momificados del centro y norte de México.

<b>Momias</b>								
Muestra	Haplogrupo				RHVI		RHVII	
	A	B	C	D	Fg. A	Fg. B	Fg. A	Fg. B
M-1					+			
M-2					+			
M-3					+			
M-4					+			
M-5								
M-6								
M-7								
Pepita	++	++		++	++	++	++	++

Fg; fragmentos A y B de las respectivas regiones hipervariables (RHV I y II), +; muestras amplificadas, ++ muestras amplificadas y con resultados de digestión, --; muestra sin resultados por nula amplificación.

**Tabla 17.** Comparación de la frecuencia de haplogrupos (%) reportados respecto a la obtenida en el presente estudio.

<b>Población Maya</b>	<b>n</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>Otros</b>	
Antiguos de Xcaret	25	84.0	4.0	8.0	0.0	4.0	González-Oliver et al. (2001)
Antiguos de Copan	9	0.0	0.0	89.0	11.0	0.0	Merriwether et al. (1997)
Contemporáneos	27	51.9	22.2	14.8	7.4	3.7	Torróni et al. (1992)
Antiguos de Bonampak	4	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Presente estudio
Antiguos de Palenque	5	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	Presente estudio

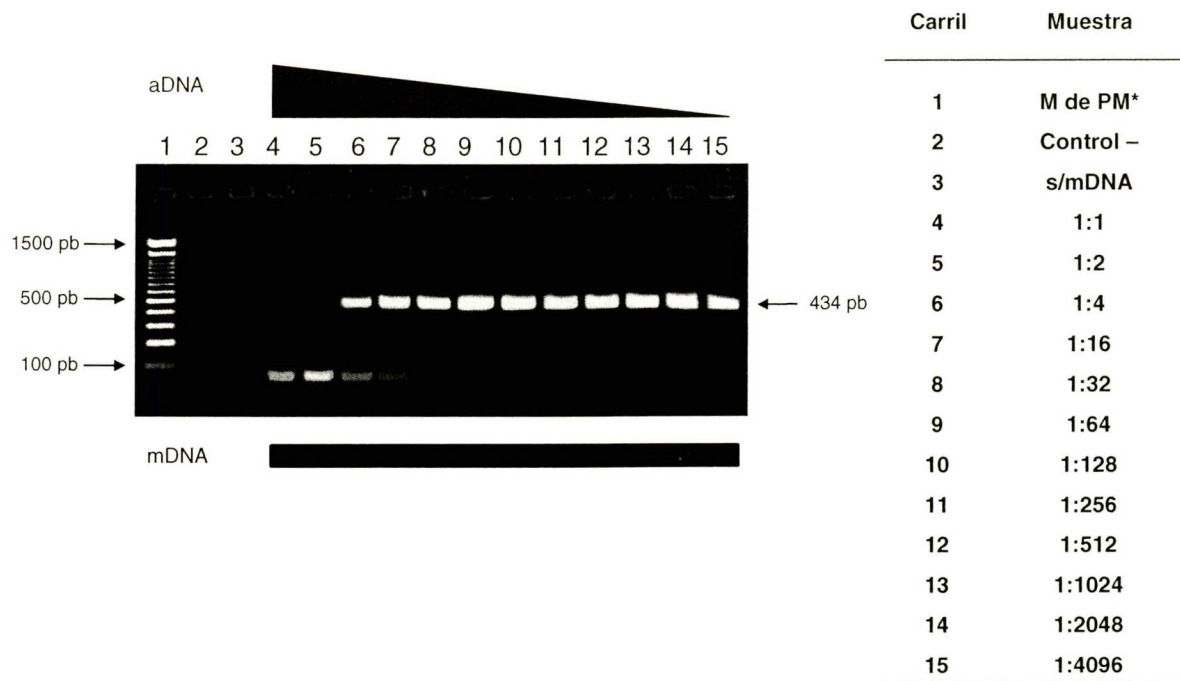
### 6.13. Fidelidad de Secuencias

Según se apunta en referencias bibliográficas, el efecto de los contaminantes de una muestra puede traer consigo potenciales riesgos de adición de nucleótidos errónea durante la síntesis de DNA que se realiza en PCR (bibliografía), como resultado, secuencias alteradas o con cambio nucleotídicos en proporciones variables no similares a la secuencia real de la muestra. En respuesta a esta problemática, se estableció como método para corroborar la fidelidad de las secuencias un ensayo que evaluara el potencial efecto de cambio nucleotídico en PCR generado por los contaminantes. Los ensayos que evaluaron el efecto de síntesis errónea consistieron de tres etapas; a) establecimiento de diluciones mínimas necesarias de una muestra sin efecto inhibitorio en PCR, b) eliminación de trazas de DNA antiguo mediante *DNasa I*, c) amplificación de DNA moderno en presencia de contaminantes procedentes de la muestra problema y d) evaluación de las secuencias obtenidas.

Las diluciones mínimas necesarias de una muestra con contaminantes inhibidores que se realizaron para la obtención de amplificadores se muestran en la figura 24 y 25.

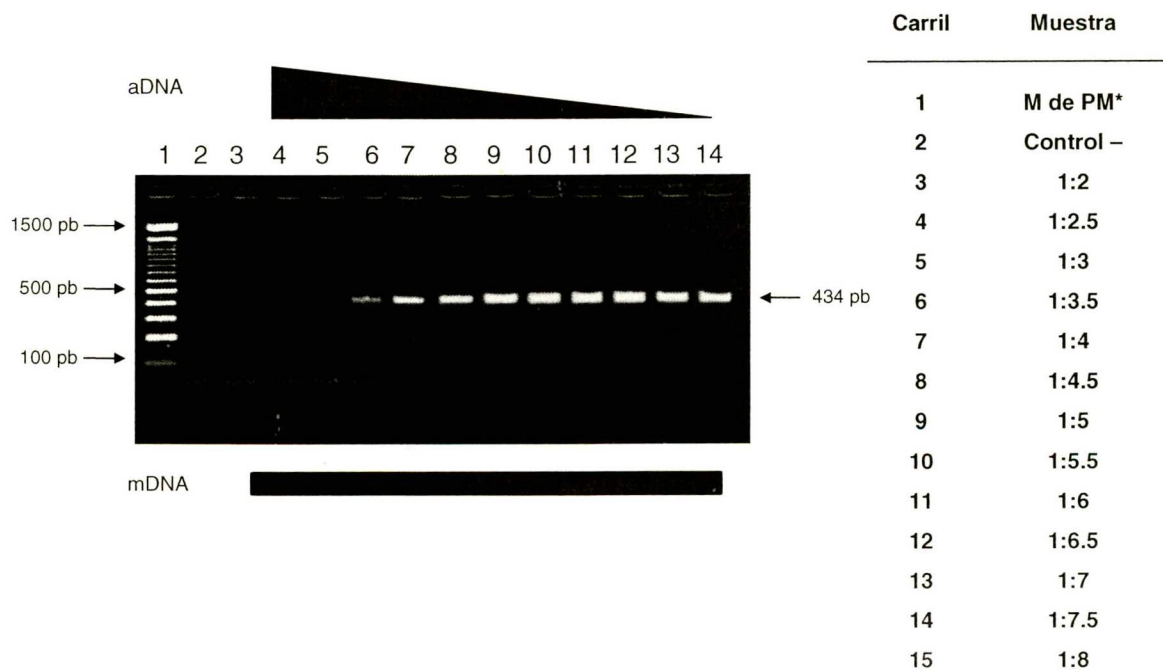
La determinación sobre la cantidad máxima de *DNasa I* requerida para los ensayos de digestión fue realizada sobre DNA antiguo con contaminantes y DNA amplificado de la región hipervariable I procedente de DNA moderno, la figura 26. muestra el ensayo con que se determinó la cantidad de *DNasa I* requerida, donde la muestra de DNA antiguo (en dilución 1:4) fue sometida a la digestión de la *DNasa I* a 37 °C por 1 hora, luego de lo cual la *DNasa I* fue inactivada por ebullición de la muestra durante 1 hora. La muestra con el DNA digerido y *DNasa I* inactivada fue dividida en 2 alícuotas, una de ellas como control (carril 2 y 5, fig.26.) y la restante para evaluar la inactivación de la enzima, adicionando en ella DNA amplificado de la región hipervariable I procedente de DNA moderno (~100 ng/μl) para posteriormente ser nuevamente incubada (carril 3 y 6, fig. 26.), como un control para establecer el efecto de la digestión se corrió DNA amplificado de la región hipervariable I procedente de DNA moderno en misma concentración que la empleada para el análisis de la digestión (carril 4 y 7, fig. 26.)

**Figura 24.** Gradientes de diluciones de DNA antiguo (aDNA; 1:1 a 1:4096) con DNA moderno (mDNA) en concentración constante de ~100 ng/  $\mu$ L.



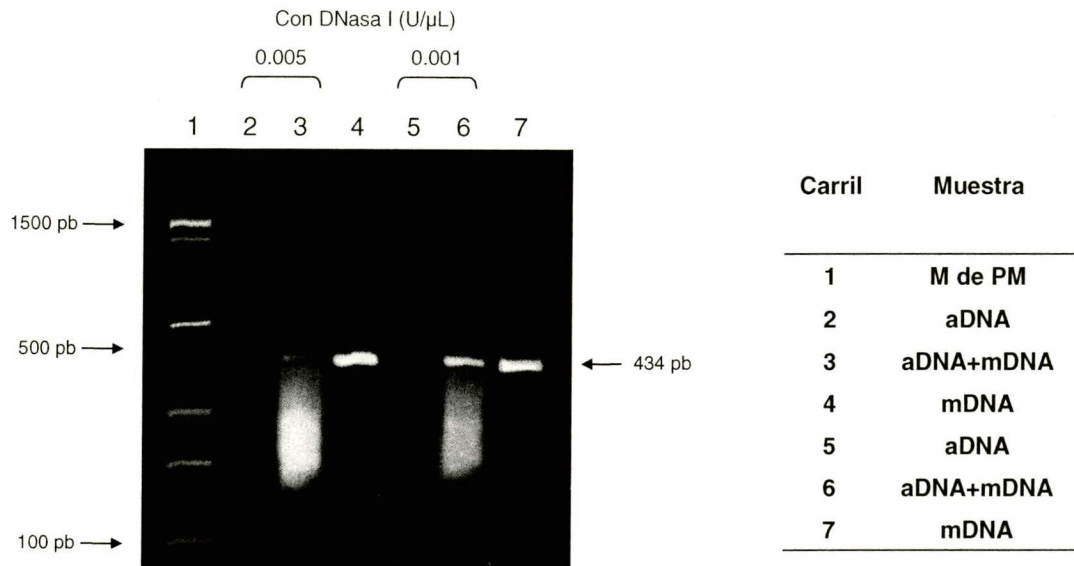
\* M de PM: marcador de peso molecular

**Figura 25.** Gradientes de diluciones de DNA antiguo (aDNA; 1:1 a 1:8) con DNA moderno (mDNA) en concentración constante de ~100 ng/  $\mu$ L.



\* M de PM: marcador de peso molecular

**Figura 26.** Electroforesis para la determinación de *DNasa I* máxima requerida para la digestión de DNA antiguo



\* M de PM: marcador de peso molecular

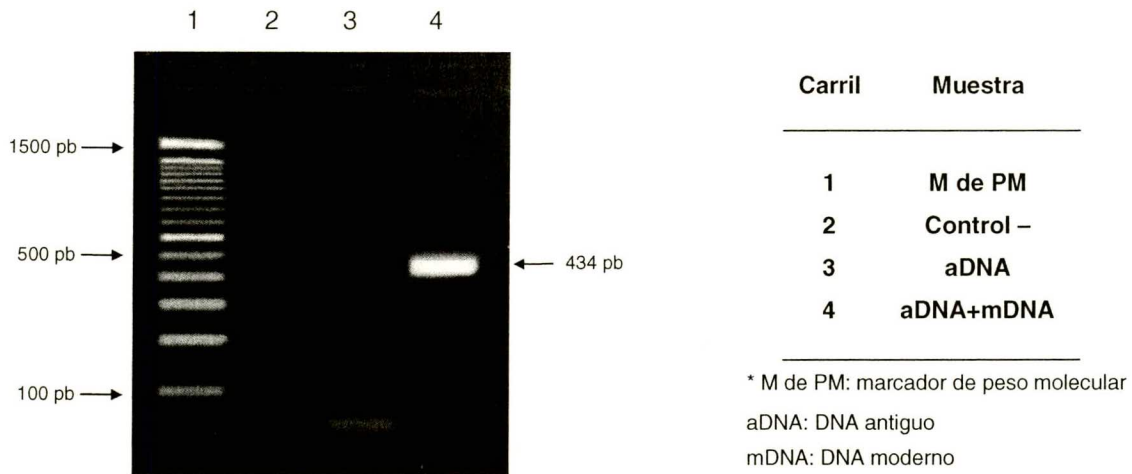
aDNA: DNA antiguo

mDNA: DNA moderno

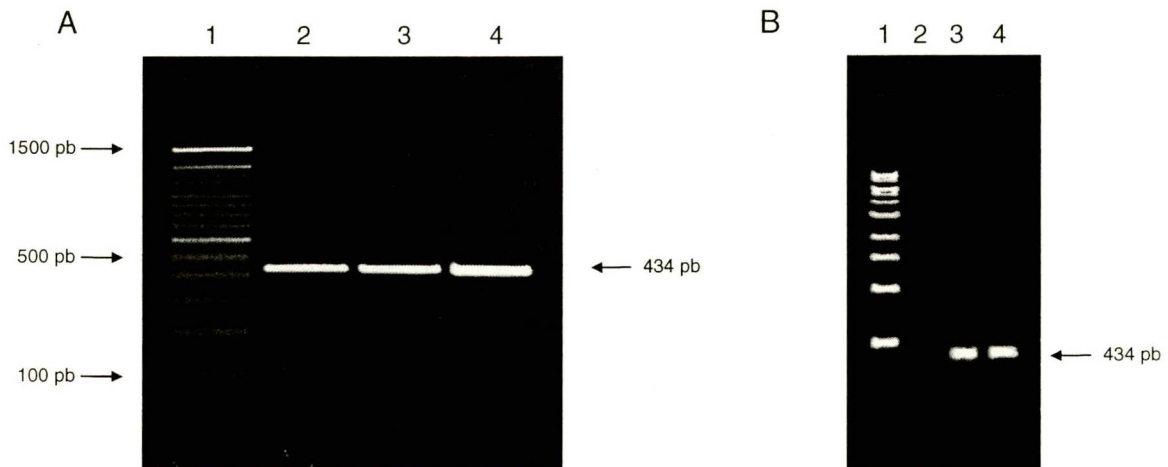
Una vez establecidas las condiciones para eliminar posibles trazas de DNA antiguo, se procedió a la amplificación de la región hipervariable I de DNA moderno (~1ng/ μl) en presencia de contaminantes. En la figura 27. puede apreciarse la muestra con DNA antiguo digerido (carril 3) y muestra con DNA antiguo digerido más DNA amplificado de la región hipervariable I de DNA moderno (carril 4).

Finalmente las muestras amplificadas bajo estas condiciones fueron sujetas a la limpieza de excedentes de reactivos de PCR (ver fig. 28.) mediante el sistema comercial de GenClean III (Q-biogene), para así ser marcadas por el método de terminadores fluorescentes y limpieza final por el método de isopropanol para los amplicones con marca de terminadores fluorescentes generados.

**Figura 27.** Ensayo de PCR para la región hipervariable I completa de DNA moderno en una muestra de DNA antiguo digerido con presencia de contaminantes inhibidores mínimos para PCR exitosa.



**Figura 28.** Limpieza de los fragmentos L-15997/H-16391 (RHVI), mediante GENCLEAN post-electroforésis en geles de agarosa para la eliminación de dNTPs, oligonucleótidos y enzima.



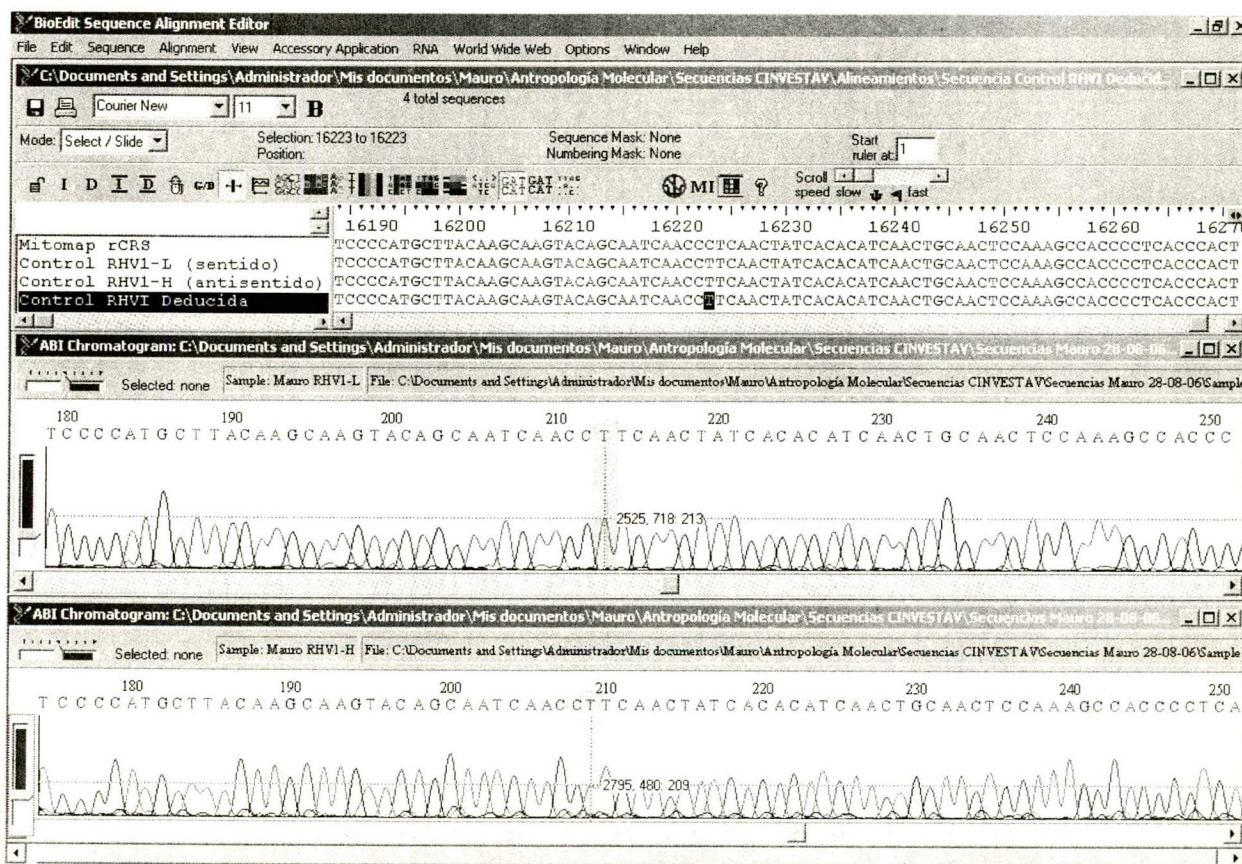
**Fig A.** Análisis de productos de PCR antes de la limpieza. Carriles 1; marcador de peso molecular, carriles 2 y 3; mDNA/contaminantes, carril 4; mDNA/sin contaminantes

**Fig B.** Análisis de productos de PCR después de la limpieza mediante GENCLEAN post-electroforésis carriles 1; marcador de peso molecular, carriles 2; control -, carril 3 y 4; mDNA/contaminantes.

## 6.14. Análisis de secuencias.

Las secuencias obtenidas fueron deducidas por alineamiento mediante Clustal W a través de BioEdit versión 7.0.5.3 empleando la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (rCRS): HUMMTCG J01415.2 gi:113200490, así mismo fueron corroboradas manualmente, tanto la secuencia como para los electroferogramas generados por el equipo de secuenciación. Un ejemplo de corroboración se muestra en la figura 29, correspondiente a una muestra control para la región hipervariable I.

**Figura 29.** Corroboración de secuencia de una muestra control a través de complementariedad por las secuencias sentido (L) y antisentido (H), así como de complementariedad de electroferogramas generados en equipo ABI PRISM 310 empleando como referencia la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (rCRS): HUMMTCG J01415.2 gi:113200490. En la imagen se muestra un segmento de la región hipervariable I (RHVI) en que se advierte un cambio nucleotídico en la posición 16223, para este caso una transición C→T según la rCRS, y que forma parte de la secuencia definitiva a ser empleada para posteriores análisis filogenéticos y filogeográficos.



