

Universitat Autònoma de Barcelona
Unitat d'Antropologia Biològica
Departament Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia



De la Mesoamérica Prehispánica
a la Colonial:

La huella del DNA antiguo.

Eduvigis Solórzano Navarro
Tesis Doctoral
Barcelona - España
2006



Universitat
Autònoma
de Barcelona

De la Mesoamérica Prehispánica a la Colonial: La huella del DNA antiguo.

Memoria presentada por Eduvigis Solórzano Navarro para optar al título de Doctor en Antropología Biológica del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología de la Universidad Autònoma de Barcelona, codirigida por los doctores Assumpció Malgosa i Morera, Profesora Titular de la Unidad de Antropología Biológica del Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad Autònoma de Barcelona y Rafael Montiel Duarte, Investigador del Departamento de Biología - CIRN, Universidad de Las Azores, Portugal.

Dra. Assumpció Malgosa i Morera

Dr. Rafael Montiel Duarte

Eduvigis Solórzano Navarro

...De este modo, en México desde 1521, la CULTURA, ha sido la Occidental y la de los vencidos, sólo ha sido el “folclor”. El ARTE ha sido de Occidente y la “artesanía” de los invadidos. La MEDICINA del europeo y la “brujería” del indígena. La HISTORIA ha sido la de Europa y los “mitos”, la memoria de los pueblos originarios...

Tomado de Octavio Paz y su percepción del México Prehispánico.
Guillermo Marín. 2004

A mis padres
Guillermo y Berta



Mi especial agradecimiento a la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, por la beca otorgada para la realización de estudios de doctorado.

Agradecimiento.

Es difícil describir los sentimientos que se desbordaron al llegar a este punto, me vienen a la memoria muchos momentos... salir de mi país para caminar por calles anónimas, rodeada de gente desconocida y enfrentar la soledad y la distancia de los seres más queridos, con una única meta... salir adelante y terminar. Ya he alcanzado este propósito y sin embargo, siguen revueltos los sentimientos, porque aquí estoy dejando gente bella y recuerdos invalorable. Quiero agradecer a muchas personas, no sólo por que me han ayudado a la realización de esta tesis, sino por el apoyo y el cariño que me han brindado.

A Assumpció Malgosa, mi directora de tesis y mi amiga, gracias por el voto de confianza que le diste a esta odontóloga con muchas ganas de trabajar pero totalmente ajena al área, por tu apoyo y por el entusiasmo que le has dado a este trabajo, por tus exigencias, tu calidad científica y tus sabios consejos y sobre todo por tu cariño, porque siempre estuviste pendiente de mi soledad, de mis nostalgias y de mis añoranzas.

A Rafael Montiel, más que mi codirector de tesis, has sido mi maestro, mi consejero... mi mentor, Rafa he aprendido mucho de ti, gracias por eso y por tus palabras de aliento cuando más las he necesitado, por las largas discusiones de los primeros sábados de cada mes que tanto extraño y por el valioso tesoro que es la amistad.

A Rolando González-José y Antonio González-Martín, que llegaron en el momento justo, con un material maravilloso, que me permitió inmiscuirme en los grandes enigmas sobre el poblamiento americano y a través de ellos al Instituto Nacional de Antropología e Historia de México (INAH-México).

A mis hermanos latinoamericanos del pasado, los de Tlatelolco, Los Olmos, Santa María Texcala y los del Hospital San Juan de Dios, por la bondad de sus muestras, porque me permitieron tener un camino más transitable; pero también a los de S'Illot des Porros, Son Real y Can Reines, a mis niñitos de Huelva y a Segudet, la dulce dama con quien me inicié en este difícil tránsito del DNA antiguo.

A Pedro Moral por su respaldo incondicional, sus enseñanzas, por las explicaciones a mis siempre tantas preguntas y a sus chicos de la UB, especialmente a Esther.

A Pilar Aluja, siempre pendiente, siempre una palabra de aliento, de esperanza, de cariño, siempre una sonrisa, siempre dos besos, eres genial!

A Cristina Santos por su disposición a echarme un cable con lo estadístico y con lo metodológico y a recordarme que con DNA moderno se vive mejor.

A tots els professors i companys de l'Unitat d'Antropologia, UAB... A la maca de la Jessi, al conseqüent del Xavier, i especialment al Marc per aguantar les llargues converses en veneçolà, per una època complicada en el laboratori, perdona per deixar-te sol amb els misteris del ADN antic.

A la argentina más chévere, a mi Andrea, gracias por tu linda y sincera amistad y por esos *Streptos* que tanto buscamos en el pasado de España y de América... Che, cariño, sos grande!

A Nancy... primero que todo por la profundidad que le das al concepto de amistad, gracias por ser mi gran amiga y además por cuatro años intensos, llenos de desesperanzas, alegrías, triunfos y fracasos, porque algún día, ya verás... le daremos la mano al Carlos Gustavo.

A quien más me ha ayudado a sobrevivir lejos de casa, quien me enseñó mis primeras y únicas palabras en catalán, quien me ha dado toda la ingenuidad y amor de niño, a ti Juan Carlos... por todo tu cariño. Sabes? La bruja aburrida te quiere un montón.

Del otro lado del charco pero siempre en mi corazón, le doy infinitas gracias

A mis padres, consecuentes, amorosos, abnegados y orgullosos, porque son lo más hermoso que tengo y a mi valiente hermana, la que ha tenido que aguantar el chaparrón de todo, a ti mi niña mamá, mi consentida y a mis Marías... a todas mis Marías.

A Luis, porque al fin parece que el viento sopla a favor, por todo lo que nos debemos, por el amor, por la impaciencia, por la espera, por las ilusiones, por los sueños... por todo, mi amor... por la felicidad, como siempre... un *TACH* para ti.

A Guadalupe, Montserrat y Coromoto por ser mis intercesoras ante Dios... Mi Señor, mi guía y mi luz en todo momento.

y Al ejercito de oradores que siempre está pendiente de mi.

A todos gracias

EDU...

Presentación.

Este trabajo es una contribución al estudio de la diversidad genética en las poblaciones americanas. Hemos analizado, mediante la metodología del DNA antiguo, restos esqueléticos de yacimientos mesoamericanos de tres épocas distintas, con dataciones que se ubican desde la sociedad azteca prehispánica (post-clásico tardío) a la colonia del Virreinato de la Nueva España, con la finalidad de inferir, desde la visión de los linajes maternos, la dinámica de las poblaciones del Valle Central de México y el posible aporte genético del contingente español y africano que llegó a tierras americanas, específicamente a México, desde finales del siglo XVI. Para ello, se estudiaron los marcadores del DNA mitocondrial a partir de restricción enzimática y de la secuenciación de la región hipervariable I, que han sido comparados con datos de poblaciones actuales y antigua de América y Asia; y de esta manera, situar en el contexto poblacional americano las muestras antiguas del Valle Central mexicano.

Contenido.

1. Introducción.	1
1.1. Poblamiento de las Américas.	4
1.2. Mesoamérica.	13
1.2.1. Los aztecas y la conquista española.	15
1.3. Análisis genéticos en poblaciones humanas.	19
1.3.1. DNA Mitocondrial.	20
1.3.1.1. Propiedades del DNA mitocondrial.	24
1.3.1.2. Linajes del DNA mitocondrial.	26
1.3.1.2.1. Linajes del mtDNA en África.	27
1.3.1.2.2. Linajes del mtDNA en Europa.	29
1.3.1.2.3. Linajes del mtDNA en Asia.	30
1.3.1.2.4. Linajes del mtDNA en Oceanía y América.	31
1.3.2. Marcadores del cromosoma-Y.	32
1.3.3. STRs de cromosomas autosómicos.	34
1.4. Diversidad genética en Nativos americanos.	36
1.4.1. Diversidad del DNA mitocondrial.	36
1.4.1.1. Distribución de haplogrupos mitocondriales americanos.	36
1.4.2. Diversidad del cromosoma-Y y de STRs autosómicos	42
1.5. DNA antiguo.	44
1.5.1. Contaminación con DNA exógeno.	50
1.5.2. Daño <i>post-mortem</i> del material genético.	54
2. Objetivos.	59
2.1. Objetivo general	61
2.2. Objetivos específicos	61
2.2.1. Objetivos metodológicos.	61
2.2.2. Objetivos poblacionales y filogenéticos.	62
3. Materiales y Métodos.	65
3.1. Muestra.	67
3.2. Método.	69
3.2.1. Extracción y purificación de DNA.	72
3.2.2. Caracterización genética.	76
3.2.2.1. Región codificante.	76
3.2.2.2. Región hipervariable I.	81
3.2.2.3. STRs autosómicos.	85
3.3. Tratamiento Estadísticos.	86

3.3.1. Análisis intrapoblacional.	86
3.3.2. Análisis interpopulacional.	87
4. Resultados.	91
4.1. Consideraciones sobre la metodología.	93
4.2. Análisis intrapoblacional.	95
4.2.1. Región codificante (RFLPs).	96
4.2.1.1. Frecuencias de haplogrupos	100
4.2.2. Región de control (HVI-mtDNA).	101
4.2.2.1. Diversidad entre secuencias.	105
4.2.2.2. Filogenia entre secuencias.	106
4.2.2.3. Posibles relaciones familiares.	112
4.3. Análisis interpopulacional.	114
4.3.1. Distribución de frecuencia de haplogrupos.	115
4.3.1.1. Diversidad genética.	121
4.3.1.2. Análisis de componentes principales.	124
4.3.1.3. Prueba exacta de diferenciación poblacional.	127
4.3.1.4. Distancia genética.	130
4.3.2. Secuencias de la región HVI.	135
4.3.2.1. Índices de diversidad.	136
4.3.2.2. Linajes propios.	139
4.3.3. Reconstrucciones filogenéticas.	141
4.3.3.1. Distancias genéticas.	141
4.3.3.2. Median Joining Network.	144
4.3.3.3. Haplotipos compartidos.	151
4.4. Análisis de DNA nuclear – (STRs autosómicos).	157
5. Discusión.	159
5.1. Consideraciones sobre la metodología.	161
5.2. Análisis filogenéticos y poblacionales.	170
5.2.1. Serie precontacto.	171
5.2.2. Serie contacto.	173
5.2.3. Serie post-contacto.	174
5.2.4. Las series antiguas del Valle Central de México y las poblaciones de comparación.	177
5.2.4.1. Frecuencias de haplogrupos.	177
5.2.4.2. Secuencias HVI.	179
5.3. STRs autosómicos.	186
6. Conclusiones.	189
6.1. En relación a la metodología.	191
6.2. En relación a los análisis poblacionales y filogenéticos.	192
7. Bibliografías.	195

Abreviaturas.

•O₂: *Peroxide radical*

•OH: *Hydroxyl radical*

A: Adenina

a.C.: antes de Cristo

aDNA: *ancient DNA*

BP: *before present*

C: Citocina

CODIS: *Combined DNA Index System*

CP: Comunicación Personal

CRS: *Cambridge Reference Sequence*

d.C.: después de Cristo

D-loop: mitochondrial Displacement loop

DNA: *Deoxyribonucleic Acid.*

F: *Primer Forward*

G: Guanina

HVI: Región hipervariable I del DNA mitocondrial

HVII: Región hipervariable II del DNA mitocondrial

H: *mitochondrial DNA Heavy strand*

ISFG: *International Society of Forensic Genetic*

KE: Blanco de Extracción

K⁻: Blanco de Amplificación

L: *mitochondrial DNA Light strand*

mtDNA: *mitochondrial DNA*

nDNA: *nuclear DNA*

NR1Y: *Nonrecombining portion of the Y-Chromosome*

O_H: *mitochondrial origin of H strand replication*

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

R: *Primer Reverse*

RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

STRs: *Short tandem repeats*

SNPs: *Single nucleotide polymorphisms*

T: Timina

UV: luz ultravioleta

YHRD: *Y-Chromosome Haplotype Reference Database*

Unidades de medida:

μl: microlitro

μg: microgramo

g: gramo

Km: Kilómetro

mg: miligramo

ml: miliitro

mM: milimolar

rpm: revoluciones por minutos

pmol: picomol

Reactivos:

BSA: Bovine Serrum Albumin

dNTPs: deoxyribonucleotide bases

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

HCl: Ácido Clorhídrico

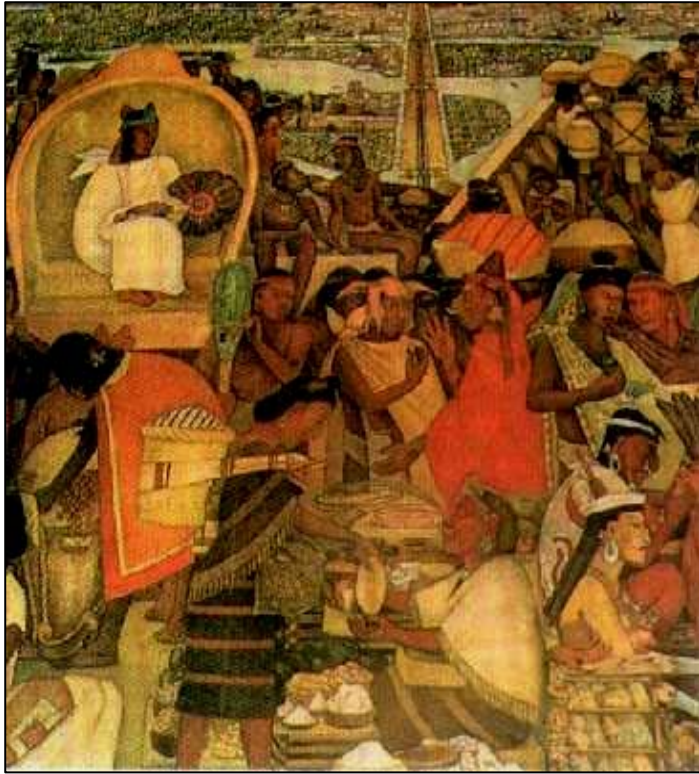
Mg₂Cl: Cloruro de Magnesio

SDS: Dodecil sulfato de sodio

PK: proteinasa K

Taq: *Termus aquaticus*

Tris: Hidroximetil aminometano



Tlatelolco
Diego Rivera 1945

1. Introducción

1. Introducción.

Gran parte de la historia demográfica de las poblaciones humanas fue estudiada recurriendo a registros y documentos históricos y desde luego a datos arqueológicos y culturales. Posteriormente, los marcadores genéticos clásicos mostraron la potencia de las investigaciones genéticas y finalmente el estudio de marcadores del ácido desoxirribonucleico (DNA) ha venido a enriquecer y complementar los estudios previos, muy especialmente el análisis de los marcadores del DNA mitocondrial (mtDNA) y del cromosoma Y. Estos estudios han clarificado varios aspectos sobre migraciones dentro de los continentes y entre los continentes, relacionados con teorías lingüísticas y arqueológicas tradicionales. En este sentido, muchas de estas nuevas evidencias genéticas han sido dirigidas específicamente a dilucidar el controvertido origen de los Nativos americanos, sus rutas migratorias y la estimación del o de los tiempos en que ocurrieron las migraciones.