La secuencia obtenida y corroborada que se obtiene (tabla 18.) dio lugar al establecimiento del haplotipo de la muestra control (tabla 19.), el cual representa las diferencias nucleotídicas por sustitución, pérdida e inserción de bases respecto a la rCRS.

**Tabla 18.** Secuencia corroborada de una muestra control para la región hipervariable I completa por complementariedad de las secuencias sentido y antisentido respectivas.

TATTCTCTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCAC  
 CCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTAC  
 GGTACCATAAATACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAAACC  
 CCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAAC  
 TGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTT  
 AACAGTACATAGTACATAAAGCCATTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCC  
 TTCTCGCCCCCATGGATGACCCCTCAGATAGGGGTCC

**Tabla 19.** Haplotipo de la muestra control teniendo como referencia la Secuencia de Referencia de Cambridge revisada (rCRS): HUMMTCG J01415.2 gi:113200490.

	1	1	1
	6	6	6
	2	3	3
	2	2	6
	3	5	2
(rCRS): HUMMTCG J01415.2 gi:113200490	C	T	T
Haplotipo de Muestra Control para la Región Hipervariable I Completa	T	C	C

Las secuencias resultantes de cada región hipervariable fueron retadas en el GenBank mediante BLAST por búsqueda de nucleótido-nucleótido (blastn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), para el caso de otras bases datos tal como MitoSearch la búsqueda se realizó por haplotipos y en forma manual. Las secuencias encontradas fueron alineadas mediante Clustal W a través del portal del European Bioinformatics Institute (EBI, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), los alineamientos resultantes fueron entonces empleados para su reporte en formato de haplotipos (tabla 20.).

**Tabla 20.** Alineamiento de secuencias de la región hipervariable I mediante Clustal W en formato de haplotipo. Base de datos GenBank. (Primera columna; Número del acceso al GenBank seguido de su área geográfica reportada). Los haplotipos con gris representan secuencias sin cambio alguno.

	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3
	8	2	6	8	9	9	1	2	5	6
	9	3	5	9	0	2	9	5	6	2
						.1				.1

	T	C	A	A	C	-	G	T	T	T	-
J01415.2 rCRS2006	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
42RHV1-B Chiapas México	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	G
43RHV1-B Chiapas México	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
44RHV1-B Chiapas México	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
45RHV1-B Chiapas México	.	T	.	.	T	C	A	.	.	C	-
Mauro México CD Mexico	.	T	.	.	.	.	.	C	.	C	-
Pepita Querétaro México	.	T	.	G	T	-	A	.	.	C	-
AB093869 Malaysia	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AB174936 Republica Dominicana	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF212390 Russia, Peninsula Chukchee	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392103 China Lisu	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392106 China Lisu	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392112 China Lisu	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392124 China Lisu	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392125 China Lisu	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392147 China Dai	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392226 China Sali	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392302 China Tu	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF392382 China Zhuang	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AF535102 USA Alaska, Aleut	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AY244143 China Mongolia	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AY244178 China Mongolia	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AY244179 China Mongolia	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AY244242 China Mongolia	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AY244244 China Mongolia	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AY244261 China Mongolia	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AY677767 China Xinjiang	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ126045 Venezuela	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ126048 Venezuela	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ126062 Venezuela	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ144507 Peru Ancash	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ303551 Canada Cambridge Bay	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ303563 Canada Bathurst Area	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ303575 Canada Kitikmeot	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ383558 USA California, Chumash	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ383570 USA California, Salinan	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ383602 USA California, Chumash	.	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
AB241845 Japan, Hokkaido	.	T	.	.	T	-	A	.	.	.	-
AF392273 China Tibetan	.	T	.	.	.	-	A	.	.	C	-
AF392274 China Tibetan	.	T	.	.	.	-	A	.	.	C	-
AF392279 China Tibetan	.	T	.	.	.	-	A	.	.	C	-
AY959689 Rusia Siberia, Tuva	.	T	.	.	.	-	A	.	.	C	-
AY959698 Rusia Siberia, Tuva	.	T	.	.	.	-	A	.	.	C	-
DQ303871 Greenland: Qaanaaq	.	T	G	.	T	-	A	.	.	C	-
DQ383517 USA California, Chumash	C	T	.	.	T	-	A	.	.	C	-
L39347 Panama Ngobe	.	T	.	.	T	-	A	.	C	C	-

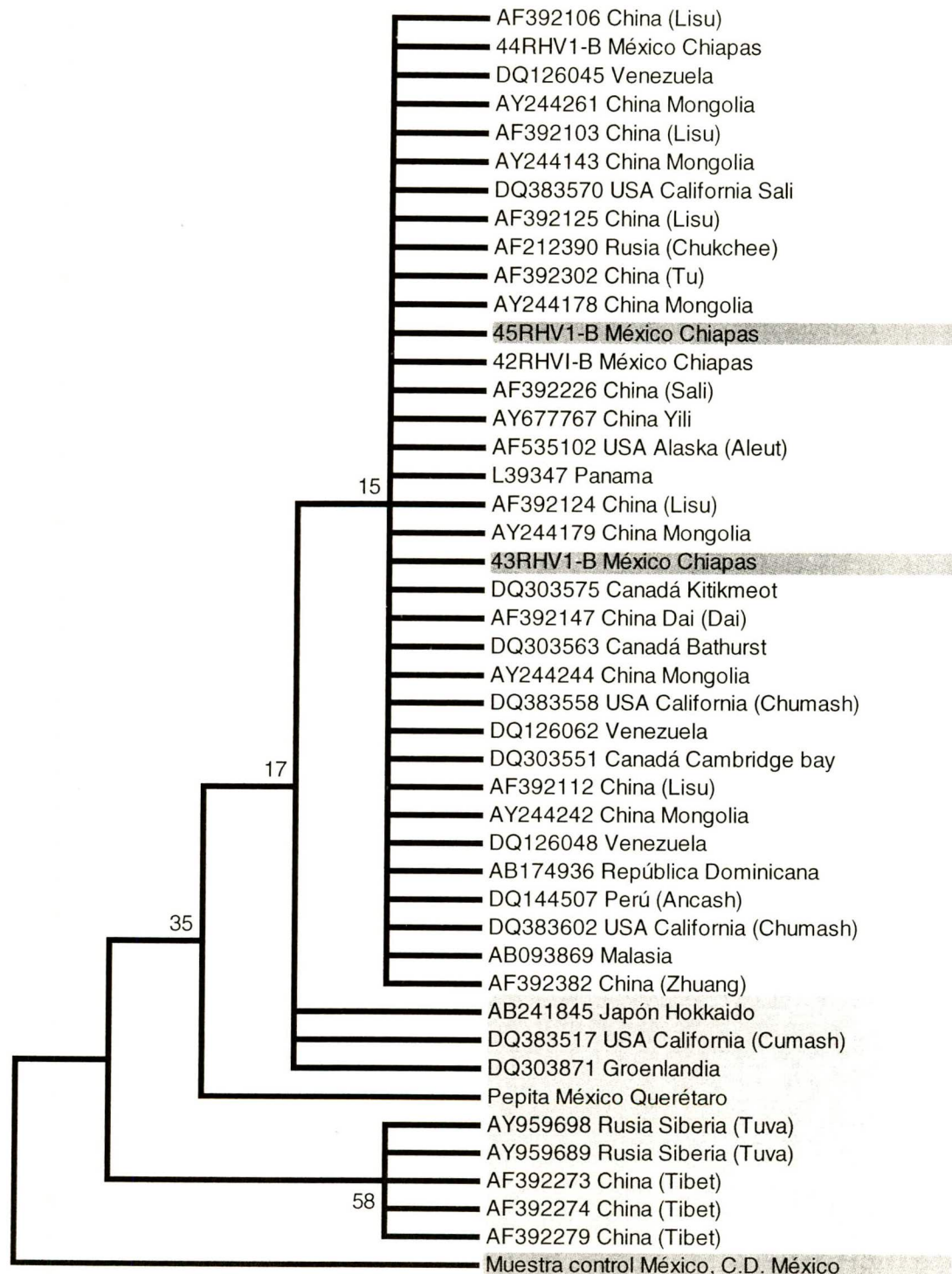
### **6.15. Análisis filogenético.**

Luego de la obtención de secuencias, estas fueron empleadas para el análisis filogenético mediante el software MEGA versión 3.1. (Kumar S. et al, 2004), generando la construcción de árboles mediante los métodos de máxima parsimonia, mínima evolución, Neighbor-Joining y par-grupo no ponderado con media aritmética (UPGMA: Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean), en todos los casos con aplicación del modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2-p y número de repeticiones Bootstrap = 1000. El ejemplo de la figura 30 señala la construcción de un árbol mediante el método UPGMA, quien representa un comportamiento más cercano al modelo establecido asumiendo que las tasas de evolución entre las secuencias son aproximadamente constantes entre linajes, de tal forma que existe una relación aproximada entre la distancia evolutiva y el tiempo de divergencia.

### **6.16. Análisis filogeográfico.**

La ubicación geográfica reportada en GenBank para cada secuencia fue empleada para la construcción de un mapa en que se dilucidó de forma hipotética la ruta de los asentamientos. En la figura 31 se señalan los sitios geográficos de las secuencias reportados por GenBank. El trazo o dirección de flujo migratorio fue establecido de acuerdo con la variabilidad observada en las secuencias, asumiendo que cuanto mayor sea la diferencia, más alejada en el tiempo ha de estar la separación entre cada linaje, los cuales se concatenan uno de otro, tanto temporal como geográficamente. Los asentamientos de poblaciones ancestrales en un sitio geográfico determinado a través del tiempo junto con el registro fósil dan por tanto la dirección del flujo migratorio.

**Figura 30.** Árbol Filogenético mediante el método UPGMA con aplicación del modelo de sustitución de nucleótidos de Kimura 2-p y número de repeticiones Bootstrap = 1000, y con rango de corte fuera de 15 %. En recuadros de color muestras con diferencias nucleotídicas: en morado ; inserción de 1 base, gris ; transición de 1 base, mientras que en rojo ; transición de 2 base.



**Figura 31.** Asentamiento y ruta de dispersión geográfica de las secuencias reportadas en GenBank para los linajes emparentados con muestras procedentes de restos óseos mayas de Chiapas México (presente estudio).



## DISCUSIÓN.

### 7.1. Problemas metodológicos.

Los problemas metodológicos que se suscitan durante el análisis de DNA representan uno de los factores que más afectan la pérdida de muestras, gasto de recursos y el emplazamiento de tiempos mayores a los programados en una investigación, en algunos casos el fracaso inminente. Debe tenerse en claro que los problemas metodológicos van más allá de la simple aplicación de una técnica, confieren una planeación rigurosa en la metodología y el análisis minucioso de cualquier elemento que puede alterar o favorecer los objetivos de una investigación. La apreciación correcta sobre el desempeño y modo de trabajo en investigaciones previas suele ser una práctica sesgada en que sólo se advierten los aciertos, difícilmente se emiten los problemas que el investigador enfrenta en su trabajo diario, menos aún la forma con que dichas vicisitudes fueron sorteadas. El desarrollo en el trabajo experimental lleva consigo el ejercicio de reflexión constante sobre los aciertos que atesoran las investigaciones previas y las fallas que pueden o habrán de suscitarse durante la investigación en curso, pero además, la formulación de respuestas y soluciones a los planteamientos generados bajo consideración de las limitaciones presupuestales y técnicas con que un laboratorio de investigación cuenta.

Durante el presente trabajo se ha visto que muchos de los problemas enfrentados son resultado de la omisión sobre aspectos de apariencia trivial y exceso de confianza en las prácticas cotidianas, a este respecto se enumeran algunas pautas. La decisión de confinar aspectos metodológicos a esta discusión, y no a un apéndice como apartado complementario estriba en la trascendencia e importancia de las mismas.

Entre las pautas a tener en cuenta se tiene:

1. Certificación, normas y controles de calidad de reactivos y consumibles, uso y aplicaciones.
2. Evaluación del funcionamiento óptimo de equipos, uso y solución de problemas

3. Evaluación de materiales de uso; Estado físico, eliminación de contaminantes, lavado y esterilización.

4. Evaluación de soluciones empleadas; Preparación, vigencia, uso y verificación periódica sobre su estado a través de patrones estándar.

5. Análisis de contaminación en reactivos y soluciones.

6. Uso de enzimas; Verificación de su estado en términos de concentración y actividad sobre el tipo de muestra.

7. Verificación de oligonucleótidos; Análisis de secuencias, concentración y optimización de cantidades empleadas.

8. Patrones de referencia; Uso de marcadores de peso molecular y empleo de controles negativos y positivos. Estos últimos con cuidados extremos y sólo para evaluación de materiales y métodos, análisis y evaluación de contaminantes, nunca paralelos con muestras problema en la determinación de haplogrupos y/o secuencias.

9. Evitar la manipulación excesiva de las muestras. Alicuotar y almacenar separadamente muestras en uso y de resguardo para evitar procesos de congelamiento y descongelamiento quienes dan lugar a la pérdida gradual en la calidad del DNA

10. Puesta de buenas prácticas de laboratorio y estandarización de la técnica.

11. Actualización de protocolos de trabajo, añadiendo en ellos la incidencia de errores comunes y extraordinarios con puesta de soluciones generadas en que se indique su éxito o fracaso.

## **7.2. Aproximaciones de estandarización para el método de extracción con DNA antiguo.**

Debido que no existe un método único en el análisis de mtDNA antiguo fue necesario el establecimiento de pautas y estandarización de un método de extracción a fin de desarrollar una técnica de partida o inicio experimental. En condiciones idóneas esto implica la puesta a punta de una técnica de extracción sobre una muestra problema y que habría de partir de la evaluación de diferentes técnicas, sin embargo, la cantidad y condición de una muestra suele en la mayoría de las veces hacer esto difícilmente posible. Es por ello que se procede a evaluar un método de extracción por grupos, que a su vez, este basado en una muestra con características similares, pero

que además se encuentre en cantidad suficiente, tal que pueda ser evaluada por diferentes métodos. Esta situación no fue posible dado la cantidad de muestra emitida. En el mejor de los casos la cantidad de muestra fue apenas superior al gramo (una sola muestras con 1.33 g), situación que dio lugar a la evaluación de una muestra antigua sin vinculo de origen con las muestras problemas. En consecuencia, la estandarización de un método de extracción de aproximación en que se evaluaron los métodos de fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico en variante de quelación por uso previo de EDTA, y en ambos casos con subvariantes de precipitación de DNA por uso de etanol e isopropanol, además de la puesta para el método con isotiocianato de guanidina. De los resultados obtenidos se deliberó que el método de partida fuera el de fenol/cloroforma/alcohol-isoamílico uso previo de EDTA y precipitación con etanol, basado en lo siguiente: a) La técnica presentó mayor rendimiento en términos de más y mejor amplificación para el fragmento que confirma el haplogrupo A. b) Apreciación de DNA de alto peso molecular y c) menor cantidad de contaminantes presentes en el DNA extraído (DNA total visto en electroforésis), características superiores respecto de los otros métodos practicados..

En cuanto al éxito en la extracción de DNA para las muestras problema se tiene que:

1. El éxito depende del origen de la muestra (por grupo), lo cual es concordante respecto al hecho de que cada muestra varía en cuanto a cantidad de contaminantes según el tipo de suelo, pero también debido a la cantidad DNA conservado dados los factores que afectan su degradación tales como temperatura, pH, humedad, agentes microbianos de degradación entre otros, y que representan factores propios del sitio de hallazgo.

2. El éxito en la extracción guarda relación directamente proporcional con la cantidad de muestra procesada. Muestras superiores a 0.7 g permitieron un éxito de 100%, no así en muestras con cantidad menor a 0.7 g con apenas 45% éxito. Lo que resulta lógico si se considera que a mayor cantidad de muestra, mayor la cantidad de DNA contenido.

3. El éxito varía dependiendo del método de extracción empleado. Si bien se había determinado que le método optimo fuera el de fenol/cloroforma/alcohol-isoamílico

uso previo de EDTA y precipitación con etanol, se tiene que la variante de extracción sin uso de EDTA ofrece mejores resultados, una razón posible puede estar en la cantidad de muestra, y exceso de quelación, ya que el EDTA al atrapar iones metálicos divalentes tales como el calcio disgrega la matriz del hueso compuesta por hidroxiapatita, molécula con alta afinidad por el DNA, que aunado a una pobre cantidad de muestra daría lugar a pérdidas considerables en el rendimiento. Cabe recordar que la cantidad de muestra de DNA antiguo empleada para la estandarización de la técnica fue de 1.0 g, mientras que las muestras problemas estuvieron por debajo de esta cantidad. Con todo ello, también deberá tenerse en cuenta que el análisis sobre el éxito de los métodos de extracción se efectuó en un número de muestras tan pequeño que no permite un análisis estadístico que confirme lo anterior.

4. El éxito varía de acuerdo al tipo de tejido. En muestras momificadas se tiene que hay mejores resultados en tejido muscular que en piel o cabello, debido probablemente a la elevada cantidad de mitocondrias como respuesta a los requerimientos energéticos del tejido.

5. Fue también posible observar que en las muestras estudiadas no hay variación sobre el éxito de la extracción con base a su temporalidad. Las muestras de las que no fue posible la extracción de DNA (muestras de Palenque Grupo Templo XV; 750 a 800 DC.) son cronológicamente más modernas que las del grupo Templo de la Cruz de Palenque (600-700 DC.) y de Bonampak (580 y 800 DC), de las cuales sí se extrajo DNA, lo cual no significa que el tiempo no sea un determinante, sino que en estas muestras la variación en aproximadamente 200 años no interfiere para la extracción.

El análisis de DNA implica un método destructivo y toda muestra analizada no puede ser suplida, por tanto, se debe ser en extremo cuidadoso sobre el abordaje del problema antes de dar inicio a las aplicaciones experimentales.

En la estandarización para el método de extracción de partida en DNA antiguo valdría hacer las siguientes consideraciones:

1. Considerar en la muestra todas las variables posibles que puedan afectar el método y la muestra

2. Evaluarse todo método posible a ser aplicado con las muestras problema a través de material de referencia, en los casos de no contar con dicho material aplicar los criterios de extracción considerados en trabajos previos en los que se halla procesado material con características similares al material que habrá de estudiarse.

3. Deberá buscarse un criterio de referencia para el establecer el (o los) método(s) óptimos de extracción dando énfasis a la facilidad de procesamiento, tiempos mínimos para la extracción, facilidades de desarrollo según las características del material y equipo del laboratorio, considerado además los costos de la investigación.

4. Se quiere que la aplicación de metodologías alternativas a desarrollarse sea en muestras que ya hayan sido procesadas con resultados exitosos, de manera que se tengan referencia concreta sobre los resultados esperados.

5. Sopesar las ventajas y desventajas que un método tiene respecto a los otros, como respecto las muestras que habrán de ser procesadas.

### **7.3. Análisis de calidad.**

El análisis de calidad en DNA geonómico antiguo es una practica necesaria que deberá ser siempre considerada, ello implica descartar riesgos de contaminantes inhibidores de PCR como de contaminación microbiana, este último un contaminante común que suelen ser considerados como DNA de la muestra, Por lo que el DNA de alto peso molecular de una muestra no deberá ser tomado como criterio único de evaluación.

La cantidad y tipo de contaminante que una muestra presenta es uno de los grandes problemas en el análisis de DNA antiguo. Aún cuando se puede tener una idea sobre la cantidad de contaminantes mediante electroforésis en geles de agarosa, su impacto queda advertido durante la amplificación, por tanto es imprescindible se evalúe todo método a disposición para la eliminación o reducción de dichos contaminantes.

Las prácticas de amplificación de DNA antiguo junto con DNA moderno es quizá el mejor método de análisis de calidad, su aplicación permite evaluar la contaminación en cuanto a impacto en los problemas de amplificación, y sobre si la muestra problema es o no candidato para un análisis con amplias posibilidades de éxito.

#### 7.4. Análisis de haplogrupos.

El análisis de DNA antiguo puede partir de varias vertientes, en principio, parte de criterios que establecen la facilidad con que un método puede desarrollarse, tradicionalmente se han aplicado técnicas para el análisis de mutaciones puntuales, aplicación con origen en el mapeo de genomas a través del uso de enzimas de restricción. El empleo de enzimas de restricción según se ha expuesto anteriormente ha dado lugar al establecimiento de marcas que distinguen grandes grupos poblacionales de acuerdo a su ubicación geográfica, las cuales son denominadas haplogrupos.

La distribución de los haplogrupos en una población permite distinguir no sólo la presencia de una población en un área geográfica determinada, sino que además el flujo migratorio que esta puede tener entre un sitio y otro. Sin embargo, su aplicación guarda cierta problemática, la más importante es sin duda el tamaño de muestra que en la mayoría de las veces es tan pequeña que no pueden ser representativa de la población que se estudia.

Debe considerarse que el análisis de haplogrupos representa sólo un acercamiento al fenómeno estudiado y debe tener de apoyo investigaciones previas en diferentes ámbitos, tanto culturales como biológicos, tales como vestigios cerámicos, de textiles, ramas lingüísticas, presencia de herramientas, características óseas y morfológicas, antecedentes hereditarios y epidemiológicos entre muchos otros, y todo cuanto pueda servir de elemento en la identificación.

En el presente trabajo se consideraron estudios previos que pudieran dar mejor idea de la población de antiguos mayas de Chiapas. Las referencias indican una tendencia mayoritaria a un determinado haplogrupo. Los trabajos de González-Oliver et al. (2001), indican que los antiguos mayas de Xcaret están representados por el haplogrupo A en un 84%, Merriwether et al. (1997), por su parte reporta en antiguos pobladores de Copan 89% con haplogrupo C y en estudio de mayas contemporáneos realizado por Torroni et al. (1992) una distribución de 51.9 % en haplogrupo A mientras que 22.2, 14.8 y 7.4 % para los haplogrupos B, C y D respectivamente. En el presente estudio se advirtió un 100 % del haplogrupo A en los antiguos mayas de Bonampak y Palenque.

La tendencia de cierto haplogrupo en una determinada región, sea Chiapas para este caso, puede ser debida diversos fenómenos, quizá valga considerarse en forma hipotética que la marcada presencia en los linajes de antiguos mayas de Bonampak y Palenque sea el resultado de la unidad de grupo en cada uno de ellos como de vínculos de alianzas entre ambos, considerando en ello la disposición geográfica entre uno y otro. La razón sobre cuál o cuáles podrían haber sido los motivos que dieron lugar a las relaciones biológicas entre estas poblaciones es un asunto que no será tocada en este trabajo, considerando que es materia de especialistas en el comportamiento cultural Maya. El aporte que se hace en este trabajo simplemente establece que en antiguos pobladores mayas de Chiapas correspondientes a Bonampak y Palenque no existen diferencias entre los linajes matrilineales de una población a otra, pero que se observa variabilidad con otros grupos geográficamente mas lejanos, tales como antiguos mayas de Xacaet y Copan así como de mayas contemporáneos

La tendencia en los linajes si bien es un tanto incierta dado el número de muestra con que se desarrollaron los estudios previos y actual, parece guarda una relación concordante con los antecedentes arqueológicos y lingüísticos, los cuales establecen que el poblamiento de Mesoamérica por mayas es resultado del asentamiento de grupos independientes. (Schackt J., 2002)

Con lo anterior se considera que el uso de haplogrupos deberá ser un método de análisis aditivo y nunca un método concluyente, a este respecto vale señalar que las elucubraciones generadas sean puestas a considerar junto con otros elementos de referencia.

### **7.5. Análisis filogenético por secuencias de la región hipervariable I.**

Del total de las muestras analizadas se pudo secuenciar la segunda mitad de la región hiperbariable I. Las secuencias obtenidas sólo representan un cuarta parte del total de la región hipervariable que el mtDNA presenta y sólo refieren a los individuos hallados en el sitio arqueológico de Bonampk. Sin embargo, de ellas ha sido posible la búsqueda de linajes emparentados entre los cuales destacan importantes grupos étnicos tales como Chukchees y Tuva del norte de Rusia y Aleutianos de Alaska, todos ellos representantes de las primeras migraciones colonizadoras de América, así mismo

poblaciones emparentadas, según indican sus secuencias, de manera directa con la población maya y otros grupos tales como Tainos de Republica Dominicana, Ngobes de Panama y mas lejanamente ancash del Perú y población de Venezuela

Aún cuando no fue posible la determinación de la secuencia completa de la región hipervariable, la información que ofrece el establecimiento de su haplogrupo permite dilucidar un haplotipo característico de los linajes. De los resultados obtenidos se sabe con certeza que el haplotipo que los identifica está representado por la transición de nucleótidos en las posiciones 16223C →T (16223T), 16290C→T (16290T), 16319G→A (16319A) y 16362T →C (16362C), así mismo que el haplogrupo A resguarda necesariamente la transición en las posiciones 16111C→T (16111T), como resultado se tiene un haplotipo característico de la región hipervariable I en los antiguos mayas de Bonampak que puede apreciarse en la siguiente tabla 21.

**Tabla 21.** Haplotipo característico de pobladores de Bonampak

	1	1	1	1	1
	6	6	6	6	6
	1	2	2	3	3
	1	2	9	1	6
	1	3	0	9	2
<b>Secuencia consenso J01415.2 rCRS2006</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
<b>Mayas de antiguos de Bonampak</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>

Como dato adicional vale mencionar que la transición de nucleótidos en la posición 16111C→T (16111T) es una característica relacionada al haplogrupo A perteneciente a la gran mayoría de nativos amerindios, Aluetianos, Chukotkas (Chukchis y Esquimales siberianos) y de algunos Kamchatkas (Koryaks e Itelmens) que comparten este haplogrupo (Rubicz R., et al. 2003). La presencia del bloque con transición de nucleótidos en las posiciones 16111C→T (16111T); 16223C→T (16223T); 16290C→T (16290T); 16319G→A (16319A) y 16362T→C (16362C), también definido como subtipo A2 de Forster et al. (1996), quienes lo ubican dentro del grupo de Chukotkas (Starikovskaya Y.B.,1998). Estos podrían ser los ancestros directos más

lejanos quienes habrían dado origen a los primeros grupos fundadores de nativos amerindios hace aproximadamente unos  $29,964 \pm 13,350$  años de antigüedad (Rubicz R., et al. 2003). Un aspecto interesante en el análisis filogenético, es la relación que guardan las muestras analizadas con el subtipo A2 de Forster et al. (1996) y que según se aprecia es el mismo en los Mayas de Bonampak, así como de la población de Tainos de Republica Dominicana, Ngobes de Panama, Ancash del Perú y población de Venezuela, con lo cual se aduce que las poblaciones de Centroamérica relacionadas con el haplogrupo A tienen un ancestro común en las poblaciones Chukotkas, no sin considerar la relación con los grupos pertenecientes a las poblaciones Lisu, Dai, Sali, Tu y Mongoles de China como probables poblaciones ancestrales del haplogrupo A aún más antiguas.

En cuanto a las muestras estudiadas, individuos pertenecientes aparentemente a un mismo grupo, se tiene que estas albergan el mismo haplotipo ancestral subtipo A2 según Forster, siendo la adición de una base en dos muestras la única diferencia sustancial que les caracteriza, en consecuencia, se tienen por un lado dos individuos emparentados con el mismo genoma mitocondrial y los dos restantes con diferentes genomas. Para el primero de los casos, no descartando se tratase de miembros de un mismo linaje.

## **7.6. Análisis filogeográfico**

El análisis filogeográfico ofrece otros elementos de juicio para establecer las relaciones filogenéticas entre poblaciones, entre las principales se encuentran las posibles rutas que permiten el contacto entre una población y otra, los recursos a disposición y posibles condiciones ambientales que el entorno resguarda. El presente trabajo sólo se limita a la ubicación geográfica propiamente dicha, la cual permite corroborar investigaciones previas mediante una visualización grafica. La contribución del presente trabajo está en apoyar o cuestionar el origen de los primeros pobladores americanos con miras a un acercamiento sobre las poblaciones ancestrales Mayas y dispersión de la población ya asentada. La falta de datos en poblaciones étnicas ha impedido se tenga certeza acerca del origen de los Mayas de Chipas y sus relaciones biológicas respecto a poblaciones aledañas. Sin embargo, los resultados hacen posible

apoyar la teoría del ingreso temprano vía Beringia, de contingentes humanos al continente americano procedentes de Asia. Por lo menos en lo que toca a la parte septentrional de América.

### **7.7. Validación de resultados.**

La validación de resultados es un asunto fundamental para la generación de datos fidedignos, fue por ello que se procedió a una rigurosa limpieza de las muestras como de la corroboración de los haplogrupos y análisis de las secuencias a fin de no solamente validar el resultado de las muestras estudiadas sino además el método empleado en esta investigación, dando lugar a la exclusión de cualquier posible error generado.

En el caso de los haplogrupos, estos se corroboraron al cotejar la concordancia entre el haplogrupo encontrado y haplotipo de la región hipervariable de la misma muestra, hallando en ellos que no existe diferencia alguna entre uno y otro, por tanto, definiendo que el haplogrupo de la muestra no tiene lugar a duda.

Para el caso de las regiones hipervariables, ensayos en la fidelidad de secuencias por efecto de contaminantes como posibles agentes de cambios nucleotídicos en la amplificación dieron cuenta de que no existe cambio alguno aún cuando una secuencia es obtenida de una muestra con contaminantes inhibidores en cantidad crítica para la amplificación exitosa en PCR, además de un escrutinio riguroso en electroferogramas por herramientas bioinformáticas y corroboración manual de las mismas.

Es importante considerar que los métodos de fidelidad de secuencia sean práctica necesaria, y aún cuando no pudieran realizarse por cada muestra, al menos llevarse a cabo por grupo.

En suma, se tiene que las técnicas empleadas fueron las adecuadas para la obtención de haplogrupos como de secuencias fidedignas.

## VIII. CONCLUSIONES.

### 8.1. Extracción del DNA antiguo, aspectos metodológicos.

El éxito en la obtención del DNA antiguo está determinada por el tipo de muestra, lo que implica antigüedad y factores propios del lugar del hallazgo en los que se destaca, tipo de suelo, humedad, temperatura, consecuentemente contaminantes y actividad microbiana o de agentes biológicos degradantes

La adecuada limpieza de las muestras y métodos que lo corroboren es parte fundamental en los criterios de autenticidad

El éxito en la extracción del DNA puede variar de acuerdo con la cantidad de muestra procesada y variar dependiendo del método de extracción empleado, así como por el tipo de tejido. Muestras momificadas representan material en estado óptimo para la obtención exitosa de DNA antiguo no así material óseo degradado.

El grado o poder inhibitorio de los contaminantes de una muestra debe ser evaluado con DNA moderno, así mismo, el empleo y adecuación en los procesos de eliminación de contaminantes es fundamental para deliberar si una muestra es candidata o no a la extracción de DNA.

La presencia de DNA de alto peso molecular no es criterio para establecer la presencia y calidad del DNA, por lo que debe corroborarse su calidad a través de la amplificación

Procesos de congelamiento y descongelamiento dan lugar a la pérdida gradual en la calidad de DNA

La correlación entre haplogrupos y haplotipos de secuencias parece ser uno de los criterios más útiles en la determinación de contaminación cruzada

Los métodos de fidelidad de secuencia deben ser práctica necesaria, si bien no pudieran ser por muestra, deberán ser por grupo.

La implementación de una técnica adecuada es decisiva en la obtención de resultados exitosos, la implementación de técnicas alternativas debe ser una tarea continua a fin de optimizar métodos previos.

La prioridad en el análisis de DNA antiguo deberá ser la obtención de secuencias de las regiones hipervariables, su información permite dilucidar haplogrupos y establecer vínculos estrechos aún en individuos de una misma población.

El análisis de haplogrupos sólo es un método aditivo para la interpretación de resultados y nunca será concluyente cuando la muestra no es representativa de una población, no por ello el método debe ser eliminado de los análisis de DNA antiguo puesto que en muchos casos será la única fuente de información.

## **8.2. Análisis de haplogrupos.**

Aún cuando el número de muestras analizadas en Palenque como en Bonampak no es representativo de una población, los resultados en sus frecuencias guardan relación con los antecedentes que indican que la población maya está representada por grupos individuales, visto ello desde un punto de vista exclusivamente biológico. Los resultados obtenidos a este respecto son hipotéticos y su corroboración deberá ser motivo de nuevos estudios que permitan desechar o fortalecer esta teoría.

## **8.3. Análisis filogeográfico y de haplotipos de la región hipervariable I.**

Aún cuando sólo analizaron cuatro muestras, todas ellas correspondientes al grupo Frey de Bonampak, se sabe por análisis de sus secuencias que todas ellas pertenecen a un mismo haplotipo correspondiente a un sublinaje del haplogrupo A, que iniciaría en Asia con los ancestros de los grupos de Chukchis y Esquimales siberianos, mientras que en América con los ancestros de las poblaciones Aleutianas de Alaska y Kitimets del Canadá, teniendo como grupos más cercanos a los nativos californianos de Salinan y Chumash. Pese a que se ignore a que grupos dieron origen estos últimos, se puede inferir que los grupos predecesores de estas poblaciones dieron origen a la población maya de Bonampak, aunque no se tienen elementos para precisar el número ni el tiempo de las migraciones se infiere que al llegar a Chiapas, algunos individuos se habrían asentado para posteriormente fundar Bonampak, mientras que otros continuarían su migración hacia el sur hasta Venezuela y dar inicio a la colonización de las islas de Caribe a través de las pequeñas Antillas con asentamiento en República Dominicana para dar lugar a los Tainos, en tanto, otros habrían migrado para generar

los asentamientos de poblaciones Ngobes de Panama y mas lejanamente Ancash del Perú.

Como se habrá podido observar, el análisis de mtDNA en restos antiguos es un método útil como herramienta de apoyo en el estudio de eventos históricos, su aplicación confiere una serie de cuidados que una vez eludidos hacen al análisis del DNA una herramienta poderosa, que bien llevada a cabo permite una mejor integración al conocimiento del hombre y sus sociedades.

# APÉNDICES

## Apéndice I.

### Electroferogramas de Regiones Hipervariables

**Figura 32.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 42. Secuencia sentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:1381 A:2244 T:1977 C:3007

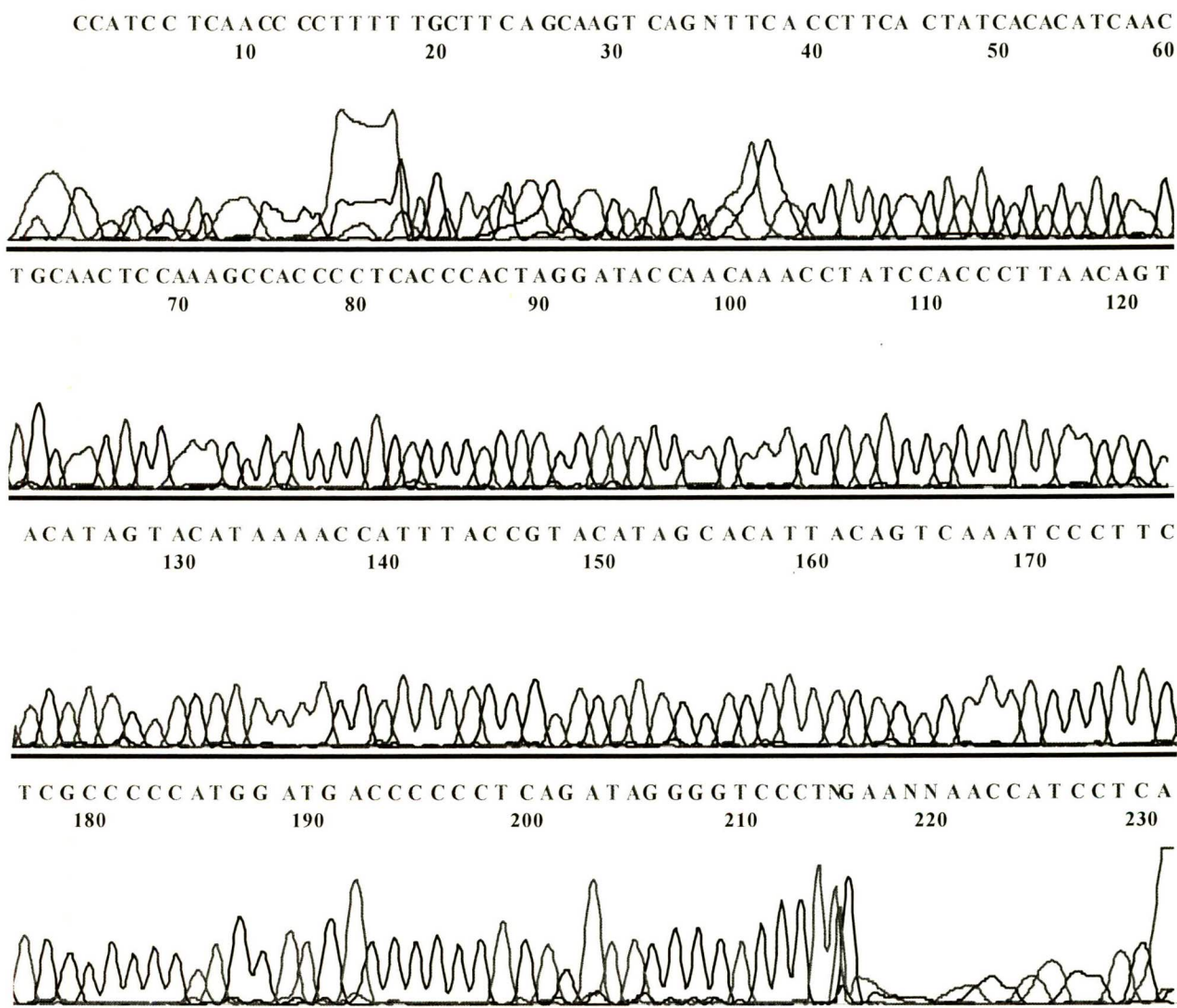
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

BD3 Matrix

1.0.4

Points 1461 to 5000



**Figura 33.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 42. Secuencia antisentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:1140 A:493 T:819 C:551

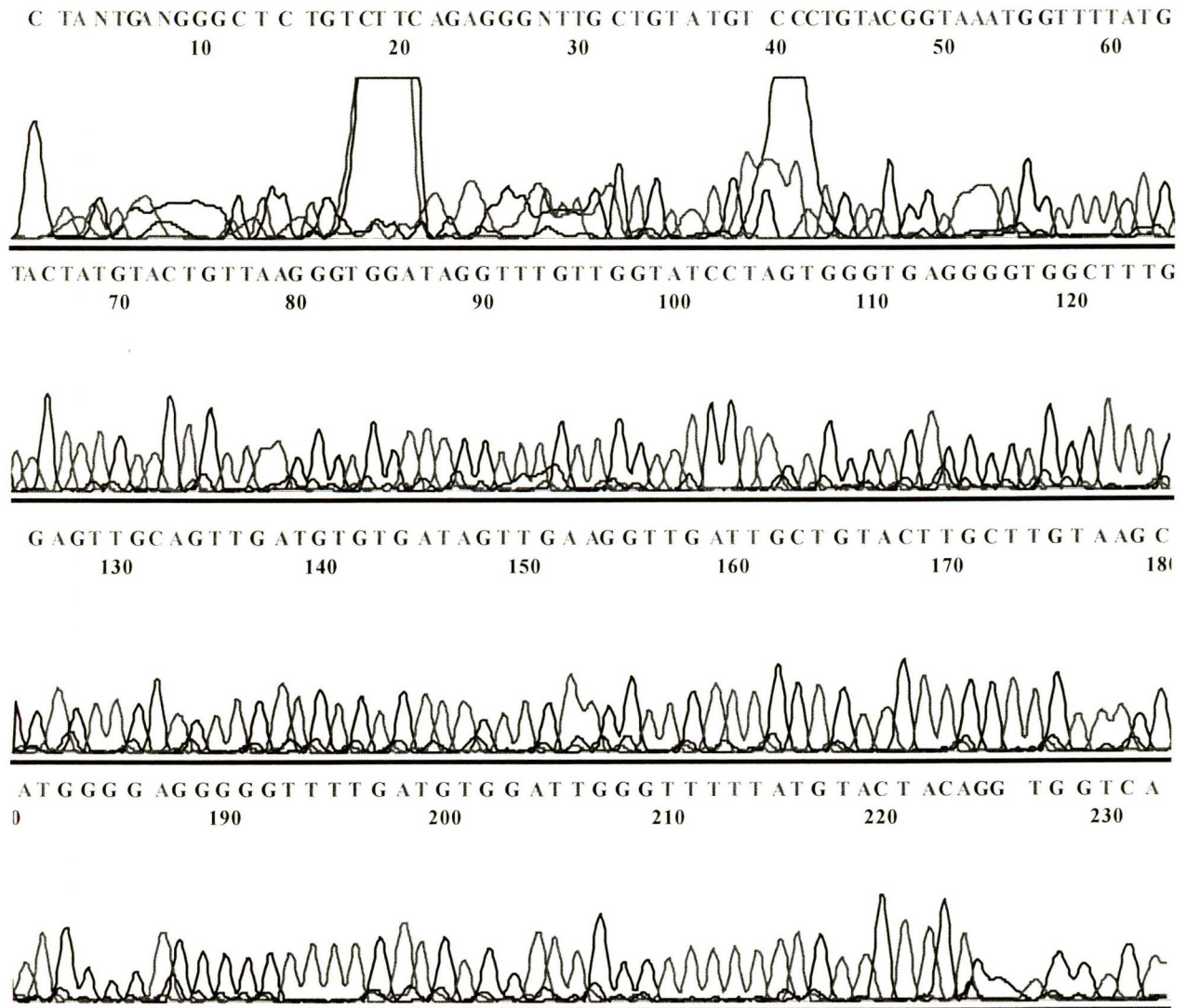
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

BD3 Matrix

1.0.4

Points 1406 to 5000



Muestra 42. Región hipervariable I, segmento B. Secuencia corroborada por complementariedad de secuencias sentido y antisentido.

TACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCCTCCCCATG  
 CTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAA  
 AGCCACCCCTCACCACTAGGATACCAACAAACCTATCCACCCTTAACAGTACATA  
 GTACATAAAACCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGCCCC  
 ATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTTG

**Figura 34.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 43. Secuencia sentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:2022 A:3262 T:2834 C:4253

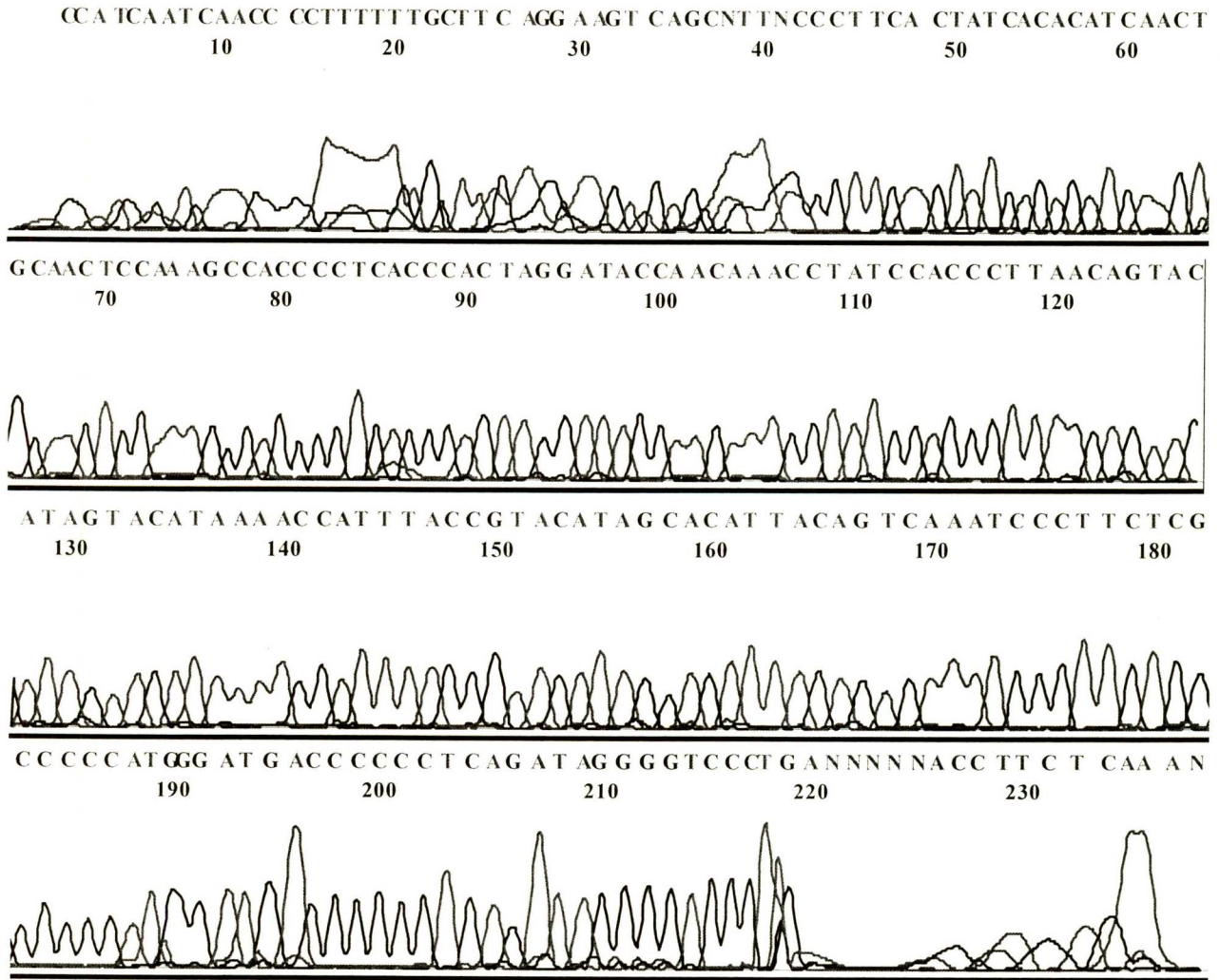
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

BD3 Matrix

1.0.4

Points 1518 to 5200



**Figura 35.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 43. Secuencia antisentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:4233 A:1708 T:2144 C:1275

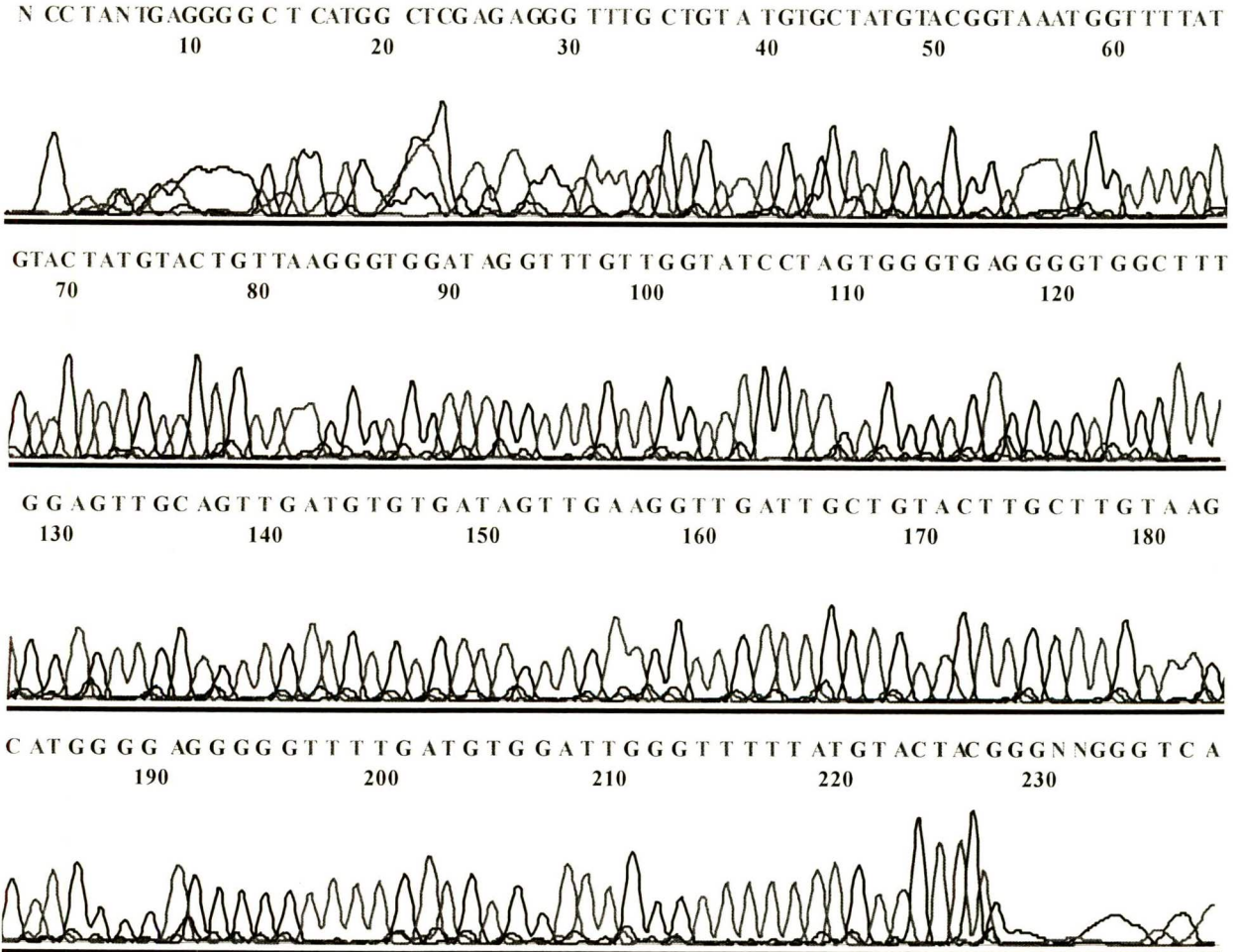
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

BD3 Matrix

1.0.4

Points 1213 to 5200



Muestra 43. Región hipervariable I, segmento B. Secuencia corroborada por complementariedad de secuencias sentido y antisentido

ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCCTCCCCATGCTTACAAGC  
AAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCC  
TCACCCACTAGGATACCAACAAACCTATCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAA  
CCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGCCCCCATGGGATGA  
CCCCCTCAGATAGGGGTCCCT

**Figura 36.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 44. Secuencia sentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:876 A:1373 T:1231 C:2005

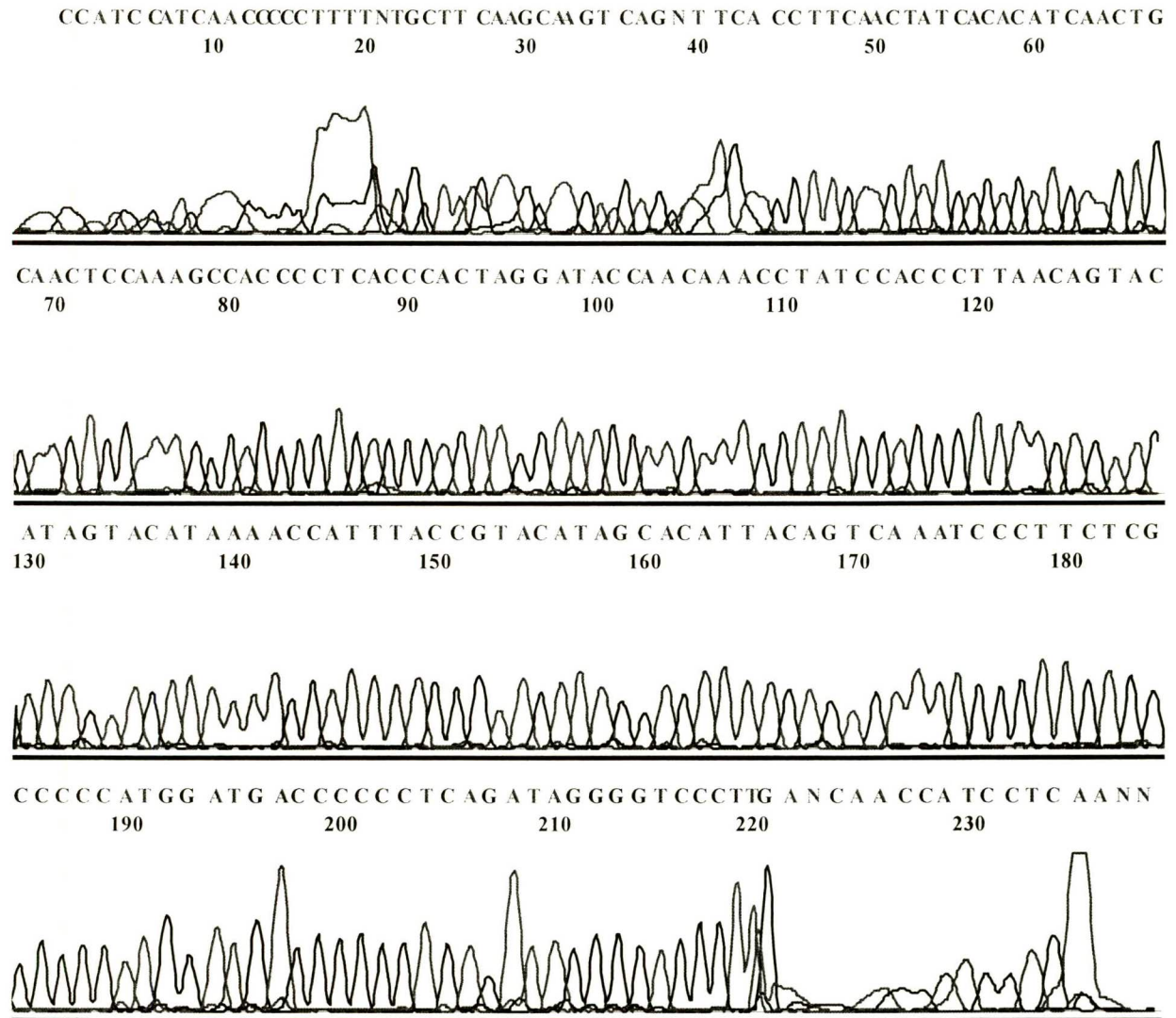
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

BD3 Matrix

1.0.4

Points 1497 to 4440



**Figura 37.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 44. Secuencia antisentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:926 A:448 T:787 C:573

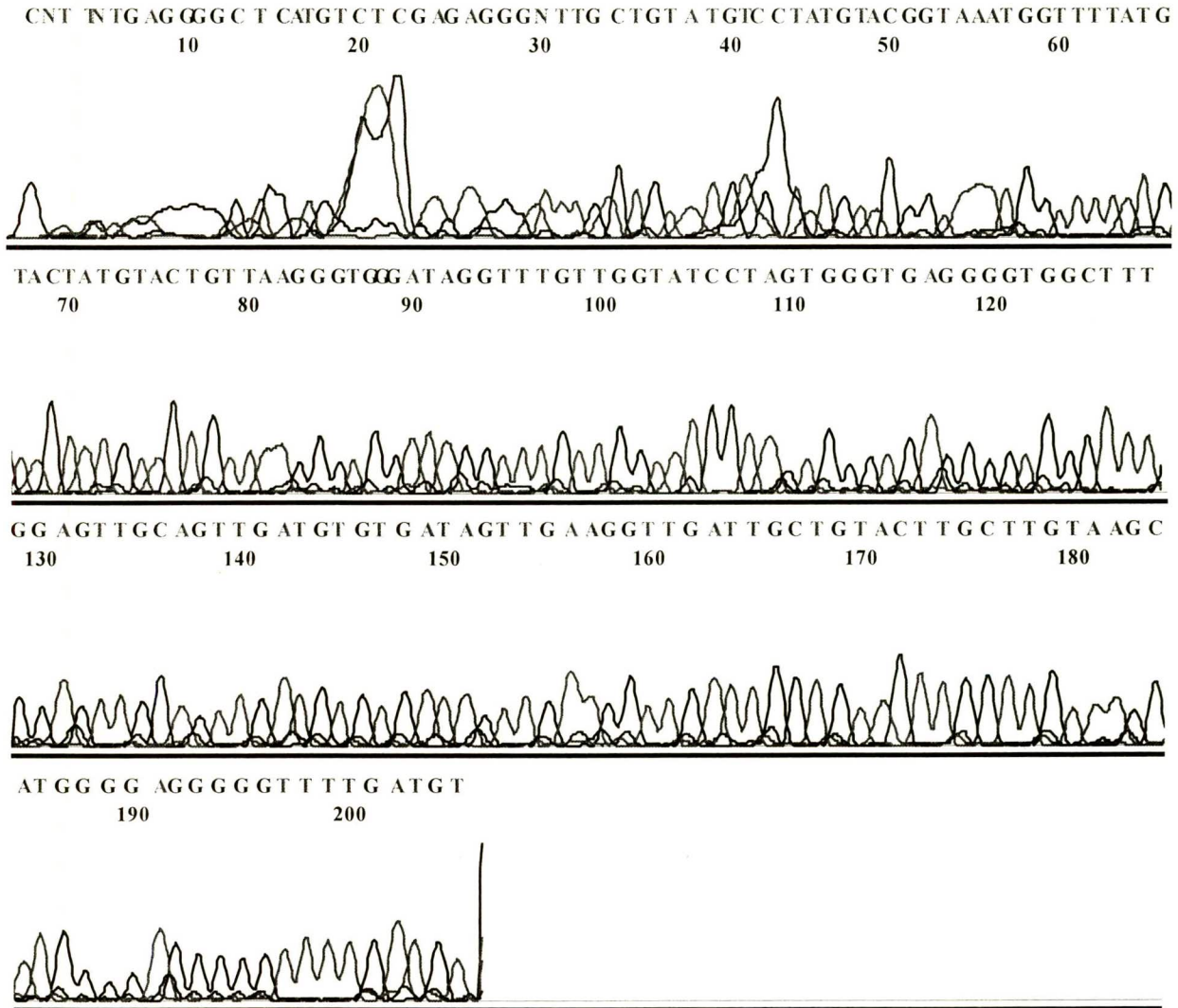
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

BD3 Matrix

1.0.4

Points 1356 to 4440



Muestra 44. Región hipervariable I, segmento B. Secuencia corroborada por complementariedad de secuencias sentido y antisentido.

TACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCCTCCCCATG  
CTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAA  
AGCCACCCCTCACCACTAGGATACCAACAAACCTATCCACCCTTAACAGTACATA  
GTACATAAAACCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGCCCCC  
ATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCC

**Figura 38.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 45. Secuencia sentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:1151 A:1897 T:1703 C:2647

DT310POP6{BDv3}v1.mob

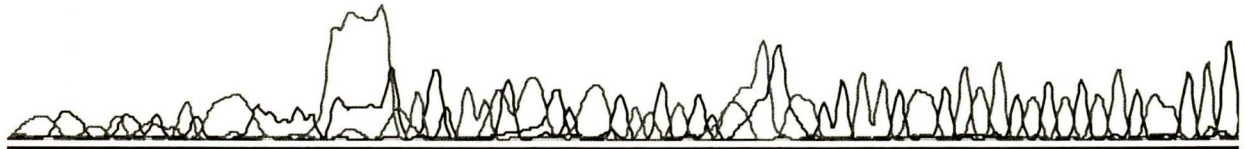
ABI-CE1

BD3 Matrix

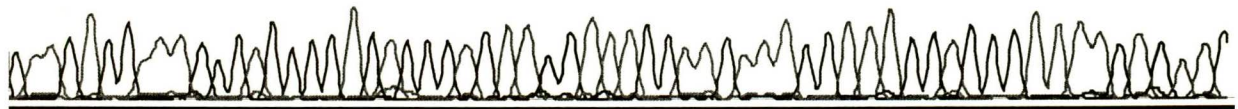
1.0.4

Points 1374 to 4440

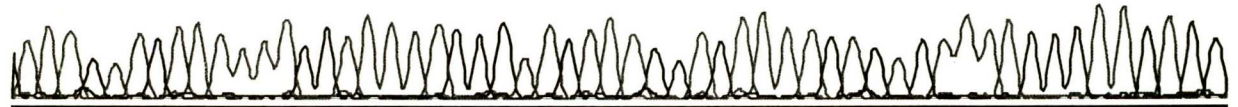
CCATCCATCAACCCCCTTTTNTGCTT CAAGCAAGT CAGNT TCA CCTTCAACTATCACACATCAACTG  
10 20 30 40 50 60



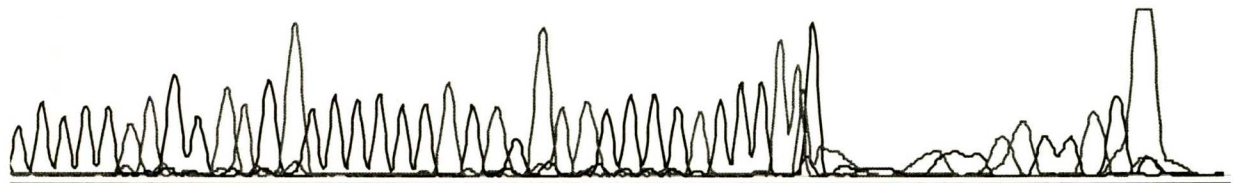
CAACTCCAAAGCCAC CCCTCACCCACTAGG ATACCAACAAACCTATCCAC CCTTAACAGTAC  
70 80 90 100 110 120



ATAGTACATAAAACCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCA AATCCCTTCTCG  
130 140 150 160 170 180



CCCCATGG ATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTIGANCAACCATCCTCAANN  
190 200 210 220 230



**Figura 39.** Electroferogramas de la región hipervariable I, segmento B de la Muestra 45. Secuencia antisentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:3002 A:1137 T:1696 C:1016

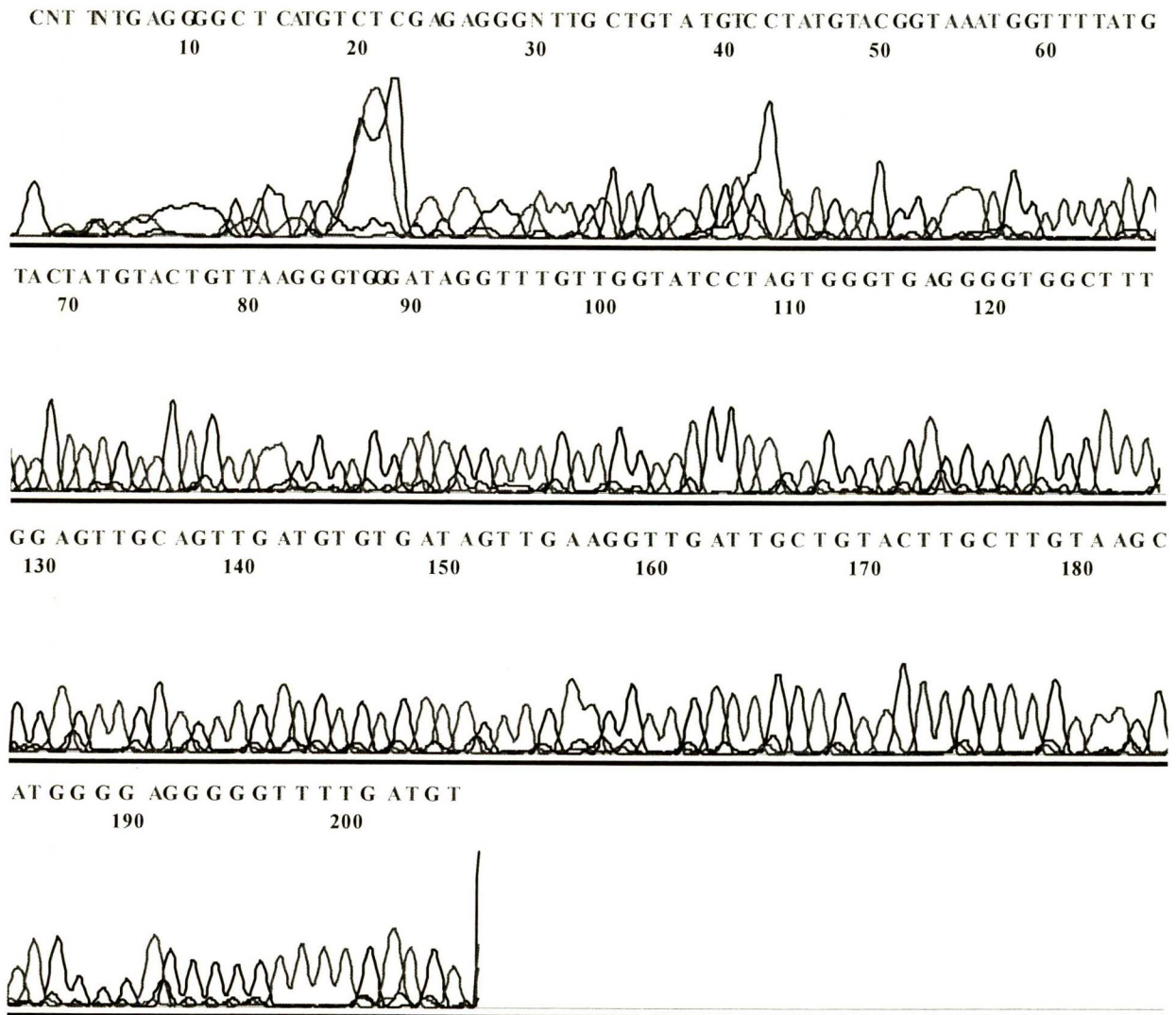
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

BD3 Matrix

1.0.4

Points 1460 to 4080



Muestra 45. Región hipervariable I, segmento B. Secuencia corroborada por complementariedad de secuencias sentido y antisentido.

AGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAACCCCCTCCCCATGCTTACAAGCAAGTAC  
 AGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACCCCTCACC  
 CACTAGGATACCAACAAACCTATCCCACCCCTAACAGTACATAGTACATAAAACCAT  
 TTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGCCCCCATGGATGACCCCC  
 CTCAGATAGGGGTCCCTTGA

**Figura 40.** Electroferogramas de la región hipervariable I completa de una Muestra Control. Secuencia sentido

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:1585 A:1823 T:1896 C:2576

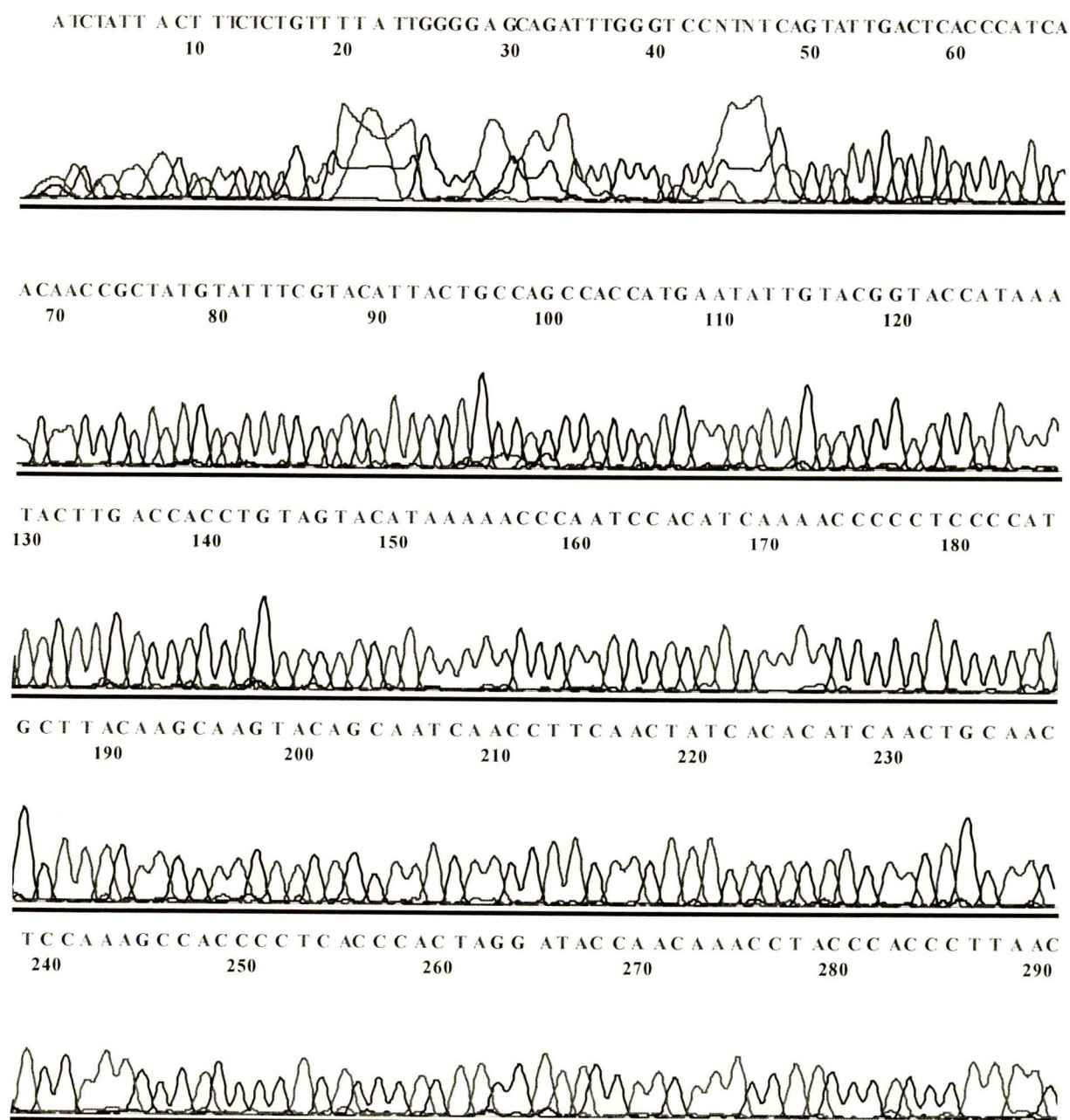
DT310POP6{BDv3}v1.mob

ABI-CE1

dRhod4

1.0.4

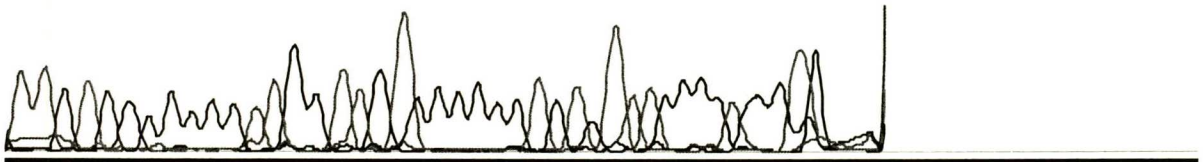
Points 1252 to 5960



AG TACATAGTACATAAAGCCATTACACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCC  
300 310 320 330 340



TTC TCGCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCTGNN  
350 360 370 380



**Figura 41.** Electroferogramas de la región hipervariable I completa de una Muestra Control. Secuencia antisentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:3326 A:1407 T:2179 C:1278

DT310POP6{BDv3}v1.mob

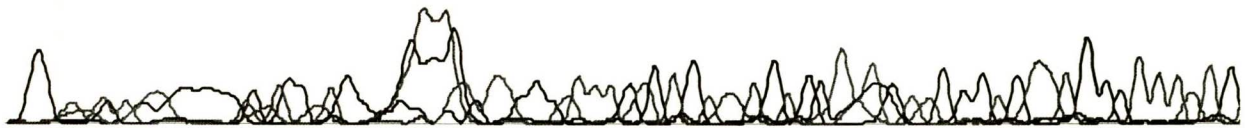
ABI-CE1

dRhod4

1.0.4

Points 1326 to 5760

NTGAGGGGCTCTCTGGNCTTNGAGGGTTTGCTGTAATGTC TANGTACGGTGAATGGCTTTATG  
10 20 30 40 50 60



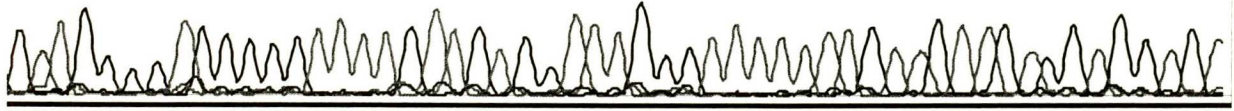
TACTATGTACTGTTAAGGGTGGGTAGGTTTGTGGTATCCTAGTGGGTGAGGGGTGGCTTT  
70 80 90 100 110 120



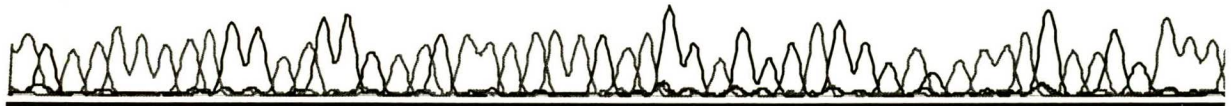
GGAGTTGCAGTTGATGTGTGATAGTTGAAGGTTGATTGCTGTACTTGGCTTGTAAAG  
130 140 150 160 170



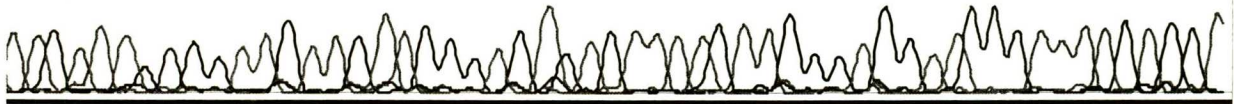
CATGGGGAGGGGTTTTGATGTGGATTGGGTTTTTATGTACTACAGGTGGTCA  
180 190 200 210 220 230



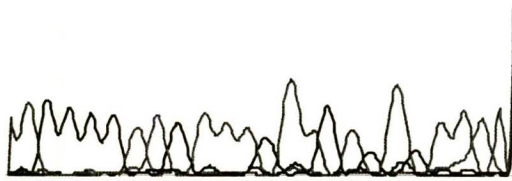
AGTATTTATGGTACCGTACAATATTCATGGTGGCTGGCAGTAATGTACGAAA  
240 250 260 270 280



TACATAGCGTTGTGATGGTGAGTCAATACTTGGGTGGGTACCCAAATCTGCT  
290 300 310 320 330



TCCCCATGAAAGAACAGAGATA  
340 350



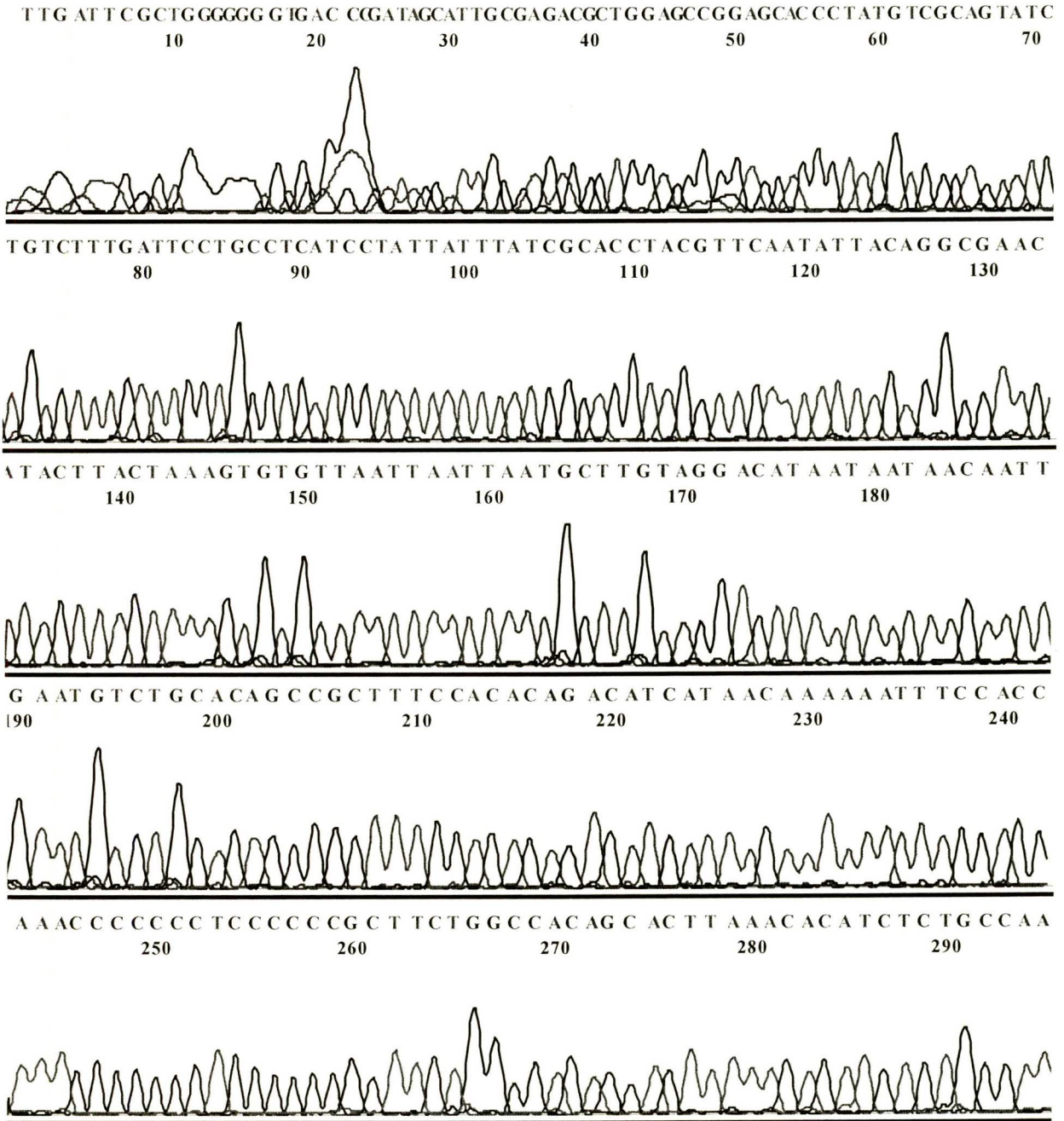
Muestra Control. Región hipervariable I completa. Secuencia corroborada por complementariedad de secuencias sentido y antisentido respectivas.

TATTCTCTGTTCTTTCATGGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCAC  
CCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTAC  
GGTACCATAAATACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAAAC  
CCCTCCCATGCTTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAAC  
TGCAACTCAAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTT  
AACAGTACATAGTACATAAAGCCATTCACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCC  
TTCTCGCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCC

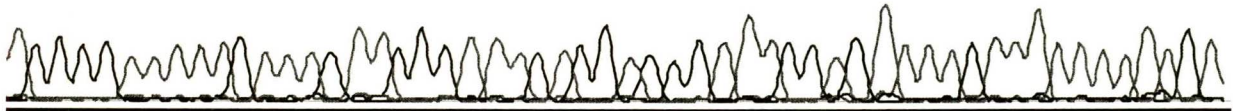
**Figura 42.** Electroferogramas de la región hipervariable II completa de una Muestra Control. Secuencia sentido

ABI-CE1  
1.0.4

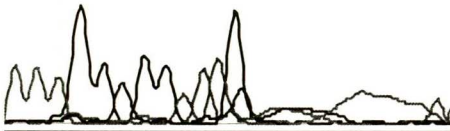
Signal G:644 A:628 T:800 C:785  
DT310POP6{BDv3}v1.mob  
dRhod4  
Points 1353 to 5760



ACC C C A A A A A C A A A G A A C C C T A A C A C C A G C C T A A C C A G A T T T C A A A T T T T A T C T  
300 310 320 330 340



T T T G G C G G T A T G N A C C T T T T T A  
150 360 370



**Figura 43.** Electroferogramas de la región hipervariable II completa de una Muestra Control. Secuencia antisentido.

BioEdit version 7.0.5.3 (10/28/05)

Signal G:737 A:415 T:496 C:371

DT310POP6{BDv3}v1.mob

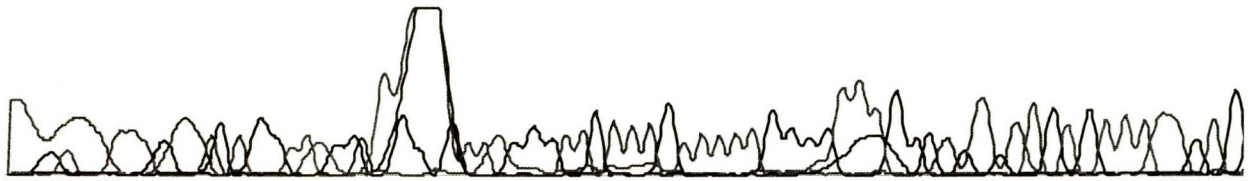
ABI-CE1

dRhod4

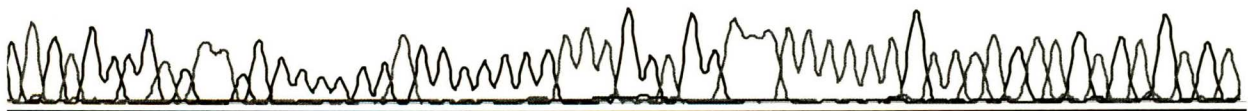
1.0.4

Points 1364 to 5760

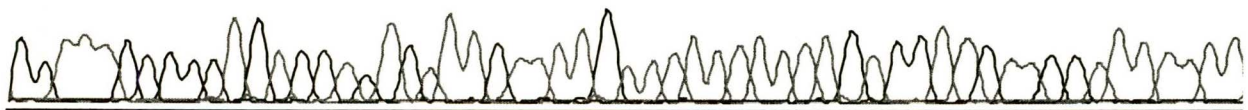
T T T G A A C T G G T A G N T C N N T T A G G G T T C T T T G T T T T T G G G G T T T G G C A G A G A T G T G T T T A A G T G  
10 20 30 40 50 60



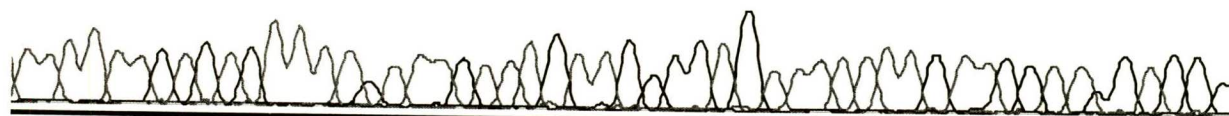
C T G T G G C C A G A A G C G G G G G G A G G G G G G T T T G G T G G A A A T T T T T T G T T A T G A T G T C T G T G T  
70 80 90 100 110 120



G G A A A G C G G C T G T G C A G A C A T T C A A T T G T T A T T A T T A T G T C C T A C A A G C A T T A A T T  
130 140 150 160 170 180



A A T T A A C A C A C T T T A G T A A G T A T G T T C G C C T G T A A T A T T G A A C G T A G G T G C G  
190 200 210 220 230



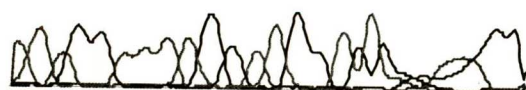
A T A A A T A A T A G G A T G A G G C A G G A A T C A A A G A C A G A T A C T G C G A C A T A G G G T  
240 250 260 270 280



G C T C C G G C T C C A G C G T C T C G C A A T G C T A T C G C G T G C A C A C C C C C A G A C G A A A  
290 300 310 320 330



A T C C A A T G C A T G G A A G G C T T C C  
340 350 360



Muestra Control. Región hipervariable II completa. Secuencia corroborada por complementariedad de secuencias sentido y antisentido respectivas.

AGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTGGGGGGTGTGCACGCGATAGCATTGCG  
AGACGCTGGAGCCGGAGCACCCCTATGTGCGAGTATCTGTCTTTGATTCTGCCTCA  
TCCTATTATTTATCGCACCTACGTTCAATATTACAGGCGAACATACTTACTAAAGTGT  
GTTAATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAATGTCTGCACAGCCG  
CTTCCACACAGACATCATAACAAAAATTTCCACCAAACCCCCCTCCCCCGCTT  
CTGGCCACAGCACTTAAACACATCTCTGCCAAACCCCAAAAACAAGAACCCTAAC  
ACCAGCCTAACAGATTTCAAATTTTATCTTTTGGCGGTATG

## **Apéndice II.**

### **Medidas de bioseguridad**

Algunos reactivos utilizados en los procedimientos y/o prácticas relacionadas al análisis de DNA tienen la característica de ser tóxicos, irritantes, corrosivos, cancerígenos, mutagénicos y neurotóxicos, por lo tanto el investigador siempre deberá usar guantes, mascarillas, lentes protectores y mandil para evitar un contacto directo o accidental con ellos.

La luz ultravioleta (UV) empleada para la visualización de ADN a 385 nm de longitud de onda con 8 W de potencia ocasiona graves daños oculares y epiteliales, por lo tanto, el investigador deberá contar con una lámina de policarbonato transparente ubicada entre la lámpara y el punto de observación. Además, deberá usar lentes de protección contra rayos UV del mismo material.

El voltaje utilizado para la electroforesis puede generar quemaduras por descarga eléctrica. Aunque la mayoría de cámaras de electroforesis han sido diseñadas para evitar el contacto directo con la electricidad, el operador deberá asegurarse de mantener la fuente poder apagada o desconectada al momento de manipular el equipo.

El proceso de ebullición durante la extracción de DNA con Chelex en baño maría a 100°C deberá realizarse con extremo cuidado para evitar quemaduras. En este sentido, se recomienda utilizar envases de vidrio resistentes a altas temperaturas (por ejemplo: Pyrex) y gradillas flotantes de polipropileno para colocar los viales

### **Manejo de muestras y reactivos en biología molecular**

El investigador deberá usar guantes de látex mientras se encuentre trabajando con ADN. Este paso ayudará a evitar la degradación del DNA por acción de las nucleasas presentes en la superficie de las manos. Asimismo, el uso de guantes evitará que quien trabaja se exponga ante algún posible riesgo de intoxicación por contacto accidental con cualquier material potencialmente dañino.

El material biológico debe ser conservado a bajas temperaturas. El DNA extraído debe ser repartido en alícuotas y en volúmenes pequeños para evitar etapas de congelamiento descongelamiento continuo que ocasionarían un eventual deterioro del

DNA. Las alícuotas en uso tanto de DNA genómico como de productos amplificados pueden ser almacenadas a 4°C, mientras que las alícuotas restantes que no sean usadas por periodos largos serán almacenadas a -20°C. Las muestras óseas y/o momificadas sin procesar serán almacenadas a -70°C.

Debido a la importancia que tiene la medición de volúmenes en los procedimientos de electroforesis, se sugiere que los insumos destinados para tal fin, como las micropipetas, puntas de 10, 20, 200 y 1000 µl, viales de 0,5 y 1,5, tubos de 15, 50 y 250 ml y los equipos de laboratorio, cuenten con un certificado que acredite la calidad del producto.

Se recomienda que las puntas que se insertan en las micropipetas y que tienen contacto directo con DNA cuenten preferentemente con filtro, sean nuevas y estériles, a fin de evitar una posible contaminación cruzada. Es importante señalar que es posible trabajar con puntas previamente usadas, siempre y cuando estén libres de restos orgánicos y hayan sido previamente esterilizadas en autoclave (121°C a 1,5 psi), sin embargo, su uso sólo estará confinado a prácticas que involucran productos amplificados, nunca DNA genómico extraído.

Los reactivos a usarse durante los procesos de extracción y purificación de DNA deben tener grado "biología molecular" para asegurar el éxito del procedimiento. El uso combinado de reactivos de diferente grado de pureza puede llevar a un fracaso del experimento.

### **Productos químicos de uso.**

#### **Acetato amonio, 10M**

Disolver 385.4 g de acetato de amonio en 150 ml de agua destilada. Aforar a 500 ml con agua destilada.

#### **Acetato de sodio, 3M**

Disolver 408 g de acetato de sodio 3H<sub>2</sub>O en agua destilada. Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético 3 M. Aforar con agua destilada a 1 L.

### **Acetato de sodio 1 M, pH 5.2 (100 ml)**

Disolver 13.6 g de acetato de sodio trihidratado en 80 ml de agua destilada o desionizada. Ajustar el pH a 5.2 adicionando ácido acético glacial (aproximadamente 2 ml). Ajustar el volumen final a 100 ml. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Agarosa al 1%, 1.5% y 2%**

Disolver 1 g, 1.5 g ó 2 g de agarosa en 98 ml de agua bidestilada. Adicionar a la solución 2 ml de TAE 50X, homogeneizar y disolver la agarosa en horno microondas o en baño María. Asegurarse que todas las partículas de agarosa se fundan completamente, para facilitar los fragmentos del ADN durante el corrimiento se puede adicionar bromuro de etidio a una concentración de 0.5 ml/ ml en el gel.

### **Albúmina sérica bovina (SBA)**

La concentración de SBA se determina con una absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) igual a 6.6 densidades opticas (O.D.6.6) para una solución de 10 mg/ml de albúmina sérica bovina medida en una celda de 1 cm. (ejemplo, una solución de 0.5 mg/ml debe tener una  $A_{280} = 0.33$ ).

### **Amortiguador de carga para electroforésis (loading solution)**

0.25% azul de bromofenol; 0.25% de xilencianol; 30% p/v glicerol; 10 ml de EDTA 25 mM. Adicionar 3 g. de glicerol a una probeta. Llevar a 9.5 ml. con agua destilada. Adicionar 0.5 ml. de 0.5 M EDTA. Disolver 25 mg. de azul de bromofenol y 25 mg. de xilencianol en solución. Almacenar de 2 a 8°C.

### **Amortiguador de lisis**

Tris-HCl 10 mM pH 8.1; EDTA 0.1 M pH 8; SDS al 5%. Proteinasa K en concentración de 10mg/ml. La proteinasa K es lábil y debe usarse fresca para cada uso.

### **Amortiguador de lisis**

Isotiocianato de guanidina 6 M pH 8.1; Citrato de sodio 0.1 M; Sarcosil 1%; Beta mercapto-etanol 100 mM

### **Amortiguador de electroforésis stock TRIS-acetato (TAE) 50X**

Preparar:

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Concentración final</b>
Tris base	242 g	1.9 M
Ácido acético glacial	571 ml	57.1%
EDTA 0.5M pH8.0	100 ml	0.05 M

Completar con 1 L de agua bidestilada

### **Amortiguador de reacción para PCR, 10X**

KCl 500 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 8.4 y MgCl<sub>2</sub> 15 mM.

### **Amortiguador TE**

Tris-HCl 10 mM; EDTA 0.1mM, pH 8.0 (1L). Mezclar 10 ml de Tris-HCl, pH 8, 0.2 ml. de EDTA 0.5 M y 990 ml. de agua destilada o desionizada. Fraccionar en frascos de 100 ml. y esterilice con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Azul de bromofenol, solución**

20 ml de glicerol; 4 mg de Azul de bromofenol. Aforar a 100 ml con agua destilada. Cuando la solución se encuentra saturada, algunos sólidos de azul de bromofenol se hacen visibles.

### **Solución “stock” de bromuro de etidio (10 mg/ml)**

Pesar 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua bidestilada. Forrar el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

### **Bromuro de etidio 1 mg/ml (100 ml)**

Utilizar guantes y mascarilla cuando lo pese. Adicionar 0.1 g de bromuro de etidio a 100 ml de agua destilada o desionizada. Agitar sobre un agitador magnético por varias horas para disolver el colorante. Cubrir el contenedor con papel aluminio o transferirlo a un bote ámbar. Almacenar de 2-8°C.

### **Solución de trabajo de bromuro de etidio (1 µg/ml)**

Diluir 100 µL de bromuro de etidio a partir de la solución "stock" en 100 ml de agua bidestilada. Cubrir el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

**PRECAUCIÓN: El bromuro de etidio es un mutágeno potencial, cancerígeno y moderadamente tóxico, manéjelo con sumo cuidado.**

### **Ditiotreitol (DTT) 1M**

Disolver 15.45 g de DTT en 100 ml de agua. Almacenar a -20 ° C.

### **DTT 1M, acetato de sodio 10mm, ph 5.2 (5ml)**

Disolver 0.77 g de DTT en 5 ml de agua destilada o desionizada estéril. Adicionar 50 l de acetato de sodio 1 M. La solución debe ser esterilizada por filtración. NO ESTERILIZAR. Fraccionar (se recomiendan fracciones de 1 ml) y almacenar a -20°C.

### **Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 0.5M**

Disolver 186.1 g de disódico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en 700 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 10 M (aproximadamente 50 ml). Aforar con  $\text{H}_2\text{O}$  a 1 L.

### **EDTA 0.5M, pH 8.0 (1L)**

Lentamente adicionar 186.1 g de EDTA  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 800 ml de agua destilada o desionizada. Agitar vigorosamente sobre un agitador magnético. Ajuste el pH a 8.0 adicionando NaOH en lentejas (aproximadamente 20 g). NOTA: El EDTA no

se disolverá si no se ajusta el pH. Afore a 1 L con agua destilada y desionizada. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Fenol-cloroformo**

**PRECAUCIÓN: El fenol puede causar severas quemaduras. Deben usarse lentes y guantes para trabajar con el fenol-cloroformo. Si las soluciones de fenol se ponen en contacto con la piel o los ojos, lave inmediatamente con grandes cantidades de agua. No lave con etanol.**

Puede utilizarse fenol comercial líquido sin redestilación si el fenol está incoloro. El fenol cristalino o incoloro que se encuentra amarillo o rosado debe ser redestilado antes de usarse. El fenol licuado o redestilado debe ser almacenado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas hasta que se requiera. El fenol cristalino puede ser usado si los cristales son blancos y el fenol se lava como se describe a continuación.

Remover alícuotas de fenol del congelador en la medida que se requieran y permita que adquieran la temperatura ambiente. Licuar colocando en baño de agua a  $68^{\circ}\text{C}$ . Alternativamente, licuar el fenol cristalino mezclando con volúmenes iguales de Tris-HCl 1.0 M, pH 8 y sumergir el contenedor en un baño de agua  $68^{\circ}\text{C}$ . Extraiga el fenol licuado varias veces adicionando un volumen igual de Tris-HCl 1.0 M, pH 8.0. Descartar la fase superior en contenedores de desechos orgánicos. Repetir el procedimiento de extracción hasta que el pH de la fase acuosa esté entre 7.0 y 8.0.

Después de la extracción final, adicionar un volumen igual de amortiguador TE. Almacenar el fenol por no más de 3 meses de 2 a  $8^{\circ}\text{C}$ , proteger de la luz.

### **MgCl<sub>2</sub> 1M**

20.3 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O a 100 ml, NaCl 5 M (1L). Disolver 292.2 g de NaCl en 800 ml de agua destilada o desionizada. Ajuste el volumen final a 1 L. Esterilice con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

### **NaOH 10M, 10 N (1L)**

**PRECAUCIÓN: el hidróxido de sodio es cáustico. Esta reacción genera calor.**

Lentamente disolver 400 g de lentejas de NaOH en 800 ml de agua destilada o

desionizada. Enfriar a temperatura ambiente. Ajuste el volumen a 1 L. Almacenar a temperatura ambiente.

#### **n-butanol, saturado con agua (150 ml)**

Adicionar 100 ml de agua destilada o desionizada en 100 ml de n-butanol en un frasco de cierre hermético. Tapar y mezclar agitando vigorosamente. Después de que las fases se separen, descarte la fase inferior. El n-butanol se encuentra en la fase superior. Almacenar a temperatura ambiente.

#### **Proteinasa K 10 mg/ml (10 ml)**

Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 ml de agua destilada o desionizada. Fraccione la solución (0.5 ml recomendado) y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Dodecil sulfato de sodio SDS 20 % (1 L)**

Lentamente disolver 200 g de SDS grado electroforésis (ultrapuro) en 800 ml de agua destilada o desionizada. Para facilitar la disolución, la solución debe ser calentada. Ajustar el volumen a 1 L y almacenar a temperatura ambiente.

**PRECAUCIÓN:** Utilizar mascarilla protectora cuando pese el SDS.

#### **Tris-HCl, pH 8.0 (1L)**

Disolver 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua destilada o desionizada. Ajuste el pH a 8.0 a temperatura ambiente agregando HCl concentrado (aproximadamente. 45 ml)

**NOTA:** Muchos tipos de electrodos no miden exactamente el pH del amortiguador Tris; asegurándose de obtener los electrodos adecuados para el ajuste del pH del amortiguador Tris, ajustar el volumen final a 1 L con agua destilada o desionizada. Esterilizar con autoclave. Almacenar a temperatura ambiente.

## Reactivos y suministros utilizados en el Laboratorio.

### Químicos, Enzimas

Acetato de amonio, Merker, No. de Lot. 2280199659  
Acetato de sodio, Sigma, No de Lot. 31H-014616  
Ácido acético glacial, J.T.Baker, No de Lot. C02C57  
Agarosa D-1 low EEO, Pronadisa, No de Lot. H080970  
Alcohol isoamílico, Productos Químicos Monterrey, No de Lot. 015337  
*Alu I*, Invitrogen, No. de Lot. 130116  
Azul de bromofenol, Bio-Rad, No. de Lot. 133538A  
Chelex100, Bio-Rad, No. de Lot. 53824A  
Cloroformo, J.T Baker, No. de Lot. 67-66-3  
Cloruro de magnesio, J.T Baker, No. de Lot. M27C11  
Cloruro de potasio, J.T Baker, No. de Lot. H42336  
*Dnasa I*, BMG Labtech, No. de Lot. 83550720  
dNTPs, Invitrogen, No. de Lot. 1152062  
E.D.T.A. dihidratado, Sigma, No. de Lot. 33H1160  
Etanol absoluto, Merck, No. de Lot. 30126  
Fenol, Invitrogen, No de Lot. 1251674  
GeneClean III, Q-Biogene, No. de Lot. 1001-600-75948  
Glicerol, J.T Baker, No. de Lot. T33652  
*Hae III*, Invitrogen, No. de Lot. 105856  
Hidroxido de sodio, Mercker, No. de Lot. 4031406498  
*Hinc II*, Invitrogen, No. de Lot. 130420  
Isotiocianato de guanidina, Gibco BRL, No de Lot. 110698J  
Marcador de peso molecular 100 pb, Roche, No de Lot. 11448820  
Proteinasa K, BMG Labtech, No. de Lot. 73421535-55  
QIAquick, QAIgen No. de Lot. 28706  
Tris base, J.T Baker, No. de Lot. 132424223  
Xilen-cianol, Sigma, No. de Lot. 62H3628

## **Suministros**

**(que pueden ser abastecidos por cualquier laboratorios de productos científicos)**

Abridor de tubos de microcentrífugas

Bolsas y envolturas para las muestras

Bulbos para pipetas

Contenedores para RPBI

Cubre bocas

Gradillas para tubos de microcentrífugas

Guantes desechables de latex

Marcadores de tinta indeleble

Matraces de 10 ml a 1 l

Matraces de 50 ml a 2 L

Matraces de filtración de 2 L

Navajas de bisturí

Papel aluminio

Papel filtro

Parafilm

Pinzas

Pipetas de plástico estériles desechables

Pipetas pasteur

Probetas graduadas

Puntas para micropipetas

Tijeras

Toallas absorbentes

Tubos para microcentrífuga

## BIBLIOGRAFÍA.

- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. and Walker, J. E. (1994).** Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370 (6491):621-628.
- Allen J.F. (1996).** Separate sexes and the mitochondrial theory of ageing. *J. Theor. Biol.* 180: 135-140.
- Anderson, S., Bankier A.T., Barrell B.G., Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R. and Young I.G., (1981).** Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290: 457-464.
- Ankel-Simons, F. and Cummins J.M., (1996).** Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories on human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (24): 13859-13863.
- Aramoni C.D., (1991).** Los indios constructores de Palenque en un documento del siglo XVIII. *Estudios de Cultura Maya* 18: 417-438.
- Ashley, M.V., Laipis P.J. and Hauswirth W.W., (1989).** Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 17 (18): 7325-7331.
- Aveni A. y Horst H., (1997).** Algunas consideraciones sobre la disposición de los edificios de Palenque. En *Mesas redondas de Palenque. Antología:* 85-92. México: INAH, CONACULTA.
- Baer P. y Baer M.E., (1969).** The discovery of Bonampak: the Lacandone view. *Tlalocan* 6(1): 63-67.
- Bailliet G., Rothhammer F., Carnese F., Bravi C. and Bianchi N. O. (1994).** Founder mitochondrial haplogroups in Amerindian populations. *American Journal of Human Genetics* 55: 27-33.
- Ballard J.W.O. and Whitlock M.C., (2004).** The incomplete natural history of mitochondria *Molecular Ecology.* 13, 729–744.
- Bantsev V. and Sivak J.G., (2005).** Confocal laser scanning microscopy imaging of dynamic TMRE movement in the mitochondria of epithelial and superficial cortical fiber cells of bovine lenses. *Molecular Vision,* 11:518-23

- Barrière P. and Malthièry Y. (2001)**, Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human ovocytes, *Molecular Human Reproduction* Vol.7, No.5 pp. 425–429,
- Bastarrachea, J.R., (1994)**. Mayas de la península de Yucatán. Sint. Ma. Cristina Saldaña., INI - SEDESOL., México.
- Bateman I. G., Richard O., Funk V.A., Rich M., Kress J, and Cannell P. (1990)**. The Feasibility of Reconciling Human Phylogeny and Linguistic History." *Current Anthropology* 31 1-24, 177-183, 315-316.
- Beals, R. y Hoiger, H., (1971)**. Introducción a la antropología. Madrid: Aguilar,S.A.,
- Bendall K.E., Macaulay V.A., Baker J.R. and Sykes B.C., (1996)**. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1276-1287.
- Bermisheva M.A., Kutuev I.A., Korshunova T.Y., Dubova N.A., Villems R., and Khusnutdinova E.K. (2004)**. Phylogeographic Analysis of Mitochondrial DNA in the Nogays: A Strong Mixture of Maternal Lineages from Eastern and Western Eurasia., *Molecular Biology*, Vol. 38, No. 4, pp. 516–523. Translated from *Molekulyarnaya Biologiya*, Vol. 38, No. 4, 2004, pp. 617–624.
- Bermisheva M.A., Tambets K., Villems R., and E. Khusnutdinova K., (2002)**. Diversity of Mitochondrial DNA Haplogroups in Ethnic Populations of the Volga–Ural Region., *Molecular Biology*, Vol. 36, No. 6, 2002, pp. 802–812. Translated from *Molekulyarnaya Biologiya*, Vol. 36, No. 6, pp. 990–1001.
- Birdsell J.B., (1972)**. *Human Evolution*, Rand McNally, Chicago
- Bogenhagen D.F., (1999)**. Repair of mtDNA in vertebrates. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1276-1281.
- Bolnick D.A.W. and Smith D.G., (2003)**. Unexpected Patterns of Mitochondrial DNA Variation Among Native Americans From the Southeastern United States. *American Journal of Physical Anthropology* 122:336–354.
- Bonatto S.L. and Salzano F.M., (1997)**. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data., *Proc. Natl. Acad. Sci*, Vol. 94, pp. 1866–1871.