Por otra parte, los avances en el estudio del DNA y en especial de las técnicas de DNA antiguo (aDNA) han permitido analizar material genético extraído a partir de restos arqueológicos con diferentes dataciones, como lo demuestran, entre otros, los trabajos de Stone & Stoneking (1993; 1998; 1999); Lalueza *et al.* (1997; 2003); Malhi *et al.* (2003; 2004) en distintas poblaciones a lo largo del continente americano, y los trabajos de González-Oliver *et al.* (2001) y Kemp *et al.* (2005) específicamente en poblaciones antiguas mexicanas. Estos estudios están contribuyendo a aclarar recientes migraciones dentro del continente, el efecto del contacto europeo en la estructura genética americana, la continuidad temporal entre poblaciones antiguas y contemporáneas, además de otros aspectos relacionados con el origen de los Nativos del Nuevo Mundo.

Como un aporte al conocimiento de la variabilidad genética entre individuos americanos y de los cambios producidos después del Descubrimiento de América, en este trabajo analizamos los marcadores del mtDNA en restos humanos antiguos mesoamericanos, hallados en cuatro yacimientos del Valle Central de México, dentro

del contexto cultural azteca y sus relaciones filogenéticas con otros grupos de Nativos americanos antiguos y contemporáneos.

Enmarcando este estudio en la problemática de la dinámica de las poblaciones americanas, a continuación se describirán algunos aspectos relacionados con el poblamiento de las Américas, así como también se considerarán aspectos referentes al proceso histórico que define el área geográfica de Mesoamérica y de la cultura azteca, a la que pertenecen las muestras analizadas.

Seguidamente, se especificarán los diversos tipos de análisis genéticos a partir de los cuales se infiere la historia evolutiva de las poblaciones humanas, especialmente del genoma mitocondrial (marcadores del mtDNA) y del genoma nuclear (marcadores del cromosoma Y y STRs de los cromosomas autosómicos) y además, la diversidad genética en Nativos americanos, punto de interés en este trabajo. Finalmente, se realizará una breve reseña histórica sobre los avances en la metodología del DNA antiguo, incluyendo algunos resultados significativos para la comunidad científica; asimismo, se describirán, de manera general, las principales dificultades a las cuales se enfrentan estos procedimientos, tales como la contaminación con DNA exógeno y el daño *post-mortem* del material genético.

1.1. Poblamiento de las Américas.

Uno de los más polemizados sucesos de colonización humana en el pasado, ha sido, sin lugar a duda, el poblamiento del Nuevo Mundo (Zegura *et al.* 2004). Éste es un tema de intenso interés para investigadores de diferentes campos, incluido por supuesto, el genético. Alrededor de este hecho se han planteado diferentes teorías, de las cuales, es generalmente aceptado que la primera colonización de América se realizó desde Eurasia por el estrecho de Bering, a través de un “puente” intercontinental llamado Beringia, que uniría temporalmente a los dos continentes (Dixon 1993), (figura 1.1). Sin embargo, también se habían propuesto varias rutas alternativas, como trayectos transatlánticos (Cottevieille-Giraudet 1931), transpacíficos (Heyerdhal 1953) y transantárticos (Corrêa 1928).



Figura 1.1. Mapa del Estrecho de Bering que une Asia con América.
Tomado de www.geocites/latrinchera2000/poblamiento

En el Cuaternario, la Tierra sufrió una serie de cambios climatológicos llamados glaciaciones (edad de hielo o Pleistoceno). Se cree que el poblamiento de las Américas pudo suceder o bien antes de la última de estas glaciaciones (Glaciación de *Wisconsin*) o después de la misma, inclusive se ha sugerido una posible ocupación de territorio americano durante la glaciación (Fedje 2002 citado por Schurr & Sherry 2004). De cualquier manera, en algún lugar de Siberia se encuentra el hogar ancestral de los americanos. Son muchas las investigaciones que indican que Beringia fue la única ruta por la cual cazadores-recolectores siberianos llegaron al Nuevo Mundo, llevando consigo utensilios de piedra y otras herramientas típicas de mediados y finales del periodo Paleolítico (Owen 1984; Dixon 1993; Eshleman *et al.* 2003).

La afinidad entre asiáticos y Nativos americanos está bien establecida, y se basa en similitudes culturales, morfológicas y genéticas (Crawford MA, 1998). Sin embargo, el tiempo exacto, el lugar específico de origen y el número de oleadas migratorias, no han podido ser resueltos.

Así por ejemplo, la extraordinaria diversidad lingüística y rasgos morfológicos entre los grupos indígenas americanos sugirieron la posibilidad de múltiples colonizaciones (teoría del origen múltiple). Sin embargo, en el año 1986, el lingüista Joseph Greenberg, el antropólogo dental Christy Turner II y el genetista Stephen Zegura publicaron su hipótesis sobre el modelo tripartito, basado en la propuesta de

que todos los Nativos americanos pudieran ser asignados a tres distintos grupos lingüísticos: los Amerindios, los Na-Denes y los Esquimo-aleutianos, y que tuvieron origen en tres migraciones distintas y separadas desde Asia: La primera, que dio origen al estrato demográficamente más importante, los Amerindios, distribuidos por todo el continente; la segunda a los Na-Denes localizados en Alaska, la Costa Norte del Pacífico y una pequeña área del suroeste de Norteamérica; y la última a los Esquimo-aleutianos que poblaron el Sur del Ártico. No obstante, las posibles correspondencias entre grupos lingüísticos y el *pool* genético de la población americana actual han sido estudiadas por muchos investigadores en diferentes regiones del mundo, con resultados ambiguos, que no han permitido definir con exactitud esta supuesta relación (Torroni *et al.* 1992; Bonatto & Salzano 1997; Fagundes *et al.* 2002; Hunley & Long 2005).

A pesar de la amplia aceptación inicial de la propuesta de las tres grandes oleadas migratorias, esta ha sido cuestionada por un gran número de estudios desde diversas disciplinas, incluso autores de la propuesta tripartita hoy rechazan este supuesto (Bonatto & Salzano 1997; Zegura *et al.* 2004; Neves & Hubbe 2005; González-José *et al.* 2005). Es por ello que se ha intentado explicar el poblamiento de América desde la concepción de la existencia de dos migraciones separadas e independientes: la primera, más antigua, formada por los denominados paleoamericanos, la segunda y más moderna establecida por los amerindios, llamados también paleoindios que, posiblemente, reemplazaron o se mezclaron con los primeros (Neves & Pucciarelli 1990; Pucciarelli 2004).

Asimismo, los datos de la región NRY (*Nonrecombining portion of the Y-Chromosome*) han sugerido diferentes modelos que explican la colonización de las Américas desde la visión de los linajes paternos (Karafet *et al.* 1999; Santos FR, *et al.* 1999; Lell *et al.* 2002; Tarazona-Santos & Santos 2002), en contraste con los primeros modelos sugeridos desde los datos obtenidos a partir del mtDNA (Wallace *et al.* 1985; Torroni *et al.* 1992; 1994b).

En tal sentido, Zegura y colaboradores (2004), analizaron una muestra de más de 2000 individuos de América, Asia y Europa con la finalidad de investigar el origen de los linajes paternos en Nativos americanos. Este estudio sostiene la

hipótesis que la colonización del continente se llevó a cabo en una sola migración, y que además, tuvo su origen geográfico en la región de *Altai Mountains*, al suroeste de Siberia (figura 1.2); además, estos datos están en concordancia con los resultados acerca del posible origen geográfico de los Nativos americanos de Karafet *et al.* (1999) utilizando polimorfismos binarios y STRs del NRY, a pesar de que este autor favorece el escenario de dos oleadas migratorias, y de Derenko *et al.* (2000; 2001) basados en el análisis del mtDNA.

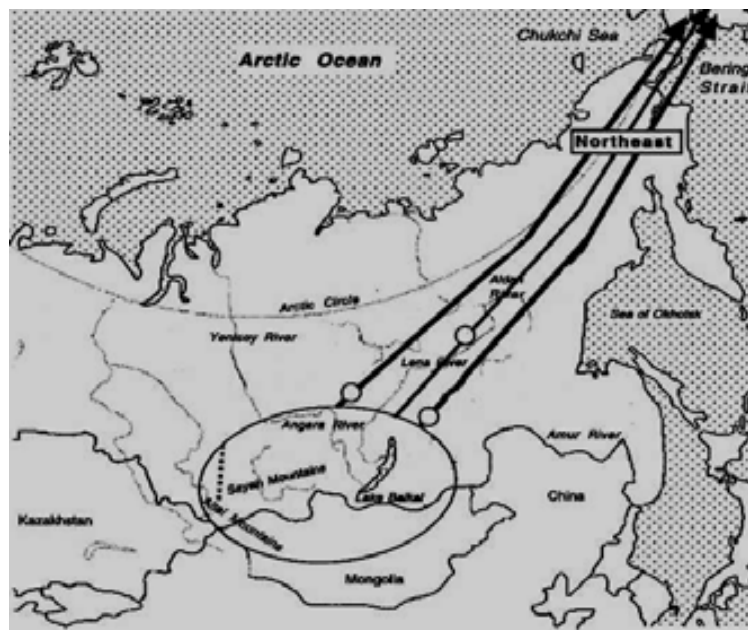


Figura 1.2. Modelo alternativo para el origen de los haplogrupos fundadores del cromosoma Y del Nuevo Mundo.
Modificado de Karafet *et al.* 1999.

En concordancia a lo propuesto por Zegura *et al.* (2004); Hunley & Long (2005), publicaron un análisis de más de 1000 secuencias de la región hipervariable I (HVI) del mtDNA, de 17 diferentes poblaciones de Nativos americanos; los autores rechazan la teoría propuesta por Greenberg, Turner y Zegura en el año 1986, que los ancestros Amerindios, Na-Denes y Esquimo-aleutianos migraron a las Américas en tres oleadas independientes, separadas en el tiempo por miles de años.

Los datos genéticos obtenidos de poblaciones antiguas americanas no son aún suficientes para respaldar de manera incuestionable una de las hipótesis. Por

otra parte, se han reportado pocos trabajos en restos humanos antiguos en Siberia, como los análisis genéticos realizados por el grupo de Estrasburgo, en Francia, que han publicado varios estudios en restos esqueléticos recuperados en distintas áreas geográficas y con diversas dataciones (Ricaud *et al.* 2004a; 2004b; 2005). Tal es el caso del análisis genético de dos esqueletos de 2500 años de antigüedad recuperados en el Valle de Sebyŕstei (en la región de Altai). Uno de estos individuos presenta 5 sitios polimórficos en la secuencia del HVI, pertenecientes al haplogrupo F2a y la secuencia del segundo individuo contiene sustituciones nucleotídicas que se corresponden con el haplogrupo D (Ricaud *et al.* 2004b), datos que, obviamente, no son suficientes para inferir ningún tipo de relación con el origen de los Nativos americanos.

Por otra parte, Mooder y colaboradores (2006), analizan dos series neolíticas en el suroeste de Siberia, utilizando la combinación de los análisis de restricción en la región codificante del mtDNA y la secuenciación de la región HVI, encontrando representación de los haplogrupos A, C y D además de F, G2a y U5a, con estos datos se infirieron relaciones filogenéticas entre series antiguas y contemporáneas del área geográfica de referencia.

Recientes estudios morfológicos (Neves & Hubbe 2005; González-José *et al.* 2005) soportan el modelo de que los primeros pobladores fueron los paleoamericanos, cuyas características craneofaciales no son típicas ni de individuos del este asiático, ni de americanos modernos. Los autores proponen el supuesto de un ancestro común para paleoamericanos y australianos, que salieron de algún lugar al sureste de Asia y llegaron a Australia hace 50000 años y a las Américas unos 14000 años antes del presente (BP), (figura 1.3), planteando de esta manera, otro posible escenario sobre la polémica colonización americana (Hubbe *et al.* 2003).

Este modelo de colonización explicaría los hallazgos arqueológicos y antropológicos más antiguos de 11000 años encontrados en México (González-José *et al.* 2005) y en el sur americano (Dillehay *et al.* 2003; Dillehay 2004). Es evidente que faltan muchos estudios para aclarar los intensos debates sobre el origen del Nuevo Mundo y que seguramente la multidisciplinaridad, incluida las investigaciones con aDNA, ayudarán a dilucidar algunas de estas incógnitas.