- Bonatto S.L. and Salzano F.M., (1997a).** Diversity and Age of the Four Major mtDNA Haplogroups, and Their Implications for the Peopling of the New World., *Am. J. Hum. Genet.* 61:1413–1423.
- Bradley D.G., (2001).** Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle., *Nature.* Vol .410, 1088-1091.
- Brown G.C., (2005).** The future of mitochondrial physiology. 4th Conference on Mitochondrial Physiology, Schröcken, Vorarlberg, Austria, Sept 2005, Program and Abstracts, *Mitochondrial Physiology Network* 10.9: 1-152.
- Brown, T.A. y Brown K.A., (1994).** Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *BioEssays.* 16 (10): 719-726.
- Brown, T.A., Allaby R.G., Brown K.A., O'donoghue K. y Sallares R., (1994).** DNA in wheat seeds from European archaeological sites. *Experientia.* 50: 571-575.
- Brown, W.M., M.JR. George y A.C. Wilson. (1979).** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 1967-1971
- Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. (1987).** Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature;* 325:31-36.
- Castañeda Q.E., (1996).** In the museum of Maya culture: Touring Chichén Itzá. Minneapolis, University of Minnesota Press.
- Cavalli-Sforza L. Luca and Feldman Marcus W. (2003).** The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution. *Nature Genetics supplement,* Vol. 33, 266-275.
- Cerda-Flores R.M., Budowle B., Li J., Barton S.A., Deka R. and Chakraborty R., (2002).** Maximun Likelihood Estimates of Admixture in Northeastern México Using 13 Short Tandem Repeat Loci, *American Journal of Human Biology,* Vol. 14, Pp. 429-439
- Chaves P. B., Paes M. F., Mendes S. L., Strier K. B., Louro I. D. and Fagundes V., (2006).** Noninvasive genetic sampling of endangered muriqui (Primates, Atelidae): Efficiency of fecal DNA extraction, *Genetics and Molecular Biology,* 29, 4, 750-754
- Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S. et al. (1995).** Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.,* 57, 239–247.

- Chenna R, Sugawara H., Koike T, Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G. and Thompson J.D., (2003).** Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31 (13):3497-3500
- Chilli A.A., Rengo C., Magri C., Battagli V., Olivieri A., Rosaria S., Cruciani F., Zeviani M., Briem E., Carelli V., Moral P., Dugoujon J.-M., Roostalu U., Loogväli E.-L., Kivisild T., Bandelt H.-J., Richards M., Villems R., Santachiara-Benerecetti S., Semino O., and Torroni A., (2004).** The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms That the Franco-Cantabrian Glacial Refuge Was a Major Source for the European Gene Pool., *Mol. Biol. Evol.* 21(5):957–964.
- Cipollaro M., Galderisi U., and Di Bernardo G. (2005).** Ancient DNA as a Multidisciplinary Experience., *Journal of Cellular Physiology* 202:315–322.
- Cipollaro, M., G. Di Bernardo, G. Galano, U. Galderisi, F. Guarino, F. Angelini y A. Cascino. (1998).** Ancient DNA in human bone remains from Pompeii archaeological site. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 247 (3): 901-904.
- Clayton D.A., (1982).** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell.* 28: 693-705.
- Comas, Juan, 1974. *Antropología de los pueblos iberoamericanos.*-- Barcelona: Editorial Labor, S.A.,
- Cordaux R., Saha N., Bentley G.R., Aunger R., Sirajuddin S.M, Malhi R.S., Eshleman J.A., Greenberg J.A., Weiss D.A., Schultz S.B.A., Kaestle F.A., Lorenz J.G., Kemp B.M., (2002).** The Structure of Diversity within New World Mitochondrial DNA Haplogroups: Implications for the Prehistory of North America., *Am. J. Hum. Genet.* 70:905–919.
- Cordaux R., Saha N., Bentley G.R., Aunger R., Sirajuddin S.M. and Stoneking M.. (2003).** Mitochondrial DNA analysis reveals diverse histories of tribal populations from India., *European Journal of Human Genetics* 11, 253–264.
- Crubézy, E., B. Ludes, J.-D. Poveda, J. Clayton, B. Crouau-Roy y D. Montagnon. (1998).** Identification of Mycobacterium DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences.* 321
- Cummins, J. (1998).** Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *J. Reprod. Fertil.*, 3, 172–182.

- Dante A.R. y María E.M r., (1981).** *Astronomía y pensamiento mágico*, México, Gobierno del Estado de Tabasco : Centro de Investigaciones de las Culturas Olmeca y Maya.
- De la Garza M., (1978)** *El hombre en el pensamiento religioso náhuatl y maya México* : UNAM. IIF, (Cuaderno; 14)
- Díaz B.A., Moreno G.M., Martínez M.A. y Muñoz, M.M.L., (2002).** “Estudio filogenético de restos óseos prehispánicos de México”. 51st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Denver, CO, EUA.
- Dimauro S, Bonilla E. (1998).** Mitochondrial encephalomyopathies. En: Rosenberg RN, Prusiner SB, DiMauro S, Barchi RL, ed. Boston: Butterworth-Heinemann,:201-235.
- Dorie R-B., (1997).** *Cerámica, Maya*, Vol. V, Num. 28, XI-XII, p. 20-29. Editorial Raíces, México.
- Drancourt, M., Aboudharam G., Signoll M., Dutour O. y Raoult D.. (1998).** Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl.*
- Duchen M.R., (2004).** Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* 25: 365-451,
- Easton R, Merriwether D.A., Crews D. and Ferrell R. (1996).** mtDNA variation in the Yanomami: evidence for additional New World founding lineages. *American Journal of Human Genetics* 59: 213-225.
- Edwards S.V. and Beerli P., (2000).** Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescent time in phylogeographic studies. *Evolution*, 54, 1839–1854.
- Eshleman J.A., Malhi R.S., and Smith D.G., (2003).** Mitochondrial DNA Studies of Native Americans: Conceptions and Misconceptions of the Population Prehistory of the Americas., *Evolutionary Anthropology* 12:7–18.
- Faerman M., Kahila G., Smith P., Greenblatt C., Stager L., Filon D., Oppenheim A. (1997).** DNA analysis reveals the sex of infanticide victims. *Nature*. 385: 212-213.
- Farre H., (1984).** *Cambios y continuidad entre los mayas de México: contribución al estudio de la situación colonial en América Latina*, 2a. ed. México, INI – SEP.

- Fernández T. I., (1998).** El Ppolom, mercaderillo o regatón, *Arqueología Mexicana*. Vol. V, Num. 20, XI-XII, p. 46-53. Editorial Raíces, México.
- Fernández Torres José Luis. (1995).** Antropología Molecular Hoy. Perspectivas en el Estudio de los Procesos de la Evolución Humana, en "Genes, Evolución y Diversidad Humana". *Temas de Antropología Molecular.*, Editado por Carlos Serrano Sánchez., Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM. México., Pp. 14-28.
- Fisher, R.P., Lisowsky T., Parisi M.A. and Clayton D.A., (1992).** DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J. Biol. Chem.* 267 (5): 3358-3367.
- Forster, P., Harding R., Torroni A. (1996).** Origin and evolution of Native American mtDNA variation: A reappraisal. *Am. J. Hum. Genet.* 59:935–945.
- Frey T.G. and Mannella C.A., (2000)** The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25: 319-324.
- Gibbons A., (1993).** Genetics trace the DNA trail of the first Americans. *Science* 259: 312-313.
- Gilbert M.T.P., Bandelt H.-J., Hofreiter M. and Barnes I., (2005).** Assessing ancient DNA studies., *TRENDS in Ecology and Evolution.*
- Gilbert M.T.P., W.E., Hansen A.J., Barnes I., Lars R., Lynnerup N., and Cooper A., (2003).** Distribution Patterns of Postmortem Damage in Human Mitochondrial DNA., *Am. J. Hum. Genet.* 72:32–47.
- Giles, R.E., Blanc H., Cann H.M. and Wallace D.C., (1980).** Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 (11): 6715-6719.
- Glick, B.S., and Schatz, G., (1991).** "Import of proteins into mitochondria." *Annual Review of Genetics* 25:21-44.
- Glick, B.S., Wachter, C. and Schatz, G., (1992).** "The energetics of protein import into mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta* 1101(2):249-251.
- Goffart S. and Wiesner R.J., (2003).** Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* 88: 33-40,
- Gonzalbo P.E., (2004).** Conquistas lacustres *Arqueología Mexicana* Vol. 12, N°. 68, 44-49

- González-Oliver A., Márquez-Morfín L., Jiménez J. C., and Torre-Blanco A., (2001),** Founding Amerindian Mitochondrial DNA Lineages in Ancient Maya From Xcaret, Quintana Roo, *American Journal of Physical Anthropology* 116:230–235.
- Green L.D., Derr J.N., and Knight A., (2000).** mtDNA Affinities of the Peoples of North-Central Mexico., *Am. J. Hum. Genet.* 66:989–998.
- Greenberg J., Turner C.G. and Zegura S.L. (1986).** The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Current Anthropology* 4: 477-497.
- Gribaldo S. and Philippe H. (2002).** Ancient Phylogenetic Relationships., *Theoretical Population Biology* 61, 391–408.
- Hadly E.A., Van Tuinen M., Chan Y., and Heiman K., (2003).** Ancient DNA Evidence of Prolonged Population Persistence with Negligible Genetic Diversity IN an Endemic Tuco-Tuco (*Ctenomys sociabilis*)., *Journal of Mammalogy*, 84(2):403–417.
- Hagelberg E. (1994).** Mitochondrial DNA from ancient bones. En: *Ancient DNA*. B. Herrmann y S. Hummel, Eds. Springer Verlag, New York. p. 195-204.
- Hagelberg, E. (1997).** Ancient and modern mitochondrial DNA sequences and the colonization of the Pacific. *Electrophoresis*. 18: 1529-1533.
- Hagelberg, E. y Clegg J.B.. (1993).** Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 252: 163-170.
- Hall T.A., (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Handt O., Richards M., Trommsdorff M., Kilger C., Simanainen J., Georgiev O., Bauer K., Stone A., Hedger R. and Schaffner W., (1994).** Molecular genetics analyses of the Tyrolean Ice man. *Science*: 264. 1775-1775.
- Handt, O., Meyer S. and Von-Haeseler A., (1998).** Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nucleic Acids Res.* 26 (1): 126-129.
- Hatefi Y., (1985).** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem*, 54:1015-1069.

- Hauswirth, W.W. and Laipis P.J., (1982).** Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Hostein cows. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 4686-4690.
- Hawks J., Hunley K., Lee S-H., and Wolpoff M.. (2000).** Population Bottlenecks and Pleistocene Human Evolution., *Mol. Biol. Evol.* 17(1):2–22.
- Higuchi R. Bowman B., Frieberg M., Ryder O.A., Wilson A.C. (1984).** DNA sequences from the quagga an extinct member of the horse family. *Nature* 312 282-284
- Hofreiter M., (2004).** Genetic Analyses from Ancient DNA., *Annu. Rev. Genet.*38:645-79.
- Hofreiter M., Capelli C., Krings M., Waits L., Conard N., Münzel S., Rabeder G., Nagel D., Paunovic M., Jambrošić G., Meyer S., Weiss G., and Pääbo S., (2002).** Ancient DNA Analyses Reveal High Mitochondrial DNA Sequence Diversity and Parallel Morphological Evolution of Late Pleistocene Cave Bears., *Mol. Biol. Evol.* 19(8):1244–1250.
- Hofreiter M., Serre D., Poinar H.N., Kuch M. and Pääbo S.. (2001).** Ancient DNA., *Nature, Genetics*, Vol. 2, 353.
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. (1988).** Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*; 331:717-719.
- Horai S, Kondo R, Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, Tajima K., (1993).** Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 10:23–47
- Horai S., Kondo R., Murayama K., Hayashi S., Koike H. and Nakai N. (1991).** Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 333: 409-416.
- Horai S., Kondo R., Nakagawa-Hattori Y., Hayashi S., Sonoda S., and Tajima K., (1993).** Peopling of the Americas, Founded by Four Major Lineages of Mitochondrial DNA ., *Mol. Bid Evol.* 10(1):23-47.
- Höss M. and Pääbo S., (1993).** DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21:3913-3914

- Howell, N., Halvorson S., Kubacka I., Mccullough D.A., Bindoff L.A. y Turnbull D.M., (1992).** Mitochondrial gene segregation in mammals: is the bottleneck always narrow? *Human Genetics*. 90: 117-120.
- Hudson R.R., Turelli M., (2003).** Stochasticity overrules the 'threetimes rule': genetic drift, genetic draft, and coalescent times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution*, 57, 182– 190.
- Huelsenbeck J.P. and Imennov N.S., (2002).** Geographic Origin of Human Mitochondrial DNA: Accommodating Phylogenetic Uncertainty and Model Comparison., *Syst. Biol.* 51(1):155–165.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática), (2005).** Perspectiva Estadística de Chiapas, Dirección General de Coordinación de los Sistemas Nacionales Estadístico y de Información Geográfica. México.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática), (2005a).** Perfil Sociodemográfico de la Población Hablante de Maya, Dirección General de Coordinación de los Sistemas Nacionales Estadístico y de Información Geográfica. México.
- Jobling M.A. and Gill P., (2004).** Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis, *Nature Genetics*, Vol. 5, 739-751.
- Juárez M.A.I., Martínez M.A., Castillo O.M.G., Moreno M.G, Díaz B.A. y Muñoz, M.M.L., (2002).** "Parentesco biológico entre los pobladores prehispánicos de Cholula, Puebla, mediante el análisis molecular de sus restos óseos". VII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Antropología Biológica. México, D. F.
- Kaneda, H., Hayashi J.-I., Takahama S., Taya C., Lindahl K.F. and Yonekawa H., (1995).** Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92 (10): 4542-4546.
- Karbowski M. and Youle R.J., (2003).** Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 870-880
- Keyser-Tracqui C., Crubézy E., and Ludes B., (2003).** Nuclear and Mitochondrial DNA Analysis of a 2,000-Year-Old Necropolis in the Egyin Gol Valley of Mongolia., *Am. J. Hum. Genet.* 73:247–260.

- Kivisild T., Reidla M., Metspalu E., Rosa A., Brehm A., Pennarun E., Parik J., Geberhiwot T., Usanga E., and Villems R., (2004).** Ethiopian Mitochondrial DNA Heritage: Tracking Gene Flow Across and Around the Gate of Tears., *Am. J. Hum. Genet.* 75:752–770.
- Koehler, C.M., Lindberg G.L., Brown D.R., Beitz D.C., Freeman A.E, Mayfield J.E. and Myers A.M., (1991).** Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics.* 129: 247-255.
- Kong Q-P., Yao Y-G, Sun C., Bandelt H-J., Zhu C-L., and Zhang Y.P., (2003).** Phylogeny of East Asian Mitochondrial DNA Lineages Inferred from Complete Sequences., *Am. J. Hum. Genet.* 73:671–676.
- Koningsberg F.M., (1992).** Bioenergética de la cadena respiratoria mitocondrial, Ed UAM. México.
- Kreder, C.A. (1996).** Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1102-1106.
- Krings M., Geisert H., Schmitz R.W., Krainitzki H, and Pääbo S., (1999).** DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 96, pp. 5581–5585.
- Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M. and Pääbo S., (1997).** Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell:* 90: 19-30.
- Kumar S., Tamura K. and Nei M., (2004).** MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Lalueza-Fox C., (1996).** Mitochondrial DNA haplogroups in four tribes from Tierra del Fuego Patagonia: inferences about the peopling of the Americas. *Hum. Biol.* 68 (6): 855-871.
- Lalueza-Fox C., A. Pérez-Pérez, E. Prats, L. Cornudella y D. Turbón. (1997).** Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum. Mol. Genet.* 6 (1): 41-46.
- Lalueza-Fox C., Gilbert M.T.P., Martínez-Fuentes A.J., Calafell F., and Bertranpetit J. (2003).** Mitochondrial DNA from Pre-Columbian Ciboneys From Cuba and the

- Prehistoric Colonization of the Caribbean., *American Journal of Physical Anthropology* 121:97–108.
- Lenkersdorf C., (1997).** *Cosmovisión Maya. Ce-acatl, México.*
- Lewis C.M., Tito R.Y., Lizárraga B., and Stone A.C., (2004).** Land, Language, and Loci: mtDNA in Native Americans and the Genetic History of Peru., *American Journal of Physical Anthropology* 127:351–360.
- Lightowers, R.N., Chinnery P.F., Turnbull D.M. and Howell N. (1997).** Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics.* 13 (11): 450-455.
- Lindahl T. (1997).** Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell,:* 90: 1-3.
- Lleonart R., Riego E., Rodríguez S.R., Travieso R. R. and De la Fuente J., (1999).** Analyses of DNA From Ancient Bones of a Pre-Columbian Cuban Woman and a Child., *Genetics and Molecular Biology*, 22, 3, 285-289.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. W. H., (2002).** “*Biología Celular y Molecular*”. 4th. Ed. Editorial Médica Panamericana.
- Loza M.I., Díaz B.A., Moreno G.M., Martínez M.A. y Muñoz M.M.L., (2001).** “Alineamientos del DNAm<sub>t</sub> de la región hipervariable de pobladores de la época prehispánica”. XI Coloquio Internacional de Antropología Física Juan Comas. Orizaba, Veracruz, México.
- Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S., (1999).** Mitochondrial. heteroplasmy among maternally related individuals. *Int J Legal. Med* 113:155–0161
- Maca-Meyer Ni., González A.M., Larruga J.M., Flores C. and Cabrera V.M., (2001).** Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions., *BMC Genetics*, 2:13.
- Malhi R.S., Eshleman J.A., Greenberg J.A., Weiss D.A., Schultz S.B.A., Kaestle F.A., Lorenz J.G., Kemp B.M., Johnson J.R., and Glenn S.D., (2002).** The Structure of Diversity within New World Mitochondrial DNA Haplogroups: Implications for the Prehistory of North America., *Am. J. Hum. Genet.* 70:905–919.