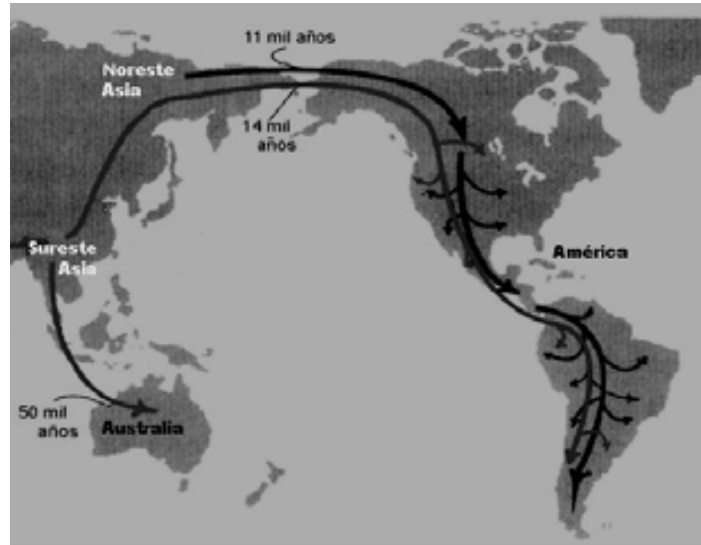


Figura 1.3. Modelo que soporta el origen común de paleoamericanos y australianos.
Modificado de Hubbe *et al.* 2003, citado por Pucciarelli *et al.* 2004.

Independientemente de la localización de los ancestros americanos en la geografía asiática y de cuantas oleadas migratorias necesitaron para establecerse en el Nuevo Mundo, lo más probable es que los colonizadores cruzaron Beringia y se dirigieron hacia el Sur. Las investigaciones han planteado dos posibles rutas: La primera propone que los nuevos pobladores descendieron desde el Ártico siguiendo la Costa del litoral Pacífico (Fladmark 1979; Fix 2002), propuesta respaldada por datos genéticos aportados por Fix (2005); y la segunda que atravesaron el interior continental por el llamado corredor sin hielo (*ice-free corridor*), que tendría un ancho de aproximadamente 50 kilómetros (km) y una longitud de 1000 km, localizado en la región centro-oeste de Canadá entre las Montañas Rocosas (Dixon 1999); a través de este corredor, posiblemente, los colonizadores avanzaron hacia el Sur de América (Fiedel 2000).

El concepto de *Ice-free corridor* ha sido utilizado para tratar de explicar los descubrimientos de evidencias arqueológicas en algunas regiones del continente, con posibles dataciones anteriores a 11500 años BP. Sin embargo, en estudios recientes se ha cuestionado esta concepción y se ha intentado demostrar que el área de Beringia y el resto del continente estuvieron separados hasta hace aproximadamente 11000 años, cuando los glaciales comenzaron a disolverse

permitiendo el desplazamiento de los nuevos pobladores hacia latitudes más bajas de Norte América (Jackson & Duk-Rodkin 1996), (figura 1.4).

Los hallazgos sobre las primeras migraciones son muy escasos. Los testimonios que se desprenden del estudio comparativo de las lenguas aborígenes, sugirieron la posibilidad de que la primera migración tuviera lugar hace aproximadamente 30000 años BP. No obstante, pruebas más directas procedentes de yacimientos arqueológicos, sitúan este hecho algo más tarde. Hasta hoy, los hallazgos casi incuestionables de entre 11000 y 12500 años proporcionan vestigios de la presencia humana en América; sin embargo, no se pueden desestimar los hallazgos con dataciones anteriores. Los estudios de estos yacimientos han permitido conocer que los primeros pobladores no sólo se especializaban en la caza del mamut o del bisonte, sino que también ya tenían estrategias diversificadas de supervivencia.

La ocupación gradual del territorio americano permitió a los grupos humanos crear culturas diferenciadas que se adaptaron a zonas climáticas que van desde los hielos del ártico hasta la selva tropical, pasando por cordilleras y valles en toda América. Este proceso de adaptación y desarrollo cultural está registrado por restos arqueológicos que se ubican a lo largo y ancho del continente, y se demuestra por primera vez en Estados Unidos donde se han hallado una secuencia de instrumentos de matanzas denominados puntas Clovis¹ (Adovasio & Page 2003), (figura 1.5).

Las puntas Clovis se relacionan con restos de mamut y forman parte de un complejo de utensilios que incluyen: cuchillas prismáticas, lascas, raederas y objetos de hueso y marfil (Tankersley *et al.* 1990). El uso de estas puntas se expande desde 11500 a 9500 años BP y se asocian a pequeños grupos de cazadores de grandes herbívoros como el mamut imperial. Para muchos investigadores la cultura Clovis define a los primeros pobladores del continente y se han encontrado evidencias de su paso por América, en el sur de Canadá y en grandes extensiones en los Estados Unidos (Ceca de Clovis, Nuevo México; *St. Clair County*, Illinois; *Wyandot County*, Ohio; entre otros yacimientos).

¹ Tipo de punta de jabalina de base cóncava y con acanaladuras en una o dos de sus caras.

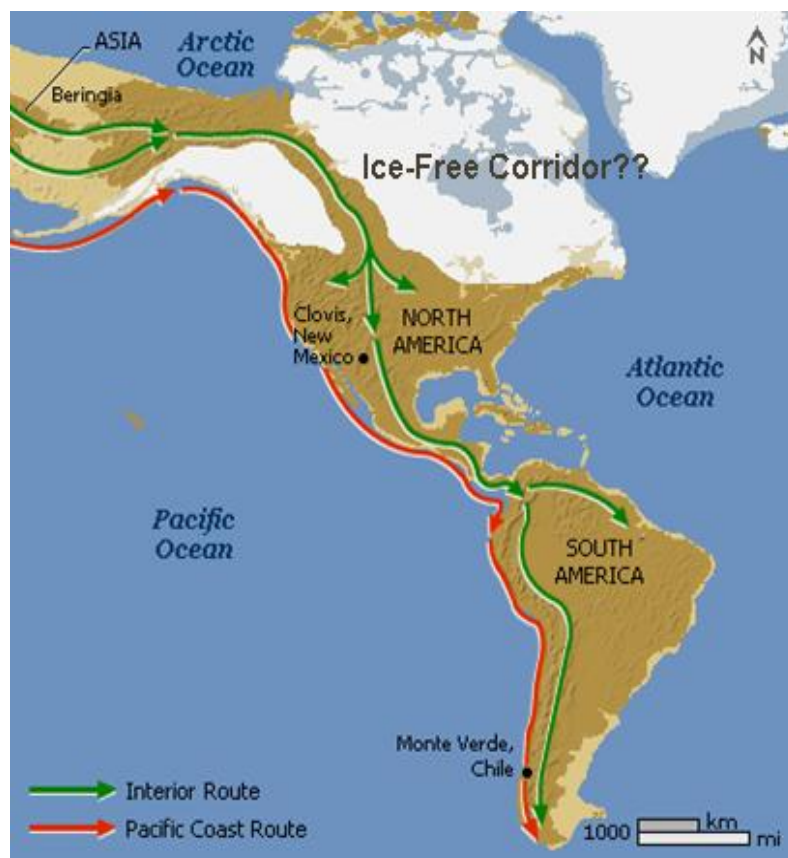


Figura 1.4. Modelo de las posibles rutas de colonización.
Tomado de http://encarta.msn.com/encyclopedia_701509129_2/First_Americans.html



Figura1.5. Puntas Clovis de Bostrom site St. Clair County, Illinois.
Tomado de <http://www.mundofree.com/origenes/america.htm>

La tradición Clovis fue desplazada por la cultura Folsom, caracterizada por puntas de flechas más acanalada, ligera y pequeña, quizás como respuesta a la adaptación a la caza de animales más pequeños como el bisonte, según se ha podido comprobar en *Debert and Belmont, Colchester Country* (Davis 1991). Su distribución cronológica abarca desde 11200 a 10600 años BP. Asimismo, en Mesoamérica, son muchos los yacimientos en los que se han detectado el uso de puntas de proyectil. En esta área geográfica, estos instrumentos no se relacionan únicamente con la caza de grandes herbívoros, sino que se combinan con utensilios de molienda asociados al uso de algunas semillas, indicando otras posibilidades de subsistencia como el consumo de productos vegetales.

En México, entre los hallazgos arqueológicos más significativos está el yacimiento de Hueyatenco, en los alrededores de la presa de Valsequillo-Puebla, donde se encontraron restos de mamuts, mastodontes, camélidos, caballos y antílopes junto con raspadores que sustentan la posible presencia humana, y que han sido datados entre 20000 a 22000 años BP. Incluso, en esta misma zona, se ha determinado el hallazgo de la huella de un pie humano, con dataciones que superan los 40000 años BP y que, obviamente, han sido seriamente cuestionadas (Renne *et al.* 2005).

En el estado de Tamaulipas, en la Cueva del Diablo, se encontró un hueso de caballo con varios útiles de piedra de 12000 años BP, además de las puntas foliáceas llamadas Lerma. Otro hallazgo importante fue el de Tequixquiac, en el valle de México; se trata del "Sacro de Tequixquiac", es el hueso sacro de un camélido datado entre 12000 a 14000 años BP, el cual tiene tallada la cara de un animal. Asimismo, fue encontrada una punta de sílex² entre las costillas de un elefante, además de cuchillos y raederas en Tepexpan, Santa Isabel Iztapan (García-Bárcena 1998).

En América del Sur, los hallazgos más antiguos están comprobados con precisión, y se definen por dos tradiciones básicas que surgen poco antes de 10000 años BP. En primer lugar las puntas de cola de pescado, que aparecen desde el Lago

² Roca de origen sedimentario compuesta por sílice.

Madden en Panamá hasta la Cueva Fell en la Patagonia, con sus variaciones regionales, como el yacimiento de El Jobo en el estado Falcón, Venezuela, y el Ayampitín cerca de la Pampa Argentina; y en segundo lugar las puntas de tipo lanceolado, de origen más septentrional, como las detectadas en diversas zonas de Ecuador y Perú. Asimismo, en las cuevas de Lagoa Santa en Brasil, hay pruebas de ocupación humana desde hace 9600 años BP, cuyas características craneales sugieren un origen pre-mongoloide (Neves *et al.* 1998; Hubbe *et al.* 2003).

La cueva de Taima-Taima en Venezuela, excavada por José Cruxent en los años 60s y luego por Ruth Gruhn y Allan Bryan en los años 70s, ha sido datada entre 13000-12000 años (Bryan *et al.* 1978). Igualmente, en 1976, fue descubierto el asentamiento humano, quizás, más antiguo del continente americano, en Monte Verde, Chile (Dillehay 2004). En este sitio se encontraron indicios de presencia humana con una antigüedad de 13000 años BP, mil años más que los atribuidos a la cultura Clovis de Nuevo México, Estados Unidos; sin embargo, estas dataciones han sido cuestionadas por otros investigadores (Gibbons 1997).

A pesar de las críticas, estos hallazgos han obligado a reconsiderar la supuesta expansión de los colonizadores a través del corredor sin hielo hace 11000 años y, por tanto, la presencia humana en Norte América, anterior a 15000-20000 años BP (Dillehay & Pino 2000), o bien, la posible entrada de los paleoamericanos por la cuenca de México y su desplazamiento desde allí por dos rutas: una hacia el Norte, lo que se corresponde con los hallazgos en Baja California y la otra hacia el Sur, que explicaría los asentamientos con dataciones anteriores a 12000 años, como el de Monte Verde (Pucciarelli *et al.* 2004).

1.2. Mesoamérica.

El concepto de Mesoamérica se utiliza para designar un contexto cultural, histórico y geográfico de más de un millón de km², delimitado por el norte por el río Sinaloa al noreste de México y las cuencas del Lerma y Soto de la Marina en la Costa del Golfo y por el sur por el río Ulúa en el Golfo de Honduras y Punta Arenas en

Costa Rica (Carmack *et al.* 1996). En esta región florecieron las más importantes civilizaciones prehispánicas, desde los Olmecas, en lo que hoy es el sur de Veracruz y Tabasco; los Mayas en la Península de Yucatán, Chiapas, Guatemala, Belice y Honduras; los Mixteco-Zapotecas en lo que hoy es el estado de Oaxaca; los Totonacas al norte de Veracruz; y los Toltecas y Aztecas en el altiplano mexicano (Valle Central de México), (figura 1.6).

En Mesoamérica se desarrolló un modelo de civilización donde las diferentes culturas compartieron rasgos básicos, tales como: la utilización de un calendario ritual de 260 días, un sistema social estratificado basado en el prestigio, el cultivo de maíz, calabaza, frijol y chile como recursos básicos de subsistencia, la confección de libros manuscritos elaborados en pergamino de amate³ y la construcción de estructuras piramidales, entre otras características.

La historia prehispánica de Mesoamérica ha sido dividida en cinco grandes períodos (Willey & Phillips 1953):

- Lítico: ¿? - 7500 años antes de Cristo (a.C.).
- Arcaico: 7500 - 2500 años a.C.
- Pre-Clásico o Formativo (temprano, medio y tardío): 2500 años a.C. – 1 después de Cristo (d.C.).
- Clásico o Teocrático (temprano y tardío): 1 d.C - 750/1000 d.C. y
- Post-Clásico o Militarista (temprano y tardío): 750/1000 – 1521 d.C.