- Malyarchuk B.A., Rogozin I.B., Berikov V.B., Derenko M.V., (2002).** Analysis of phylogenetically reconstructed mutational spectra in human mitochondrial DNA control region. *Hum Genet.* 111(1): 46-53.
- Mann C.C., (2006).** 1491: una nueva historia de las Américas antes de Colón, Madrid:Taurus.
- Martínez M.A., Moreno G.M., Díaz B.A., Castillo, O.M.G. y Muñoz, M.M.L., (2002).** “Análisis molecular del ADNmt en restos óseos de los primeros pobladores de la Cuenca de México”. Primer Simposio Internacional El Hombre Temprano en América y sus Implicaciones en el Poblamiento de la Cuenca de México.
- Martínez M.A., Moreno, G.M., Díaz B.A., Maya Ch.L., Ramírez C.G., Carranza S.I.C. y Muñoz M.M.L., (2005).** “Análisis filogenético de la Población Tolteca de Cuautitlán Izcalli”. XIII Coloquio Internacional de Antropología Física Juan Comas. Campeche, Campeche, México.
- Meirelles F.V., Bordignon V., Watanabe Y., Watanabe M., Dayan A., Lôbo R.B., Garcia J.M., and Smith L.C., (2001).** Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics.*158(1): 351–356.
- Mendoza V.A.F., Martínez M.A., Castillo O.M.G., Moreno G.M., Díaz B.A. y Muñoz, M.M.L., (2002).** “Evaluación molecular del DNA mitocondrial en restos óseos antiguos sometidos a diferentes condiciones ambientales”. Primer Simposio Internacional El Hombre Temprano en América y sus Implicaciones en el Poblamiento de la Cuenca de México.
- Merriwether A.D. and Ferrell R.E., (1996).** The Four Founding Lineage Hypotesis for the New World: A Critical Reevaluation., *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 5, No.1, 241-246.
- Merriwether A.D., Reed D.M., and Ferrell R.E., (1997).** Ancient and contemporary mitochondrial DNA variation in the Maya. In: “Bones of the Maya”: Studies of ancient skeletons, eds. Whittington SL and Reed DM. Smithsonian Inst. Press, Washington DC, pp. 208-217.
- Merriwether A.D., Rothhammer F. and Ferrell R.E., (1995).** Distribution of the four founding lineage haplotypes in native Americans suggests a single wave of

- migration for the new world. *American Journal of Physical Anthropology* 98: 411-430.
- Merriwether D.A., Rothhammer F. y Ferrell R.E., (1994).** Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia*. 50: 592-601.
- Metspalu M., Kivisild T., Metspalu E., Parik J., Hudjashov G., Kaldma K., Serk P., Karmin M., Behar D.M., Gilbert M.T.P., Endicott P., Mastana S., Papiha S.S., Skorecki K., Torroni A. and Villems R., (2004).** Most of the extant mtDNA boundaries in South and Southwest Asia were likely shaped during the initial settlement of Eurasia by anatomically modern humans., *BMC Genetics*, 5:26, 1-25.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. (1999).** A ging dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*; 286:774-779.
- Miquel J. (1998).** An update of the oxygen stress-mitochondrial mutation theory of aging: Genetic and evolutionary implications. *Exp Gerontol*; 33:113-126.
- Monnat R.J. and Loeb L.A., (1985).** Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 2895-2899.
- Montoya J., Christianson T., Levens D., Rabinowitz M., Attardi G., (1982)** Identification of initiation sites for heavy strand and light strand trascription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*; 79:7195-7199.
- Montoya J., Gaines G.L., Attardi G., (1983).** The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlaping transcription units. *Cell*; 34:151-159.
- Montoya J., Ojala D., Attardi G., (1981).** Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature*; 290: 465-470.
- Moreno G.M., Martínez M.A., Díaz B.A y Muñoz M.L.M., (2003).** "Estudio de los linajes de la población prehispánica del Caracol", Guerrero. XII Coloquio Internacional de Antropología Física "Juan Comas". La Trinidad, Tlaxcala., México.
- Morora I. and Rollo F.. (2002).** *Molecular Paleontology., Cellular and Molecular Life Science*. 59 97-111.

- Mulligan C.J., (2005).** Isolation and Analysis of DNA from Archaeological, Clinical, and Natural History Specimens., *Methods in Enzymology*, Vol. 395. 87-103.
- Muñoz M.M.L., Moreno G.M., Jiménez L.C. y Muñoz, M.L., (2001).** “Ancient mtDNA analysis of amerindians from Monte Albán, México”. *Keystone Symposia*, Breckenridge, CO, EUA.
- Navarrete C., 2000,** Palenque, 1784: el inicio de la aventura arqueológica maya. México: UNAM.
- Nerlich, A.G., C.J. Haas, A. Zink, U. Szeimies y H.G. Hagedorn. (1997).** Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *The Lancet*. 350 (Nov): 1404. (11): 941-951.
- Nettle D., (1999).** Linguistic diversity of the Americas can be reconciled with a recent colonization., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 3325–3329.
- Newman, S.M., Zelenaya-Troitskaya O., Perlman P.S. and Butow R.A., (1996).** Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein Abf2p. *Nucleic Acids Res.* 24 (2): 386-393.
- Nicholls H., (2005).** Ancient DNA Comes of Age., *PLoS Biology*, Vol. 3, Issue 2, e56 192-196.
- Nicholls, D.G., (1982).** *Bioenergetics: an Introduction to the Chemiosmotic Theory.* Academic Press, London.
- Nichols R., (2001).** Gene trees and species trees are not the same. *TREE*, 16, 358–364.
- Ochoa L., 2000,** Olmecas y mayas en Tabasco: cinco acercamientos, G.E.T. México.
- Ojala D., Montoya J., Attardi G. (1981).** tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*; 290:470-474.
- Oota H., Saitou N., Matsushita T. and Ueda S., (1999).** Molecular genetic analysis of remains of a 2,000-year-old human population in China - and its relevance for the origin of the modern Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 250-258.
- Ovchinnikolgor V. and Goodwin W., (2001).** The Isolation and Identification of Neanderthal Mitochondrial DNA., *Profiles in DNA/* January 1-9.

- Ovchinnikov V., Götherström A., Romanova G.P., Kharitonov V.M., Lidén K. and Goodwin W., (2000).** Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature*. 404: 490-493
- Ovchinnikov V., Ovtchinnikova O.I., Druzina E.B., Buzhilova A.P. and Makarov N.A., (1998).** Molecular genetic sex determination of Medieval human remains from North Russia: Comparison with archaeological and anthropological criteria. *Anthropol. Anz.* 56: 7-15.
- Pääbo S., (1985).** Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*; 314: 644-645.
- Pääbo S., (1989).** Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 1939-1943.
- Pääbo S., (1993).** Ancient DNA. *Scientific American*. November: 60-66.
- Pääbo S., Gifford J.A. and Wilson A.C., (1988).** Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain., *Nucleic Acids Research*, Vol.16 Num. 20: 9775-9787 .
- Pääbo S., Poinar H., Serre D., Jaenicke-Després V., Hebler J., Rohland N., Kuch M., Krause J., Vigilant L., and Pakendorf B. and Stoneking M., (2005).** Mitochondrial DNA and human Evolution., *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6:165–83.
- Pakendorf B., Wiebe V., Tarskaia L.A., Spitsyn V.A., Soodyall H., Rodewald A., and Stoneking M., (2003).** Mitochondrial DNA Evidence for Admixed Origins of Central Siberian Populations., *American Journal of Physical Anthropology* 120:211–224.
- Palmirotta, R., F. Verginelli, A. Cama, R. Mariani-Costantini, L. Frati y P. Battista. (1998).** Origin and gender determination of dried blood on a statue of the Virgin Mary. *J. Forensic Sci.* 43 (2): 431-434.
- Parducci L. and Bennett K., (2005).** Ancient DNA-research., *bioscience-explained*, Vol 2, No 2.
- Parr, R.L., S.W. Carlyle y D.H. O'rourke. (1996).** Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99: 507-518.

- Parsons T.J. and Coble M.D., (2001).** Increasing the Forensic Discrimination of Mitochondrial DNA Testing through Analysis of the Entire Mitochondrial DNA Genome., *Croat Med J*;42:304-309.
- Parsons T.J., Muniec D.S., Sullivan K., Woodyatt N., Alliston-Greiner R., Wilson M.R., Berry D.L., Holland K.A., Weedn V.W., Gill P. and Holland M.M., (1997).** A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics*. 15: 363-367.
- Peissel M., (1981).** El mundo perdido de los mayas 2a. ed., Juventud, Barcelona, España.
- Pérez-Pérez, A. (1992).** Ancient bone analysis in Spain: Cystic Fibrosis and mtDNA. *Ancient DNA Newsletter*. 1 (1): 33-34.
- Pierre A., (1993).** El juego de pelota prehispánico en el valle El Rosario municipio de Trinitaria, Chiapas. En *Antropología, historia e imaginativa*: 127-132.
- Pincemin D.S., (1994).** Las pinturas mayas de Bonampak, Chiapas. *Los investigadores de la cultura maya* 2: 135-150.
- Quintana-Murci L., Chaix R.R. Wells S., Behar D.M., Sayar H., Scozzari R., Rengo C., Al-Zahery N., Semino O.A. Santachiara-Benerecetti S., Coppa A., Ayub Q., Mohyuddin A., Tyler-Smith C., Mehdi S. Q., Torroni A., and McElreavey K., (2004).** Where West Meets East: The Complex mtDNA Landscape of the Southwest and Central Asian Corridor., *Am. J. Hum. Genet.* 74:000–000.
- Rafi, A., M. Spigelman, J. Stanford, E. Lemma, H. Donoghue y J. Zias. (1994).** *Mycobacterium leprae* DNA from ancient bone detected by PCR. *The Lancet*. 343 (8909): 1360-1361. *Acad. Sci. USA*. 95 (21): 12637-12640.
- Retana-Salazar A.P., (2005).** Tras las Huellas del Hombre Americano: Un Enfoque Parasitológico., *Revista de Antropología Experimental* No. 5, Texto 9. 1-10.
- Reynier P., May-Panloup P., Chrétien M-F., Morgan C.J., Jean M., Savagner F., Ribeiro Dos Santos A.K.C, Santos S.E.B, Machado A.L., Guapindaia V. and Zago M.A. (1996)** Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-Columbian natives of the Amazon region. *American Journal of Physical Anthropology* 101: 29–37. Rivet, Paul. *Los orígenes del hombre americano*. Paul

Rivet; traducion de Jose Recasens 2a ed, Ed. Fondo de Cultura Economica, Mexico 1973.

- Rohland N., Siedel H., and Hofreiter M., (2004).** Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens., *BioTechniques* Vol. 36, No. 5: 814-821.
- Rollo, F., Amici A. y Salvi R., (1988).** Short but faithful pieces of ancient DNA. *Nature*. 335: 774.
- Ross, P.E. (1992).** Eloquent remains. *Scientific American*. 266 (5): 72-81.
- Rothhammer F., Moraga M., Rivera M., Santero C.M., Standen V.G., García F. y Carvallo P. (2003).** Análisis de ADNmt de Restos Esqueletales del Sitio Arqueológico de Tiwanaku y su Relación con el Origen de sus Constructores., *Chungara, Revista de Antropología Chilena* Vol. 35, Num. 2, 269-267.
- Rubicz R., Schurr T. G., Babb P. I., and Crawford M. H., 2003.** Mitochondrial DNA Variation and the Origins of the Aleuts, *Human Biology*, December, v. 75, no. 6, pp. 809–835.
- Salas A., Richards M., Lareu M-V., Scozzari R., Coppa Al., Torroni A., Macaulay V., and Carracedo A., (2004).** The African Diaspora: Mitochondrial DNA and the Atlantic Slave Trade., *Am. J. Hum. Genet.* 74:454–465.
- Salo, W.L., A.C. Aufderheide, J. Buikstra y T.A. HolcoMB. (1994).** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91: 2091-2094.
- Salzano F.M., (2002).** Molecular variability in Amerindians: widespread but uneven information., *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74(2): 223-263.
- Schackt J., (2002)** Los Mayas: El Origen del Término y la Creación del Pueblo, *Revista Estudios Interétnicos, Edición Especial, NO. 16, Año 10.* pp. 1-26.
- Scheffler I.E., (2000).** A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1: 3-31.
- Schurr T.G., Ballinger S.W., Gan Y.Y., Hodge J.A., Merriwether D.A., Lawrence D.N. and Knowler W.C., (1990).** Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies suggesting they derived from four primary maternal lineages. *American Journal of Human Genetics* 46: 613-623.

- Schwartz M. and Vissing J., (2002).** Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA, *New England Journal of Medicine*, 347: 576-580
- Sekiguchi K., Kasai K. and Levin B.C., (2003)** Inter-and intragenerational transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13, *Mitochondrion*, 2(6):401-14.
- Serre D., Langaney A., Chech M., Teschler-Nicola M., Paunovicz M., Menecier P., Hofreiter M., Possnert G., Pääbo S., (2004).** No Evidence of Neandertal mtDNA Contribution to Early Modern Humans., *PLoS Biology*, Vol.2, Issue 3, 313-317.
- Shaw J.M. and Nunnari J., (2002).** Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 12: 178-184.
- Singer-Sam J., Tanguay RL, Riggs A.D., (1989).** Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications*, 3:11.
- Smith D.G., Malhi R.S., Eshleman J., Lorenz J.G. and Kaestle F.A. (1999).** Distribution of mtDNA haplogroup X among native North Americans. *American Journal of Physical Anthropology* 110: 271-84.
- Soltis P.S. Soltis D.E., (1993).** Ancient DNA: prospects and limitations., *New Zealand Journal of Botany*, Vol. 31: 203-209.
- Spuhler, J.N., (1988).** Evolution of mitochondrial DNA in monkeys, apes, and humans. *Y. Phys. Anthropol.* 31: 15-48.
- Starikovskaya Y. B., Sukernik R. I., Schurr T. G., Kogelnik A. M. and Wallace D. C., (1998).** mtDNA Diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implications for the Genetic History of Ancient Beringia and the Peopling of the New World, *Am. J. Hum. Genet.* 63:1473–1491,
- Steuerwald, N., Barritt, J.A., Adler R., (2000)** Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. *Zygote*, 8, 209–215.
- Stoll O. (1958).** *Etnografía de Guatemala*. Translated by Antonio Goubaud Carrera. 2 ed. Seminario de Integración Social Guatemalteca, no. 8. Guatemala: Sánchez y de Guise, 1938. Reimpresión, Guatemala: Editorial del Ministerio de Educación Pública.

- Stone A.C. and Stoneking M., (1993).** Ancient DNA a pre-Columbian Amerindian population. *American Journal of Physical Anthropology* 92: 463-471.
- Stone A.C. and Stoneking M., (1998).** mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *American Journal of Human Genetics* 62: 1153–1170.
- Stone A.C., Milner G.R., Pääbo S. y Stoneking M., (1996).** Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99 (2): 231-238.
- Stoneking, M., (1993).** DNA and recent human evolution. *Evol. Anthropol.* 2: 60-73.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C. and Schatten G., (1999).** Ubiquitin tag for sperm mitochondria, *Nature* 40: 371-372.
- Tambets K., Rootsi S., Kivisild T., Help H., Serk P., Loogväli E.-L., Tolk H.V., Reidla M., Metspalu E., Pliss L., Balanovsky O., Pshenichnov A., Balanovska E., Gubina M., Zhadanov S., Osipova L., Damba L., Voevoda M., Kutuev I., Bermisheva M., Khusnutdinova E., Gusar V., Grechanina E., Parik J., Pennarun E., Richard C., Chaventre A., Moisan J.-P., Barac L., Peričić M., Rudan P., Terzić R., Mikerežlija I., Krumina A., Baumanis V., Kozie S.I., Rickards O., De Stefano G.F., Anagnou Ni., Pappa K.I., Michalodimitrakis E., Feraák V., Füredi S., Kome R.I., Beckman L., and VILLEMS R., (2004).** The Western and Eastern Roots of the Saami the Story of Genetic “Outliers” Told by Mitochondrial DNA and Y Chromosomes., *Am. J. Hum. Genet.* 74:661–682.
- Templeton A.R., (1999).** Human Races: A Genetic and Evolutionary Perspective., *American Anthropologist* 100(3):632-650.
- Torrioni A., Sukernic R.I., Schurr T.G., Starikovskaya Y.B., Cabell M.F., Crawford M.H., Comuxie A.G. and Wallace D., (1993).** mtDNA Variation of Aboriginal Siberians Reveals Distinct Genetic Affinities with Native Americans., *Am. J. Hum Genet.* 53: 591-608.
- Torrioni A., Bandelt H.-J., Macaulay V., Richards M., Cruciani F., Rengo C., Martinez-Cabrera V., VILLEMS R., K. T., Metspalu E., Parik J., Tolk H-V., Tambets K., Forster P., Karger B., Francalacci P., Rudan P., Janicijevic B., Rickards O., Savontaus M-L., Huoponen K., Laitinen V., Koivumäki S., Sykes B., Hickey E., Novelletto A., Moral P., Sellitto D., Coppa A., Al-Zaheri N.A.**

- Santachiara-Benerecetti S., Semino O. and Scozzari R., (2001).** A Signal, from Human mtDNA, of Postglacial Recolonization in., Europe., *Am. J. Hum. Genet.* 69:844–852.
- Torroni A., D'urbano L., Rengo C., Scozzari R., Sbracia M., Manna C., Cavazzini C. y Sellitto D., (1998).** Intracytoplasmic injection of spermatozoa does not appear to alter the mode of mitochondrial DNA inheritance. *Hum. Reprod.* 13 (6): 1747-1749.
- Torroni A., Schurr T.G., Yang C.C., Szathmary E.J., Williams R.C., Schanfield M.S., Troup G.A., Knowler W.C., Lawrence D.N., Weiss K.M. and Wallace D.C., (1992).** Native American mitochondrial DNA analysis indicated that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130: 153-162.
- Tovalín A. A., (1998).** Bonampak. *Arqueología Mexicana* 5 (30): 50-52.
- Trejo S., (2000).** Arquitectura e ideología de los antiguos mayas : Memoria de la Segunda Mesa Redonda de Palenque, México, CONACULTA, INAH.
- Troy C.S., MacHugh D.E., Bailey J.F., Magee D.A., Loftus R.T., Cunningham P., Chamberlain A.T., Sykes B.C. and Turner C.G. (1984).** Advances in the dental search for Native American origins. *Acta Anthropogenetica* 8: 23-78.
- Urist, M. R., Mikulski, A., and Contreas, C. N. (1975).** Reversible extinction of the morphogen in bone matrix by reduction and oxidation of disulfide bonds. *Calcif Tissue Res.*,19:73-83
- Vishwanathan D.E., Roy S., Usha R. M. V. and Majumder P.P. (2002).** Mitochondrial DNA diversity among five tribal populations of southern India., *Current Science*, Vol. 83, No. 2, 25.
- Vogelstein B. and Gillespie D., (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol. 76, No. 2, pp. 615-619
- Vogt E. Z. y Ruz A. L., (1971).** Desarrollo cultural de los Mayas, Ed. UNAM, México
- Wakeley J., (1993).** Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 37: 613-623.
- Wallace D.C. (1994).** Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (19): 8739-8746.

- Wallace D.C. and Torroni A. (1992).** American Indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: a review. *Human Biology* 64: 403-416.
- Wallace D.C., (1992).** Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*; 61:1175-1212.
- Wallace D.C., (1995)** Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J HumGenet* 57:201–223
- Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G., Lezza A.M.S., (1988).** Mitochondrial DNA mutation associated with Leber’s hereditary optic neuropathy. *Science*; 242:1427-1430.
- Ward R.H., Redd A., Valencia D., Frazier B. and Pääbo S. (1993).** Genetic and linguistic differentiation in the Americas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 10663-10667.
- Willerslev E. and Cooper A., (2005).** Ancient DNA., *Proc. R. Soc. B* 272, 3–16.
- Wisely S.M., Maldonado J.E. and Fleischer R.C., (2004).** A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens, *Conservation Genetics* 5: 105–107.
- Yakes, F.M. and Van Houten B., (1997).** Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (2): 514-519.
- Yang D.Y. and Watt K., (2005).** Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis., *Journal of Archaeological Science* 32: 331–336.
- Yang D.Y., Eng B., and Saunders S.R., (2003).** Hypersensitive PCR, Ancient Human mtDNA, and Contamination., *Human Biology*, June, v. 75, no. 3, pp. 355–364.
- Yang, H., (1997).** Ancient DNA from Pleistocene fossils: preservation, recovery, and utility of ancient genetic information for Quaternary research. *Quaternary Science Reviews.* 16 (10): 1145-1161.
- Zeviani M., Moraes C.T., Dimauro S., Nakase H., Bonilla E., Schon E., (1988).** Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology*; 38:1339-1346.

**Zhivotovsky L.A., Rosenberg N.A., and Feldman M.W., (2003).** Features of Evolution and Expansion of Modern Humans, Inferred from Genomewide Microsatellite Markers., *Am. J. Hum. Genet.* 72:1171–1186.

ESTE LIBRO FUE IMPRESO  
Y EMPASTADO EN LOS  
TALLERES DE



Impresión Directa y mucho más...

**[www.mitesis.com.mx](http://www.mitesis.com.mx)**

Paseo de las Facultades  
#41 Local B  
Col. Copilco Universidad

Te atendemos vía telefónica las  
24 horas del día de Lun. a Dom.

**Tel. Directo**

**91-18-80-79**

UNEFON **04455-9143-7472**

UNEFON **04455-3001-1869**

E-MAIL

[mitescopilco@gmail.com](mailto:mitescopilco@gmail.com)

solo para Messengers  
[mitescopilco@yahoo.com](mailto:mitescopilco@yahoo.com)  
[mitesis@msn.com](mailto:mitesis@msn.com)