La historia mexicana, descrita por diversos investigadores como Leonardo López Luján (López Luján & Manzanilla 1995; López & López Luján 2001), sugiere que México fue el asentamiento de algunas de las civilizaciones más antiguas y desarrolladas del hemisferio occidental. La primera civilización mesoamericana importante fueron los Olmecas, quienes tuvieron su época de mayor progreso entre 1500 y 600 a.C. (Período Pre-Clásico), lo cual se manifestó claramente en el

³ Las culturas del altiplano de México recolectaban la corteza del árbol de amate, la maceraban y elaboraban láminas delgadas con la pulpa de la corteza, de diferentes formas y espesor en función del propósito destinado al papel (para escritura o para elaborar adornos). Después procedían a secar al sol las láminas, que una vez secas adquirían un color ocre claro a oscuro y una textura rugosa.

desarrollo de la tecnología y la creación de varios centros ceremoniales, cuyas características fueron la base del desarrollo cultural del área.

Los alcances tecnológicos como el cómputo del tiempo, los sistemas de riego, los depósitos de almacenamiento, entre otros, definieron la especialización del trabajo y un rígido control social por parte de un sector de la población que, a través del dominio religioso, ejerció una dirigencia absoluta sobre la comunidad, convirtiéndose así en lo que se conoce como grupo sacerdotal; este período es conocido como Época Clásica. Las culturas de Teotihuacan en el altiplano mexicano, Monte Albán en Oaxaca y los mayas del sureste de México, corresponden a esta etapa.

El período Post-Clásico estuvo marcado por constantes guerras de dominación, con la principal intención de formar imperios, cuya base económica se sustentaba en la imposición de tributos, de esta manera expandieron sus campos de cultivo y se apropiaron de grandes riquezas. Los líderes guerreros se impusieron sobre los diversos sectores sociales y los mismos sacerdotes, que marcaron el período Clásico, quedaron bajo su total control. Este grupo social dominó en la última etapa de la historia de las sociedades americanas antes de la conquista.

1.2.1. Los aztecas y la conquista española.

En el siglo X de nuestra era, los toltecas⁴ migraron desde el norte y establecieron su imperio en el valle de México. Fueron los fundadores de las ciudades de Tula y Tulancingo (al norte de la actual Ciudad de México) y desarrollaron una gran civilización todavía evidente por las ruinas de fastuosos edificios y monumentos. Posteriormente, en el siglo XI, los toltecas entraron en decadencia y abandonaron todo lo que hasta el momento habían construido. Para esa misma época, grupos nómadas, llamados chichimecas, se impusieron en la región central de México y dos siglos más tarde las tribus Nahuas llegaron al valle de México procedentes del norte. A partir de este momento, comenzó la cultura Azteca,

⁴ Tolteca era un gentilicio genérico, aplicado a todos los moradores de Mesoamérica. Deriva de la raíz Tol, que significaba en su origen 'tallo, junco', pero llegó a contener el sentido de 'persona culta'.

nombre que deriva de Aztatlán⁵ (tierra blanca), pueblo de origen Nahuatl y de carácter nómada que sucedieron y vencieron a otros pueblos de ese mismo origen, como los chichimecas, los toltecas y los tepanecas, (Gutiérrez de Hoyos & Muñoz [s.f.⁶]).

Los aztecas, más tarde llamados mexicas, fundaron un asentamiento denominado Tenochtitlán en una isla del lago Texcoco. Estos grupos, convirtieron el lecho del lago, que era poco profundo, en chinampas⁷ (figura 1.7), hicieron calles y puentes para conectar la ciudad con tierra firme, levantaron acueductos y excavaron canales para el transporte de mercancías y personas. Las construcciones religiosas eran gigantescas pirámides escalonadas recubiertas de piedra caliza y estuco de colores intensos, sobre las que se construían los templos que dominaban el paisaje (López Luján 1983).

Conforme el asentamiento crecía, su valor militar era mayor y los aztecas extendieron sus dominios a todo el valle. Hacia el siglo XV, llegaron a ser la principal potencia del centro y sur de México, su civilización, basada en la tolteca y chichimeca, fue muy desarrollada, tanto intelectual como artísticamente. La economía dependía básicamente de la agricultura, particularmente del cultivo del maíz y de los tributos que exigían a los pueblos dominados en la guerra, construyeron grandes ciudades y desarrollaron una complicada organización social, política y religiosa.

El Imperio Azteca (figura 1.8), prosperó como resultado de su ubicación estratégica y de su alto grado de organización, las estimaciones de la población indígena del valle de México oscilan entre cifras muy divergentes, lo que expresa la enorme dificultad que han tenido los investigadores para precisar la cantidad real de habitantes del México precolombino. El gran mercado de Tlatelolco atraía aproximadamente a unas 60000 personas diarias, las mercancías llegaban a manos aztecas gracias a los acuerdos sobre tributos establecidos con los territorios

⁵ Se dice que Aztatlán estaba situado en una isla de la laguna de Mexcaltitlan en la costa de Nayarit, lugar desde donde salieron los llamados aztecas.

⁶ sin fecha

⁷ Jardines muy fértiles, contruidos con un armazón de troncos que sostenían arena, grava y tierra de siembra, atados con cuerdas de ixtle, para lograr islas artificiales donde se cultivaban verduras y flores y se criaban aves domésticas.

conquistados. Muchas de esas mercancías se exportaban a otras zonas del Imperio Azteca y de América Central.



Figura 1.6. Mapa de Mesoamérica. El recuadro señala el área del Valle Central de México.
Tomado de FAMSÍ (Fundación para el fomento de los estudios de Mesoamérica, inc.)



Figura 1.7. Chinampas aztecas.
Tomado de http://mx.encarta.msn.com/media_461543847_761567955_-1_1/Chinampas_aztecas.html



Figura 1.8. Área geográfica del Imperio Azteca.

Tomado de http://es.encarta.msn.com/media_461556117_761567955_-1_1/Imperio_azteca_o_mexica.html

Sin embargo, esta época de gran esplendor también marco el declive de esta civilización. En el año 1519, Cuba ya era una colonia española y estaba gobernada por Diego Velásquez, quien envió una expedición bajo el mando del conquistador Hernán Cortés a tierras mexicanas. Cortés arribó a la costa oriental de México y avanzó junto a sus aliados indígenas, los tlaxcaltecas, en dirección a la gran capital Azteca, Tenochtitlán. Las luchas internas, como la gran matanza de Cholula y de Tlatelolco y las grandes epidemias, como la disentería o enfermedades europeas como viruela y sarampión, produjeron el colapso de la población indígena y debilitaron a los mexicanos; estos sucesos hicieron posible que para el año 1521, Cortés triunfara en su invasión. Como consecuencia directa de la conquista gradual del territorio mesoamericano, México paulatinamente se fue convirtiendo en una entidad denominada Virreinato de la Nueva España. A partir de este momento se afianzó un sistema colonial que controló a la población indígena del valle mexicano hasta el siglo XIX.

La conquista por parte de los españoles representó un choque entre dos civilizaciones. El orden colonial impuso una nueva estructura de poder y una forma de dominación totalmente diferente para la población que, hasta entonces, tenía identidad social y cultural, y que desde este momento se denominarían indígenas

(Gutiérrez de Hoyos & Muñoz [s.f.]). Se puede decir que, a partir de la instalación colonial de España en esta región, se detuvo la evolución mesoamericana en el Quinto Sol⁸. Desde entonces, comienza el gran mestizaje cultural y racial, -doña Marina, *la Malinche*, simboliza a la mujer indígena madre del primer mestizo-, y todo el proceso de aculturación trajo como consecuencia, que a lo largo del período colonial, no sólo convivieran indígenas y españoles, sino que, progresivamente se fueron incorporando a la sociedad colonial, los esclavos negros traídos de África.

Al final de la colonia española, tres siglos más tarde, el territorio mexicano presentaba un mosaico cultural extraordinario, donde la tradición mesoamericana, específicamente Azteca, no había sido totalmente sustituida, aunque indudablemente sí negada, dando como resultado una sociedad heterogénea en términos, culturales, ideológicos y obviamente genéticos.

1.3. Análisis genéticos en poblaciones humanas.

Muchos de los estudios sobre la evolución molecular humana se basan, fundamentalmente, en el análisis genético de polimorfismos en muestras poblacionales contemporáneas, a partir de los cuales se infiere la historia evolutiva de una población determinada. No obstante, el DNA antiguo (aDNA), como disciplina emergente, nos permite estudiar la variabilidad genética de poblaciones del pasado y de esta manera aproximarnos aún más al proceso histórico de las poblaciones. Por tanto, el aDNA nos ofrece la posibilidad de responder a grandes incógnitas sobre relaciones filogenéticas, antropológicas y culturales entre poblaciones humanas.

A partir de las investigaciones de los patrones de variación en las diferentes regiones funcionales y no funcionales del DNA, ha sido posible inferir los cambios demográficos y el impacto de la selección que han determinado esta variabilidad en el genoma. Los marcadores genéticos mas utilizados tanto en poblaciones actuales como antiguas proceden principalmente de uno de los sistemas genéticos haploides, el DNA mitocondrial, que ha aportado avances significativos no sólo en las teorías

⁸ El Quinto Sol corresponde al tiempo y dominio de los aztecas, de ahí que este pueblo lo venerara como su deidad guía.

sobre el origen del hombre, sino también, en el estudio de la dinámica de las poblaciones humanas.

Por otra parte, más recientemente se han incluido en los estudios poblacionales el segundo sistema genético haploide, el cromosoma Y, que junto al mtDNA aportan la genealogía materna y paterna, de manera que ambos se complementan. Igualmente, los marcadores genéticos de los cromosomas autosómicos (microsatélites o STRs: *Short tandem repeats* y las posiciones polimórficas puntuales o SNPs: *Single nucleotide polymorphisms*), también revelan una gran variabilidad entre poblaciones. En tal sentido, se describirán los conceptos básicos de estos sistemas, especialmente del DNA mitocondrial que por sus características particulares, es el más utilizado en el estudio de la variabilidad genética en poblaciones antiguas.

1.3.1. DNA mitocondrial.

Cada mitocondria posee de 2 a 10 moléculas de DNA y cada célula somática tiene un gran número de mitocondrias, por lo cual, en cada una de estas células se encuentran cientos de miles de copias de mtDNA (Shuster *et al.* 1988). Esta característica, llamada poliplasmia, posiblemente determina la mejor preservación del genoma mitocondrial a través del tiempo, siendo más fácil de recuperar en restos antiguos que el DNA nuclear (nDNA). Es por ello, que las investigaciones con aDNA en genética de poblaciones humanas, se basan fundamentalmente en el estudio de la variabilidad del mtDNA (Stone & Stoneking 1993; Montiel 2001; Keyser-Tracqui *et al.* 2003; Lalueza-Fox *et al.* 2003; Díaz *et al.* 2004; Mooder *et al.* 2006, entre otros, tanto en poblaciones americanas, asiática como europeas). No obstante, más recientemente, se han publicado trabajos sobre marcadores autosómicos y Cromosoma Y que complementan los análisis del mtDNA en material arqueológico (Gerstenberger *et al.* 1999; Keyser-Tracqui *et al.* 2003).

El genoma mitocondrial es una molécula duplo-helicoidal circular cerrada, formada por dos regiones bien definidas (región codificante y región de control),

presenta una cadena pesada (H-*Heavy strand*) rica en guaninas (G) y una cadena ligera (L-*Light strand*) rica en citocinas (C) y está formada por ± 16569 pares de bases (pb), (figura 1.9). La numeración de las bases comienza de forma arbitraria en el origen de replicación de la cadena pesada (O_H), ubicándose la posición 1 en la parte media de la región de control.

Aproximadamente el 90% del genoma corresponde a la región codificante, con 37 genes, (28 codificados en la cadena pesada [H] y 9 en la cadena ligera [L]), para:

- 13 subunidades del sistema de fosforilación oxidativa:
 - o 7 del complejo I – NADH deshidrogenasa (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6).
 - o 1 del complejo III - Citocromo b oxido-reductasa.
 - o 3 del complejo IV - Citocromo c oxidasa (COI, COII, COIII).
 - o 2 del complejo V – ATP sintetasa (ATPasa6, ATPasa8).
- 2 RNAs ribosomales:
 - o 12S rRNA y 16S rRNA.
- 22 RNAs de transferencia, distribuidos entre las dos cadenas (H y L):
 - o tRNA-Ala; tRNA-Arg; tRNA-Asn; tRNA-Asp; tRNA-Cys; tRNA-Gln; tRNA-Glu; tRNA-Gly; tRNA-His; tRNA-Ile; tRNA-Leu; tRNA-Lys; tRNA-Met; tRNA-Phe; tRNA-Pro; tRNA-Ser; tRNA-Thr; tRNA-Trp; tRNA-Tyr y tRNA-Val, que transportarán los 20 aminoácidos que se incorporan a la estructura de las proteínas durante la traducción en las mitocondrias. Obviamente, existen dos aminoácidos que pueden ser llevados por una pareja de tRNAs distintos; es el caso de los tRNAs para la serina y de los tRNAs para la leucina (Helm *et al.* 2000).

El resto de las enzimas que intervienen en el metabolismo mitocondrial se codifican en el nDNA, se sintetizan en los ribosomas citoplasmáticos y son importadas a las mitocondrias, razón por la cual este orgánulo no es totalmente autónomo (Enríquez *et al.* 1998).

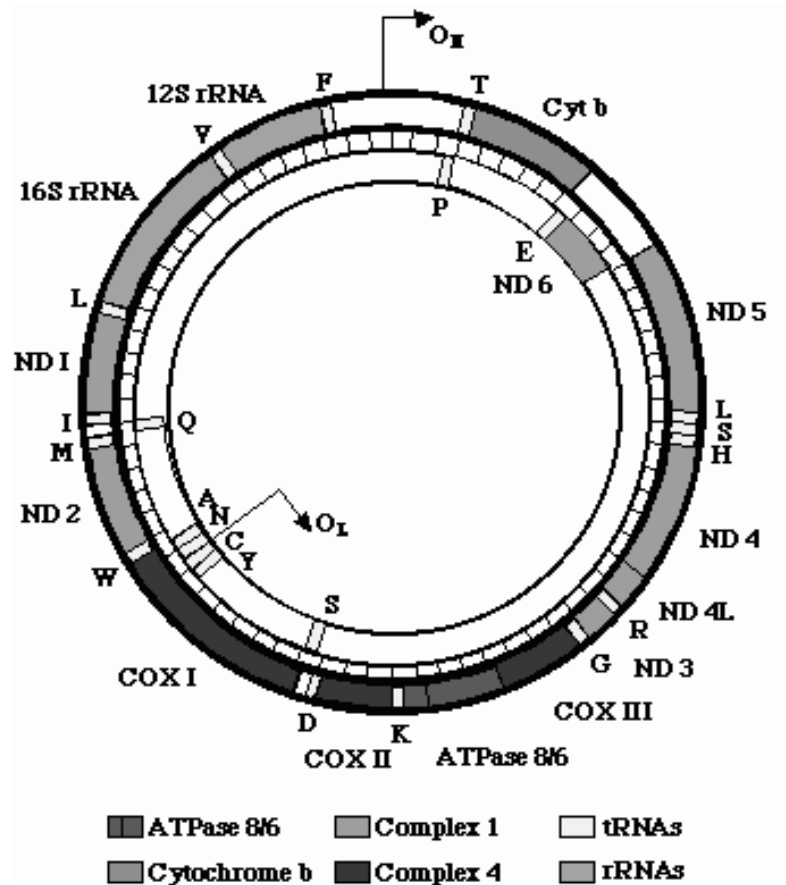


Figura 1.9. Genoma del DNA mitocondrial humano.
Tomado de www.siggenlab.com

La región no codificante, que corresponde al 10% del genoma restante, está formada por varios segmentos pequeños distribuidos entre los genes y por un segmento mayor o región de control localizado alrededor del origen de replicación de la cadena pesada (O_H), entre los genes que codifican para los tRNAs de la prolina y de la fenilalanina, también es llamado *D-loop* (*Displacement loop*) y presenta aproximadamente 1121 pb. Esta región se extiende desde la posición 16024 hasta la 16569, seguida de la posición 1 hasta la 576 (Anderson *et al.* 1981; Wallace 1994).

La región de control está formada por dos segmentos que no codifican para ninguna proteína, son hipervariables y selectivamente neutros, llamados región hipervariable I (HVI) y región hipervariable II (HVII). La región HVII es, quizás, la porción funcionalmente más importante de la región *D-loop*, ya que contiene el sitio de replicación de la cadena pesada (O_H), también contiene dos promotores que son necesarios para la transcripción de las cadenas L y H. La región HVI también cumple una función importante, debido a su actividad controladora en la síntesis de nuevos

mtDNAs (Saccone *et al.* 1991); se encuentran las sub-regiones: 7sDNA formada por la triple estructura de replicación de la nascente cadena H, la secuencia asociada a la terminación (TAS), y el sitio de unión de proteínas (Mt5).

Ambas regiones, HVI y HVII, han sido utilizadas extensamente en estudios sobre evolución, migraciones e historia de las poblaciones humanas, siendo el segmento HVI el más variable. Esta variabilidad se debe, principalmente, a la alta tasa de mutaciones no patogénicas (10 veces mayor que en la región codificante), lo que permite analizar una región relativamente pequeña, pero suficiente para resolver las diferencias entre secuencias estrechamente relacionadas (Ingman & Gyllensten 2001). En tal sentido, la mayoría de los estudios filogenéticos usando aDNA se han encaminado al análisis de la región HVI.

La secuencia total del genoma mitocondrial humano fue presentada por Anderson y su grupo de investigadores de la Universidad de Cambridge, en el año 1981. La secuencia base analizada por Anderson pertenece a un individuo europeo (haplogrupo H) y ha sido utilizada como secuencia de referencia (CRS, *Cambridge Reference Sequence*) para el análisis de los diferentes tipos mitocondriales alrededor del mundo. Debido a que CRS difiere en algunos sitios con secuencias publicadas por otros autores, en el año 1999, Andrews y colaboradores reportan un re-análisis y revisión de la secuencia original, confirmando así, la presencia de errores y polimorfismos raros (tabla 1.1).

Tabla 1.1.
Resultados de la revisión de la Secuencia de Referencia de Cambridge.

Reanalysis of the Cambridge reference sequence			
Nucleotide position	Previous sequence	Reanalysed sequence	Remarks
263	A	A	rare polymorphism
311–315	CCCCC	CCCCC	rare polymorphism
750	A	A	rare polymorphism
1,438	A	A	rare polymorphism
3,106–3,107	CC	C	error
3,423	G	T	error
4,769	A	A	rare polymorphism
4,985	G	A	error
8,860	A	A	rare polymorphism
9,559	G	C	error
11,335	T	C	error
13,702	G	C	error
14,199	G	T	error
14,272	G	C	error (bovine)
14,365	G	C	error (bovine)
14,368	G	C	error
14,766	T	C	error (HeLa)
15,326	A	A	rare polymorphism

Tomado de Andrew *et al.* 1999.

1.3.1.1. Propiedades del DNA mitocondrial.

Aunque el DNA mitocondrial se considera como un locus constituido por una única secuencia, no todas las copias del genoma son necesariamente idénticas y la existencia de distintos tipos de mtDNA en un mismo individuo, célula o mitocondria es conocido como heteroplasmia; por el contrario, homoplasmia es la condición de similitud entre todas las moléculas (Pakendorf & Stoneking 2005).

El mtDNA aporta una visión amplia de la diversidad genética humana, ya que las mutaciones se acumulan, generalmente, más rápido que en el núcleo y se comporta como haploide, ya que se hereda exclusivamente de forma uniparental, concretamente por vía materna. Así, el mtDNA se transmite de la madre a sus hijos varones y hembras, pero sólo las hembras lo transmitirán a sus descendientes (Cann *et al.* 1987), (figura 1.10); por otra parte, aunque en las mitocondrias existe toda la maquinaria necesaria para la recombinación, eventos de este tipo parecen ser muy raros y sólo podría ser detectada en caso de heteroplasmia (Moritz *et al.* 1987).

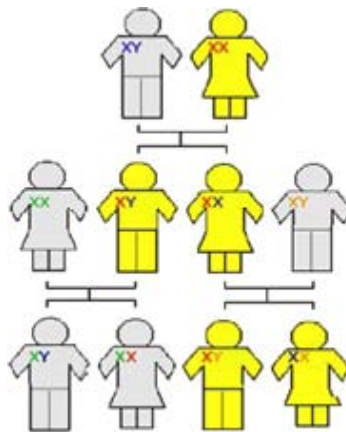


Figura 1.10. Herencia Matrilineal del mtDNA.
Se resalta la línea de herencia del mtDNA.
Modificado de www.sigenlab.com

La hipótesis más aceptada para explicar la transmisión exclusivamente materna de este orgánulo es que, durante la fecundación el oocito reconoce y elimina de manera selectiva todas las mitocondrias de origen paterno (Sutovsky *et al.* 2000). Sin embargo, en los últimos años se han reportado trabajos sobre su

posible herencia paterna, tal es el caso publicado en el año 2003 por Bromham y colaboradores, en la cual referían a un hombre con una severa miopatía cuyo mtDNA muscular era predominantemente de origen paterno; no obstante, para otros autores como Filosto *et al.* (2003) y Schwartz & Vissing (2003) no hay evidencias de herencia paterna, ni en otros pacientes con patologías musculares similares, ni en pacientes con otros tipos de patologías mitocondriales; en consecuencia, hasta el presente, la herencia materna del mtDNA humano puede seguir considerándose una regla (Schwartz & Vissing 2003).

En cuanto a la tasa de aparición de nuevas mutaciones en el genoma mitocondrial, está plenamente demostrado que es mayor que en los genes nucleares, a pesar del axioma de que la funcionalidad es inversamente proporcional a la evolución del gen (Brown WM, *et al.* 1979). El valor promedio de aparición de nuevas mutaciones podría ser de 0.017×10^{-6} sustituciones/sitio/año, para todo el genoma mitocondrial excluyendo la región de control (Ingman *et al.* 2000). La rápida acumulación de mutaciones es atribuida a características propias de este genoma, tales como la falta de un sistema de reparación efectivo o la ausencia de proteínas histonas que lo preserven; además, el mtDNA se encuentra asociado a la membrana interna de la mitocondria donde se generan radicales libres altamente mutagénicos (Richter *et al.* 1988).

En la región de control la tasa de mutaciones es más alta. Estudios basados en comparaciones filogenéticas han determinado que los valores mutacionales en esta región están en un rango de $0.075\text{-}0.165 \times 10^{-6}$ sustituciones/sitio/año (Tamura & Nei 1993), en contraposición con la observación directa de mutaciones en el mtDNA de pedigríes familiares, que lo estiman en un rango de $0.0\text{-}1.46 \times 10^{-6}$ sustituciones/sitio/año, con un promedio total de 0.47×10^{-6} sustituciones/sitio/año, significativamente mayor que los valores obtenidos a partir de métodos filogenéticos (Howell *et al.* 2003).

Los datos antes expuestos, han promovido un debate, aún sin resolver, sobre cuál de los dos métodos refleja el verdadero proceso evolutivo del genoma y cual es el método que debe ser utilizado para estudios de la historia de las poblaciones humanas (Sigurgardottir *et al.* 2000; Howell *et al.* 2003, entre otros). Sin embargo,

Santos C, *et al.* (2005) proponen que las diferencias entre las tasas estimadas con estas dos aproximaciones (filogenética y genealógica) podrían reconciliarse si son considerados diversos factores, como por ejemplo, el hecho de que las nuevas mutaciones heredadas por los hombres no serán transmitidas y por lo tanto no deben ser consideradas en la estimación de la tasa evolutiva. Lo que si queda claro, es que estas diferencias son producidas por múltiples factores que no son excluyentes entre sí, tales como:

- Puntos calientes mutacionales (*Mutacional hot spots*).
- Deriva genética.
- Presión selectiva, entre otros.

1.3.1.2. Linajes del DNA mitocondrial.

Para la caracterización de la variabilidad genética del mtDNA humano han sido empleados dos métodos moleculares: El análisis de polimorfismos de restricción enzimática, RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), tanto de baja resolución (*low resolution restriction analysis*) utilizando 5 ó 6 enzimas de restricción, (Johnson *et al.* 1983; Scozzari *et al.* 1988), como de alta resolución (*high resolution restriction analysis*) utilizando 12 ó 14 enzimas de restricción (Cann & Wilson 1983; Torroni *et al.* 1992), y la secuenciación directa de la región de control (HVI y/o HVII) (Vigilant *et al.* 1991) o de la totalidad del genoma (Kivisild *et al.* 2006), como otras técnicas de alta resolución.

Estos estudios han determinado un conjunto de unidades monofiléticas, linajes, denominados haplogrupos, los cuales resultan ser específicos de las distintas variantes geográficas de la especie humana. Además, existe una correlación entre los polimorfismos de la región codificante, detectados mediante RFLPs, y la presencia de cierta combinación de sustituciones, llamadas motivos, en la región de control (Torroni *et al.* 1996). De hecho, algunas sustituciones en la región de control ayudan a definir subgrupos dentro de los haplogrupos, debido a la mayor resolución que representa la secuenciación de esta zona hipervariable. Así, en la mayoría de las investigaciones se definen los tipos mitocondriales mediante análisis de RFLPs y las

sustituciones nucleotídicas del segmento HVI en la región de control. Es de destacar, que la correspondencia entre RFLPs de la región codificante y el motivo de la región de control puede ser utilizada como un criterio de autenticidad en el caso de estudios poblacionales con aDNA (Montiel *et al.* 2001; Montiel 2001).

En la literatura es frecuente relacionar la edad de los haplogrupos mitocondriales con la edad de una población determinada y que la expansión de cada haplogrupo individual refleja una migración diferente. Sin embargo, Pakendorf & Stoneking (2005) señalan que, cuando ocurre la migración de una determinada población lo hace con todos sus haplogrupos y no con uno de ellos en particular, por tanto, las edades de los linajes matrilineales están determinadas por el momento en que suceden las mutaciones que los definen y no cuando suceden las migraciones poblacionales. En tal sentido, los procesos de diferenciación molecular ocurren, principalmente, durante y después de las colonizaciones y distribución de los grupos humanos entre y dentro de los continentes, razón por la cual los haplogrupos y subhaplogrupos son restringidos a distintas áreas geográficas (Achilli *et al.* 2005).

Aún resolviendo estas consideraciones, el mtDNA sólo preserva una parte de la historia de una población, por lo cual, el estudio de la variabilidad de los linajes maternos se ha complementado con datos provenientes del análisis de la región no-recombinante del cromosoma Y. El estudio de ambos sistemas genéticos permite determinar las genealogías maternas y paternas de forma separada y sin los problemas inherentes a la recombinación, siendo además, complementado con el aporte de la información de los STRs de cromosomas autosómicos. Obviamente, está claro que en aDNA esto no es especialmente fácil y en algunos casos resulta prácticamente imposible.

1.3.1.2.1. Linajes del mtDNA en África.

La clasificación actual de los linajes africanos reconoce a los haplogrupos L0, L1, L2, L3 y L5, junto al M1 como los principales haplogrupos africanos, que con sus respectivos subhaplogrupos están distribuidos en toda el África subsahariana (Rosa *et al.* 2004; Salas *et al.* 2004). El haplogrupo L0 tiene origen en el África oriental,

este linaje con sus 4 subhaplogrupos (L0a, L0d, L0f y L0k), clasificados antiguamente como subhaplogrupos de L1 (Watson *et al.* 1997), representan la rama más antigua en el árbol filogenético de África.

Por otra parte, el linaje L1 tiene su origen en África central y presenta 2 subhaplogrupos (L1b y L1c). El haplogrupo L2 con sus subhaplogrupos L2a, L2b, L2c y L2d presentan la mayor frecuencia en el oeste africano, con la excepción del subgrupo L2a que se distribuyen por casi todo el continente (Salas *et al.* 2002) y el haplogrupo L3 presenta 8 subgrupos (L3b, L3d, L3e, L3f, L3h, L3i, L3w y L3x) distribuidos por casi todo el continente, siendo mas frecuentes en el este africano.

Con respecto a los subhaplogrupos de L5; el subgrupo L1e ha sido recientemente redefinido como L5a y ocupa una posición intermedia entre los clados L1 y L2-L3, su distribución se ha restringido al este del continente (Shen *et al.* 2004; Salas *et al.* 2004); y el subhaplogrupo L5b, se extiende geográficamente más hacia el sur incluyendo los grupos étnicos Sukuma en Tanzania (Knight *et al.* 2003).

Recientemente se han descrito dos nuevos linajes, el haplogrupo L4 que había sido clasificado como una rama del L3; este linaje presenta 2 subgrupos (L4a y L4g) que anteriormente habían sido designados como L3g (Kivisild *et al.* 2004); y el haplogrupo L6 que igualmente deriva del árbol filogenético del África subsahariana; no obstante, sólo se ha observado en Etiopía y está ausente en el resto del continente. L6 también se presenta, con una alta frecuencia, en los individuos de Yemen analizados por Kivisild *et al.* (2004), lo que refleja el flujo génico entre ambas regiones ubicadas entre el Mar Rojo.

El haplogrupo M1 es definido por algunos autores como de origen africano (Quintana-Murci *et al.* 1999); sin embargo, para otros, se trata de una migración de retorno desde Asia y presenta su mayor frecuencia en el este de África (Richards *et al.* 2003; Kivisild *et al.* 2004). Asimismo, en esta área del continente también se observa una proporción importante de linajes que pertenecen al macrohaplogrupo N. Finalmente, en la franja norte del continente se observa una gran influencia de haplogrupos del África subsahariana, además, de los subhaplogrupos X1 y U6, de los cuales, el último tiene origen norteafricano. Según el trabajo de González AM, y

colaborares (2003) en Europa, el haplogrupo U6 sólo tiene representación en el noroeste de la península Ibérica.

Los macrohaplogrupos M y N que derivan del haplogrupo L3, abarcan todos los mtDNA que salieron de África para colonizar el resto de los continentes (Quintana-Murci *et al.* 1999). El nodo filogenético de N (incluyendo R), ha extendido sus ramas por toda Eurasia, mientras que M se encuentra en el este euroasiático pero virtualmente ausente en Europa (Metspalu *et al.* 2004).

1.3.1.2.2. Linajes del mtDNA en Europa.

Según Richards y colaboradores (1998), muchos de los principales motivos de la región de control del mtDNA en el continente europeo, aparecieron durante el Paleolítico Superior, aproximadamente 20000-50000 años BP, o inclusive antes. Con la excepción de los haplogrupos U5 y V, los cuales se originaron muy probablemente *in situ*, todos los linajes descritos para Eurasia Occidental (H, I, J, T, N1, U, X y W) tienen un posible origen en el Oriente Medio (Torroni *et al.* 1998; Richards *et al.* 2000) y, en general, derivan del macrohaplogrupo N. De estos, el haplogrupo H es el más frecuente del continente en una proporción de aproximadamente 40% (Torroni *et al.* 1996).

Recientemente, se han determinado 15 subhaplogrupos de H (H1-H15), definidos por mutaciones específicas en la región HVI. En el trabajo publicado por Achilli y colaboradores (2004), en más de 5000 individuos de 43 poblaciones de Europa, norte de África, Oriente Medio, Cáucaso y Asia central, los subhaplogrupos H1 y H3 son los que presentan las frecuencias más altas. Asimismo, el haplogrupo U y sus subhaplogrupos incluyendo K, están ampliamente distribuidos desde Europa y norte de África hasta la India y Asia central con una frecuencia bastante alta, ubicada entre el 15-30% (Kivisild *et al.* 2003; Quintana-Murci *et al.* 2004; Achilli *et al.* 2005).

1.3.1.2.3. Linajes del mtDNA en Asia.

Los haplogrupos específicos del este asiático, que corresponden al macrohaplogrupo M son C, D, E, G, Z, y los recientemente descritos M7, M8, M9 y M10. Asimismo, los que corresponden al macrohaplogrupo N son A, B, F, R9a, Y, N9a, además de los haplogrupos del oeste eurasiático H, I, J, T, N1, U, X y W, que fueron descritos en la sección anterior (Yao *et al.* 2002).

Para Derenko *et al.* (2000), la mayoría de los mtDNA del sur de Siberia pertenecen a los haplogrupos específicos del este asiático; por otra parte, en los trabajos publicados por la misma autora y colaboradores en 2001, y por Zakharov y colaboradores en 2004, se ha confirmado la presencia de X en el sur de Siberia, lo que según los autores, no se debe a mezclas recientes con europeos, sino que tiene un origen ancestral asiático. De acuerdo a los datos filogenéticos presentados, el X mitocondrial del sur de Siberia ocupa una posición intermedia entre los X caucásicos y los del norte de América.

Los linajes M2, M3, M4, M5, M6, M18 y M25 son exclusivos de la India, siendo el M2 el linaje mas antiguo en el subcontinente (Rajkumar *et al.* 2004). D es el haplogrupo más frecuente en el centro y este asiático incluyendo Japón; no obstante, la distribución de algunos de sus subhaplogrupos (D4, D5 y D6) es un tanto peculiar. Así, D4 y D5 han sido detectados en Japón, igualmente en este país fue detectada una nueva rama del mismo nivel filogenético de D4 y D5 llamada D6; por otra parte, D5 es también frecuente en el sur asiático y D4a en Chukotkan (Chukchi y esquimales de Siberia).

El haplogrupo G presenta 5 subgrupos (G1, G2, G3, G4 y G5) siendo G5 más frecuente en el noreste de Siberia; sin embargo, no fue detectado por Tanaka y colaboradores (2004) en Japón. Recientemente, han sido definidos tres linajes asiáticos como E, basados en las secuencias completas descritas por Herrnstadt *et al.* (2002); no obstante, sólo uno parece ser un representante genuino de este haplogrupo.

El haplogrupo F ha sido incluido como un subgrupo del haplogrupo R9. Tiene una alta frecuencia en el sureste asiático y presenta 4 subhaplogrupos (F1, F2, F3 y F4), siendo F1 muy frecuente en Japón, este de China y Taiwán (Tanaka *et al.* 2004). El estatus monofilético del haplogrupo B en Asia, ha sido frecuentemente cuestionado (Yao *et al.* 2000); no obstante, la delección de 9 pb entre los genes COII y tRNA^{Lys}, junto a la posición polimórfica 16189C definen al linaje mitocondrial B, en el este asiático. En China (Kong *et al.* 2003), se ha detectado la posición polimórfica 16189C, sin la delección de 9 pb y ha sido designado como R11. Los subhaplogrupos de B en el continente asiático se han definido como B4 y B5. Del haplogrupo A, el subgrupo A1 está distribuido en norte y centro de Asia y A2 está presente en el noreste de Siberia. En el trabajo de Tanaka y colaboradores en muestras japonesas, la posición filogenética de tres de sus linajes podrían ser designadas como A3, A4 y A5 (Tanaka *et al.* 2004).

1.3.1.2.4. Linajes del mtDNA en Oceanía y América.

En Oceanía se puede observar un gran número de linajes de origen asiático, específicamente los haplogrupos B, F y E; del macrohaplogrupo N se encuentran los haplogrupos O y S; y del R el haplogrupo P. Por otra parte, también están presentes 3 haplogrupos del superhaplogrupo M, llamados por Merriwether *et al.* (2005) como M27, M28 y M29, determinados en el norte de las Islas Melanesia y que son específicos de este continente.

Por otra parte, los estudios de la diversidad del mtDNA en América han revelado que todos los Nativos del continente pertenecen a uno de los 4 haplogrupos de origen asiático: A, B, C y D (Torroni *et al.* 1992) y más recientemente se ha determinado que un pequeño grupo de amerindios de Norteamérica pertenecen al haplogrupo X (Brown MD, *et al.* 1998; Smith DG, *et al.* 1999; Malhi & Smith 2002, entre otros). Este punto será desglosado en detalle en la sección 1.4.

Es importante destacar que el haplogrupo X es una excepción en cuanto a los patrones de distribución geográfica de los haplogrupos (Reidla *et al.* 2003), se encuentra, generalmente en baja frecuencia en el oeste de Eurasia, en el norte de África (Richard *et al.* 2000) y en Nativos americanos de Norteamérica (Brown MD, *et al.* 1998). Está ausente en el norte de Siberia y en poblaciones del este asiático (Starikovskaya *et al.* 1998); no obstante, como hemos indicado en párrafos anteriores, ha sido detectado en algunas poblaciones del sur de Siberia (Derenko *et al.* 2001; Zakharov *et al.* 2004).

1.3.2. Marcadores del cromosoma Y.

El Y es un cromosoma pequeño, acrocéntrico, que representa alrededor del 2% del total cromosómico humano. Está constituido por un DNA de aproximadamente 60 megabases, de los cuales el 95% no recombina, localizados en la región llamada NRY (*Nonrecombining portion of the Y-Chromosome*) y sólo el 5% restante (región pseudoautosómica), situada en los extremos de cada brazo del cromosoma, puede recombinar su contenido con el cromosoma X. Por consiguiente, la mayor parte del cromosoma Y se hereda en bloque de padres a hijos varones, razón por lo cual se considera de origen exclusivamente masculino, al menos en lo que respecta a la región NRY (figura 1.11).

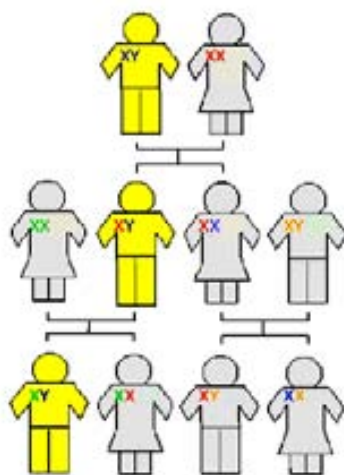


Figura 1.11. Herencia Patrilineal del NRY.
Se resalta la línea de herencia de la región NRY.
Modificado de www.siggenlab.com

Los estudios en genética de poblaciones han definido marcadores específicos altamente polimórficos en el cromosoma Y, aunque, por mucho tiempo, había sido considerado un cromosoma con una variabilidad muy baja. Los grupos pioneros en el análisis de la variabilidad del NRY, fueron Casanova y colaboradores y Lucotte y Ngo; ambos grupos publicaron sus investigaciones en 1985, cuando determinaron la presencia de los dos primeros polimorfismos en el cromosoma.

A partir de esta fecha (1985), se han reportado muchas investigaciones sobre nuevos polimorfismos, como por ejemplo STRs y polimorfismos binarios que incluyen SNPs, inserciones y deleciones (Jobling & Tyler-Smith 1995; Underhill *et al.* 1997; Shen *et al.* 2000; Hammer *et al.* 2001), siendo específicamente importante, en los últimos años, el análisis de estos polimorfismos en estudios sobre genética forense (Jobling *et al.* 1997; Jobling & Gill 2004), reconstrucciones genealógicas (Jobling 2001) y evolución histórica de las poblaciones humanas (Kayser *et al.* 2003; Montiel *et al.* 2005).

Los polimorfismos binarios han sido particularmente utilizados para el estudio de los movimientos poblacionales desde el punto de vista de los linajes paternos. El número de haplogrupos definidos por marcadores binarios del NRY se ha incrementado significativamente y se han llegado a utilizar al menos siete diferentes nomenclaturas, creando dificultades al comparar resultados entre distintas publicaciones. Es por ello que el consorcio del cromosoma Y (*the Y-Chromosome Consortium*), desarrolló un sistema de nomenclatura única para posteriores publicaciones, el cual está ampliamente descrito en *Y-Chromosome Consortium* (2002); www.genome.org.

Asimismo, los STR tetramétricos de la región no recombinante (STRs-Y), aprobados por la ISFG (*International Society of Forensic Genetic*), se utilizan para construir haplotipos específicos y discriminantes del Y; con gran capacidad de exclusión en identificación de individuos. Además, estos marcadores han demostrado un alto nivel de heterogeneidad dentro y entre poblaciones, lo que permitió en 2002, la creación de una base de datos específica para cada locus, YHRD (*Y-Chromosome Haplotype Reference Database*, www.ystr.org), con aplicación fundamentalmente en

ciencias forenses, así como también en estudios de evolución y genética de poblaciones humanas (figura 1.12).

Map of Y Chromosome STR Markers

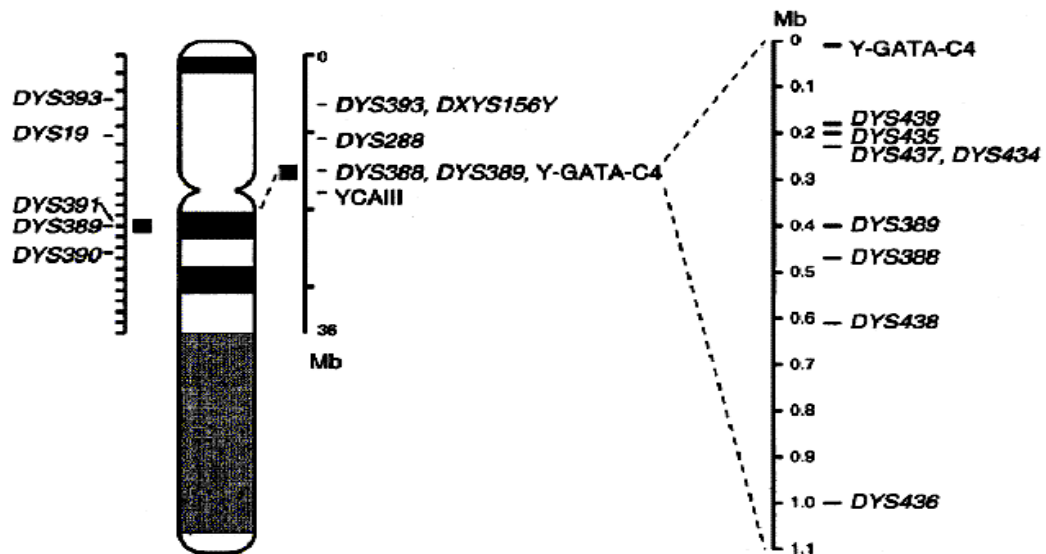


Figura 1.12. STRs del Cromosoma-Y humano
Tomado de www.siggenlab.com

1.3.3. STRs de cromosomas autosómicos.

En la fecundación, el espermatozoide y el óvulo contribuyen con 22 cromosomas autosómicos cada uno. Entre los cromosomas homólogos se produce un intercambio de información genética, por medio de la recombinación, de modo que el hijo presentará una combinación de los cromosomas autosómicos del padre y de la madre.

De los 3000 millones de pares de bases que tiene el genoma humano haploide, sólo el 10% se compone de secuencias repetidas agrupadas en tándem

(STRs), constituidas por unidades de 2 a 7 pb que se repiten en un número variable de veces, siendo más conveniente el análisis de los STRs tetramétricos (Edwards *et al.* 1992). En general, los STRs son altamente polimórficos, presentan un alto grado de heterocigosidad y se caracterizan básicamente por presentar diferencias en el número de copias de las unidades repetidas en los distintos alelos. La tasa de mutación es intrínseca de cada locus y depende de diferentes factores, como: el número de repeticiones, calidad de la secuencia repetida y longitud de la unidad repetida, entre otros (Chakraborty *et al.* 1997).

Los STRs autosómicos son marcadores moleculares que facilitan la identificación certera y fiable de los individuos, tienen la ventaja de ser selectivamente neutros, frecuentes en todo el genoma (cada 30-50 Kb). Además, es posible realizar PCRs múltiples (*Multiplex PCR*), por lo que se logran genotipar varios *locus* en una misma reacción, siendo fácilmente analizados utilizando secuenciadores automáticos (Schultes *et al.* 1999; Jobling & Gil 2004).

El CODIS (*Combined DNA Index System*) ha seleccionado, como mínimo 13 loci STRs: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, además de la prueba del sexo, a través del gen de la amelogenina (figura 1.13), que están estandarizados para análisis forenses y en genética de poblaciones humanas (Budowle & Moreti 1999).

Como hemos indicado, las investigaciones con aDNA se han basado mayoritariamente en el análisis del mtDNA, este pequeño genoma es más adecuado para obtener amplificaciones positivas que los genes nucleares, probablemente, por el mayor número de copias presentes en cada célula somática. No obstante, en los últimos años, se han reportado trabajos de DNA recuperado a partir de restos antiguos, que analizan nDNA y en particular STRs autosómicos y del cromosoma Y, como es el caso del grupo de investigación del Instituto de Medicina Legal de Estrasburgo (Francia). De este modo, se han presentado diversos trabajos como el de Keyser-Traqui *et al.* (2003), que analizan el sistema genético biparenteral para la reconstrucción genealógica de una necrópolis de Mongolia; y en este mismo sentido, han reportado el análisis de STRs autosómicos y secuencias de HVI del mtDNA de esqueletos encontrados en diversos yacimientos en Siberia (Ricaud *et al.* 2004a;

2004b; 2005), entre otras publicaciones. Por otra parte, el grupo de investigación alemán del Instituto de Zoología y Antropología de la Universidad de Gottingen, también, ha publicado trabajos sobre el análisis de STRs autosómicos y STRs-Y en material antiguo (p.ej. Schultes *et al.* 1999; Gerstenberger *et al.* 1999).



Figura 1.13. Ubicación de los STRs más estudiados en Cromosomas Autosómicos.
Modificado de Jobling & Gil 2004.

1.4. Diversidad genética en Nativos americanos.

1.4.1 Diversidad del DNA mitocondrial.

La manera como las poblaciones se establecen en distintas áreas geográficas puede reflejarse en los patrones de variación de sus genes. La vasta mayoría de los mtDNAs en poblaciones modernas americanas pertenecen a uno de los cuatro haplogrupos asiáticos, designados como A, B, C y D (Torroni *et al.* 1992; 1993a; 1993b; 1994a; 1994b; Forster *et al.* 1996, entre otros), además del haplogrupo X, identificado recientemente, como el quinto de los linajes fundadores americanos (Brown MD, *et al.* 1998); cada uno de estos haplogrupos está bien definido por una serie de polimorfismos asociados. De igual manera, esta misma distribución de la variabilidad mitocondrial se ha encontrado en muestras antiguas en distintas

latitudes del continente (Lalueza *et al.* 1997; Stone & Stoneking 1993; 1998; 1999; Carlyle *et al.* 2000; O'Rourke *et al.* 2000).

La comparación entre mtDNAs de Nativos americanos y asiáticos revela que los linajes A, B, C y D en ambos grupos, comparten una serie de mutaciones tanto en la región codificante como en la región de control, que son específicas para cada haplogrupo. Obviamente, las mutaciones que definen estos haplogrupos sucedieron en Asia y fueron trasladadas al nuevo continente por los ancestros colonizadores. Asimismo, la mayoría de las variantes restantes en las secuencias americanas parecen haber sido adquiridas durante o después de la transición desde Asia a América, lo que sugiere que americanos y asiáticos divergieron rápidamente después que los primeros pobladores del Nuevo Mundo se separaran de sus antecesores asiáticos (Schurr 2000).

Bonatto y Salzano en su trabajo publicado en 1997, señalan que la diversidad de la región HVI en una muestra de más de 700 Nativos americanos, sugieren que los cuatro haplogrupos fundadores se expandieron aproximadamente al mismo tiempo desde una misma población, y posiblemente, antes del supuesto colapso del corredor sin hielo entre 14000 y 20000 años BP; sosteniendo así, el modelo de una única migración. Por lo demás, es importante destacar que el haplogrupo X no fue incluido en este análisis, ya que constituye menos del 10% de las secuencias encontradas en América; por lo que, según la opinión de los autores, su inclusión no cambiaría significativamente estos resultados.

1.4.1.1. Distribución de haplogrupos mitocondriales americanos.

La variabilidad del mtDNA en la historia de las poblaciones y en especial en la historia de poblaciones americanas, ha dejado constancia de los desplazamientos migratorios sucedidos en el pasado. La presencia de mutaciones idénticas -siempre que no sean *hot spots*- en grupos humanos geográficamente separados, es indicio de movilidad y contactos dentro y entre grupos. Asimismo, el mtDNA también refleja procesos estocásticos que alteran la composición genética de una población, tales

como la deriva genética y el efecto fundador, que quedan registrados en las poblaciones en términos de frecuencia de tipos mitocondriales.

Schurr (2000) señala, que aunque los cuatro principales haplogrupos fundadores se encuentren juntos en una misma población, la distribución de sus haplotipos es generalmente diferente; en este sentido, la deriva genética y el efecto fundador han jugado un papel muy importante en la variabilidad mitocondrial americana. Igualmente, esta interpretación se sustenta por la alta frecuencia de haplotipos propios encontrados en diferentes tribus amerindias; por lo cual, estos factores estocásticos determinan las divergencias genéticas en las diferentes regiones del continente.

Asimismo es posible, que la composición genética de una población antigua, no siempre sea la misma que la de la población que actualmente ocupa esa misma área geográfica, debido a cualquiera de los factores anteriormente mencionados (deriva genética o efecto fundador). Así como también, en el caso de las poblaciones americanas, debido a factores inherentes a los procesos demográficos que han sucedido en el continente, tales como la reducción poblacional que pudieron experimentar algunos grupos, como resultado del cuello de botella producido durante la primera colonización o quizás, como consecuencia del contacto con los europeos a principios del siglo XVI.

Como se ha comentado en los párrafos anteriores, en el continente americano se han descrito 4 haplogrupos fundadores, A, B, C y D, que junto con el haplogrupo X recogen toda la variabilidad de la población autóctona. El haplogrupo A está asociado al sitio polimórfico +663 *Hae* III (numerado según la Secuencia de Referencia de Cambridge-CRS, Anderson *et al.* 1981). Se ha descrito en Siberia, China, Corea y está distribuido ampliamente entre los Nativos americanos, con una frecuencia que decrece de Norte a Sur (Merriwether *et al.* 1995; Schurr & Sherry 2004).

En la región de control, los cambios nucleotídicos típicos del haplogrupo A son: 16223 T→C, 16290 T→C, 16319 A→G y 16362 T→C (igualmente numerados

según CRS, Anderson *et al.* 1981). Esta combinación de sitios polimórficos ha sido clasificada como subhaplogrupo A1 y se observa en algunas poblaciones del oeste y centro de Siberia (Starikovskaya *et al.* 2005). Por otra parte, la incorporación del cambio C→T en la posición 16111 que exhiben Nativos americanos y algunos individuos que pertenecen al haplogrupo A en poblaciones del norte de Siberia, determina su clasificación como subhaplogrupo A2.

Forster *et al.* (1996) y Starikovskaya *et al.* (1998; 2005), sostienen que el subhaplogrupo A2 se originó en el área de Beringia y posteriormente se expandió dentro del Nuevo Mundo. De igual manera, Rubicz *et al.* (2003) sustentan el enunciado que el haplogrupo A de muchos Nativos americanos comparte los 5 polimorfismos que caracterizan al subgrupo A2 encontrado, además, en aborígenes del área de Chukotka que incluye a los Chukchi y esquimales de Siberia.

Cuando al conjunto de las sustituciones descritas como subhaplogrupo A2 se incorpora la mutación C→T en el sitio 16192, se define el subhaplogrupo A3 (específico del área de Beringia), siendo característico en muchas secuencias aleutianas derivadas de este subgrupo (Rubicz *et al.* 2003; Zlojutro *et al.* 2006). Por otra parte, en el mismo trabajo presentado por Rubicz y colaboradores (2003), los cambios en las posiciones 16212 A→G y 16234 A→T se atribuyen también a mutaciones específicas de las poblaciones aleutianas.

El haplogrupo B está definido por una delección de 9 pb, que incluye las posiciones 8281-8289, entre los genes COII y tRNA^{Lys}, está ausente tanto en las poblaciones aborígenes del norte de Siberia (Derbeneva *et al.* 2002), como del norte de Norteamérica (Schurr 2000). Por el contrario, se encuentra ampliamente distribuido en amerindios del resto del continente con una frecuencia relativamente importante; y en poblaciones de la Costa del Pacífico asiático (Schurr *et al.* 1990; Malhi *et al.* 2001; 2002). El haplogrupo B típicamente americano se corresponde con el B2 asiático y presenta usualmente las transiciones T→C en las posiciones 16189, 16217 y 16519 (Starikovskaya *et al.* 2005).

Derenko y colaboradores (2000) demuestran la presencia del haplogrupo B en dos poblaciones del suroeste de Siberia (Buryats y Tuvinians). Igualmente,

Zakharov *et al.* (2004) caracterizaron individuos aborígenes con este haplogrupo en poblaciones de Altai, en el mismo suroeste siberiano. Como hemos indicado en párrafos anteriores, estas poblaciones tienen un papel importante en el supuesto origen geográfico de los linajes mitocondriales del Nuevo Mundo.

El haplogrupo C, caracterizado por los sitios polimórficos -13259 *Hinc* II y +13262 *Alu* I, comparte proporciones similares entre las tribus aborígenes de Siberia y de Nativos americanos; asimismo, la frecuencia de C en América se incrementa progresivamente de Norte a Sur (Stone & Stoneking 1993; Torroni *et al.* 1993a). En cuanto a la región de control, este haplogrupo está definido por los cambios polimórficos T→C en las posiciones 16223 C→T, en 16298 y T→C en 16327. Según Bandelt y colaboradores (2003), la diferenciación de C en Asia y América es algo confusa, ya que no hay ninguna mutación que claramente diferencie al haplogrupo C americano de sus homólogos asiáticos. No obstante, en la mayoría de las secuencias americanas se observa la transición 16325 C→T y la delección 290-291 en la región HVII, que los define como subhaplogrupo C1. Además de otras posiciones polimórficas, que ayudan a diferenciar los otros subgrupos descritos en Asia.

El haplogrupo D se define, en la región codificante, por el polimorfismo -5176 *Alu* I y en la región de control por las sustituciones 16223 T→C y 16362 C→T. El D americano pertenece al subhaplogrupo asiático D4, del cual se originan dos subgrupos. Por una parte, el subhaplogrupo D2, limitado a las poblaciones Na-Denes y Esquimo-aleutianos, además, de las poblaciones del área de Chukotka en el continente asiático, es caracterizado por las sustituciones 16129 G→A, 16223 T→C, 16271 C→T y 16362 C→T (Derbeneva *et al.* 2002; Rubicz *et al.* 2003); y por la otra, el subgrupo D1, tipificado en Nativos amerindios, se caracteriza por las transiciones 16223 T→C, 16325 C→T y 16362 C→T, y su frecuencia se incrementa hacia el sur del continente (Torroni *et al.* 1993b; Malhi *et al.* 2003).

Finalmente, el haplogrupo X asociado a los sitios polimórficos -1715 *Dde* I y +14465 *Acc* I y caracterizado por las transiciones T→C en la posición 16189 y C→T en las posiciones 16223 y 16278 en el segmento HVI (Brown MD, *et al.* 1998), se ha restringido a poblaciones exclusivamente norteamericanas del grupo lingüístico

amerindio (Ojibwa, Nuuchah-nulth, Sioux, Yakima) y como excepción a los Navajos del grupo lingüístico Na-Denes, con una proporción de aproximadamente 3%. Se incluyen en este porcentaje los datos del análisis de restos esqueléticos del yacimiento de Oneota en el estado de Illinois, Estados Unidos, de 700 años de antigüedad (Stone & Stoneking 1998; Brown MD, *et al.* 1998), y los datos de series antiguas de Malhi & Smith (2002) y Malhi *et al.* (2002; 2004) en el noroeste de Estados Unidos, con una datación de entre 500 y 1500 años, lo que sostiene la teoría de la presencia de este haplogrupo antes del contacto europeo.

Ribeiro-Dos-Santos y colaboradores (1996; 1997), reportan secuencias que posiblemente pertenecen al haplogrupo X en poblaciones antiguas de Suramérica, y que datan de entre 500 y 4000 años de antigüedad. Sin embargo, estos últimos datos no son consistente con la, hasta hoy, distribución de X en el continente americano (Brown MD, *et al.* 1998; Smith DG, *et al.* 1999); además hay que tener en cuenta que los análisis de secuencias, presentados por los autores, no incluyen todas las posiciones polimórficas habituales de la región HVI para el haplogrupo X, ni fueron corroborados con análisis de restricción enzimática.

La virtual ausencia de X en el este y norte de Asia, planteó la posibilidad que la presencia del haplogrupo en el continente americano tuviera su origen ancestral en Europa (Brown MD, *et al.* 1998). No obstante, Derenko y colaboradores (2001), detectan el haplogrupo X en la población de Altai (suroeste asiático), con una frecuencia de aproximadamente 3.5%. A pesar que los haplotipos X encontrados en el suroeste de Siberia difieren de los americanos en el cambio polimórfico 225A de la región HVII, hasta el presente, sólo ésta región asiática posee todos los haplogrupos fundadores del mtDNA y NRY encontrados en América, lo que sostiene la teoría propuesta por Zegura y colaboradores en 2004.

En el mtDNA americano, se ha podido observar algunas posiciones nucleotídicas en la región HVI, que son hipervariables para algunos haplogrupos, por ejemplo podemos mencionar los cambios nucleotídicos T→C en la posición 16111 y C→T en la 16325. La primera se encuentra en Nativos americanos que pertenecen a los haplogrupos A y B; y la segunda en americanos de los linajes C y D. Sin embargo, estos polimorfismos no se observan en asiáticos pertenecientes a estos

mismo haplogrupos (Alves-Silva *et al.* 2000). Las secuencias de Nativos americanos no forman *subclusters* separados de las secuencias asiáticas verdaderas ya que presentan los mismos cambios polimórficos en la región codificante; es por ello que la diversidad mitocondrial en América, se basa fundamentalmente en la distribución de los 5 haplogrupos fundadores y sólo en las poblaciones americanas del área de Beringia se describen los subgrupos, especialmente, de los haplogrupos A y D (Rubicz *et al.* 2003; Starikovskaya *et al.* 2005; Zlojutro *et al.* 2006).

1.4.2 Diversidad del cromosoma Y y de STRs autosómicos.

Los más recientes estudios sobre la variación de la herencia patrilineal han complementado los análisis del mtDNA en poblaciones americanas. Los primeros trabajos sobre la variabilidad del cromosoma Y señalaban la existencia de un único haplotipo fundador para todos los Amerindios (Torroni *et al.* 1994a; Santos FR, *et al.* 1999). Postulado que fue verificado en el trabajo presentado por Underhill y colaboradores en 1997, encontrando que Amerindios, Na-Denes y Esquimo-aleutianos exhibían la asociación del alelo DSY19A con la transición C→T en la posición 181 del locus DYS199, llamado M3 en el antiguo sistema de nomenclatura, representando el principal haplotipo fundador para todos los Nativos americanos (Bianchi *et al.* 1998; Lell *et al.* 2002).

Recientemente, Zegura y colaboradores (2004), describen dos principales haplogrupos Q y C, según el sistema de nomenclatura descrito por el *Y-Chromosome Consortium* (2002), para todos los Nativos americanos. El haplogrupo Q (que se corresponde con el M3 del antiguo sistema), tiene una frecuencia del 76.4% encontrado en los tres grupos lingüísticos de Greenberg en 1986 (Esquimo-aleutianos, Na-Denes y Amerindios) y el haplogrupo C, con una frecuencia del 5.8%, concentrado sólo en tres poblaciones Na-Denes. Estos dos haplogrupos representan un total del 82.2% de la variabilidad en una muestra de 588 individuos. Además, ambos linajes están presentes con una moderada alta frecuencia en la región de *Altai Mountains*, en el suroeste de Siberia; Q con una frecuencia del 17% y C en un 22%. De igual manera, los datos obtenidos a partir de los STRs también del

cromosoma Y, son mucho más determinantes a la hora de presumir que el área de Altai representa el hogar ancestral de los americanos (Zegura *et al.* 2004).

Por otra parte, el análisis de los STRs autosómicos, permite evaluar niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas. Este tipo de estudios con marcadores biparenterales, son de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente entre distintos grupos humanos. En general, las poblaciones nativas amerindias actuales son estrictamente mestizas, y en especial en México, los datos de mtDNA y STRs autosómicos demuestran que los mestizos alcanzan aproximadamente el 90% del total poblacional, generado, fundamentalmente, por mezclas con europeos durante el proceso de la conquista española (Merriwether *et al.* 1997; Green *et al.* 2000; Luna-Vázquez *et al.* 2003). Estos datos son comparativamente mayor a los datos considerados sobre la base de sólo de STRs autosómicos que estiman las mezclas de los amerindios en un 30% aproximadamente. Estas diferencias son indicativas de mezclas preferentemente entre hombres inmigrantes y mujeres amerindias. Del mismo modo, un análisis de STRs autosómicos en individuos brasileños con ascendencia africana evidenció una sustancial mezcla con europeo que fue observada sobre todo en los hombres (Bortolini *et al.* 1999).

Existen base de datos de referencia para uso forense con las frecuencias alélicas de los loci STR que conforman el sistema CODIS, lo cual permite plantear inferencias sobre la estructura genética de una población desde la perspectiva histórica del poblamiento y además, realizar comparaciones entre distintos grupos poblacionales; tales como, los trabajos presentados por Paredes y colaboradores (2004) en poblaciones de Colombia y por Barrot y colaboradores (2005) en poblaciones mexicanas, entre otros. Además de los análisis poblacionales realizados por Mesa *et al.* (2000), donde compara datos de 9 STRs autosómicos de poblaciones colombianas con datos de 19 poblaciones nativas alrededor del mundo.

1.5. DNA antiguo.

Las investigaciones con DNA recuperado de restos antiguos comienzan hace poco más de veinte años, cuando R. Higuchi, del grupo de investigación de A.C. Wilson de la Universidad de California, Estados Unidos, publican en la revista *Nature*, la secuencia de un fragmento de 229 pb de mtDNA, obtenido de piel momificada de un *Equus quagga*, un animal de una especie extinta, de aproximadamente 140 años de antigüedad. El fragmento secuenciado por Higuchi fue comparado con secuencias de équidos actuales, exhibiendo una elevada similitud con las cebras (sólo diferían en 12 nucleótidos), confirmando una estrecha relación filogenética entre ambas especies (Higuchi *et al.* 1984). Pero además, este trabajo demostraba la posible supervivencia del DNA a través del tiempo y la posibilidad de recuperarlo utilizando procedimientos de biología molecular.

De igual manera y casi simultáneamente, Svante Pääbo en la Universidad de Uppsala, Suecia, presentaba sus investigaciones en DNA recuperado en restos humanos antiguos, una de ellas también publicada en *Nature*, sobre la obtención por medio de la clonación, de dos miembros de la familia de secuencias repetitivas *Alu*, a partir de piel de momias egipcias de 2500 años de antigüedad (Pääbo 1985a, 1985b). Seguidamente, en el año 1986, Pääbo presentó su trabajo: *Molecular Genetic Investigations of Ancient Human Remains*, donde se incluye el análisis genético de 4 momias peruanas, en el *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.

Los avances en la recuperación de DNA a partir de restos arqueológicos suscitaron gran expectativa en la comunidad científica, pero rápidamente fueron disuadidas debido a las dificultades en la reproducibilidad de la mayoría de las investigaciones. Mas tarde, el advenimiento de la técnica molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) proporcionó nuevas perspectivas en esta disciplina. La PCR es una técnica que permite la síntesis *in vitro* de secuencias específicas de DNA a partir de mínimas cantidades de material genético o incluso a partir de una sola molécula (Saiki *et al.* 1985; Mullis & Faloona 1987).

En tal sentido, S. Pääbo y A.C. Wilson publicaron en 1988, el re-análisis mediante PCR de la secuencia del *Equus quagga*, determinando que varias de las sustituciones nucleotídicas (al menos dos) descritas en la publicación de 1984 no eran correctas, por lo que, probablemente, habían sido modificadas durante la clonación bacterial. De esta manera, se destacaban las grandes ventajas que aportaba la PCR sobre la clonación y a partir de entonces, se han desarrollado numerosas investigaciones en el área del aDNA antiguo obtenido en distintos tipos de tejidos y con distintas antigüedades, entre las que podemos destacar:

- Tejido óseo:
 - o Hagelberg *et al.* (1989), artículo publicado en *Nature*, donde describe la recuperación de mtDNA a partir de huesos de 300 a 5500 años de antigüedad.
- Dientes:
 - o Hänni *et al.* (1990), artículo publicado en *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, se describe la extracción de DNA a partir de dientes de 150 a 5000 años de antigüedad.
- Plantas:
 - o Golenberg *et al.* (1990), artículo publicado en *Nature*, se describe la extracción y secuenciación de un fragmento de 820 pb del DNA de cloroplasto, a partir de hojas de magnolia de aproximadamente 20 millones de años de antigüedad.
- Insectos preservados en ámbar:
 - o Cano *et al.* (1993), artículo publicado en *Nature*, se describe la amplificación y secuenciación de DNA recuperado a partir de insectos preservados en ámbar, de aproximadamente 120 millones de años.
La antigüedad del DNA recuperado a partir de los especímenes de Golenberg y Cano, entre otros; propiciaron que Lindahl y colaboradores, en el año 1993 (Lindahl *et al.* 1993b), lo denominaran "DNA antediluviano". No obstante, estos trabajos han sido sometidos a fuertes críticas y, posiblemente, ninguna de las secuencias publicadas por los autores sea realmente endógena, sino contaminaciones sucedidas durante el proceso de excavación o

análisis (Pääbo & Wilson 1991; Sidow *et al.* 1991; Walden & Robertson 1997; Gutiérrez & Marín, 1998).

- Coprolitos:
 - o Poinar *et al.* 1998, artículo publicado en *Science*, reportan el análisis de DNA a partir de coprolitos pertenecientes a un perezoso de tierra, cuyos restos también fueron encontrados en el mismo yacimiento de Nevada, Estados Unidos. En el DNA recuperado de los coprolitos se logró identificar varios tipos de plantas que formaban parte de la dieta del animal.
- Permafrost:
 - o Willerslev *et al.* 2003, artículo publicado en *Science*, reportan el análisis genético de animales y plantas preservados en permafrost en la region de Beringia, datados entre 400000 y 10000 años BP.
 - o Lydolph *et al.* 2005, artículo publicado en *Applied and Environmental Microbiology*, también analizan DNA de hongos, plantas e invertebrados preservados en permafrost en Beringia con dataciones entre 400000 y 300000 años BP.
- Neandertales:
 - o Krings *et al.* 1997, artículo publicado en *Cell*, reportan la primera secuencia del mtDNA que fue extraído a partir del húmero derecho de un Neandertal tipo, encontrado en el oeste de Alemania en 1856.

El conocimiento de secuencias nucleotídicas de DNA de animales, plantas y bacterias antiguas ha aportado datos importantes en distintas áreas del conocimiento, que incluyen las relaciones filogenéticas de animales extintos como el mamut (Hagelberg *et al.* 1994a) y el lobo marsupial (Krajewski *et al.* 1997), entre otros. Asimismo, se han establecido relaciones filogenéticas entre animales antiguos y sus similares contemporáneos, como el trabajo presentado por Kim *et al.* (2005), en el cual se analizaron restos antiguos de ganado hallados en Jeju, Korea, determinando relaciones genéticas muy cercanas entre el DNA de los restos antiguos y el ganado negro existente en el área. Por otra parte, el análisis del aDNA también ha permitido determinar rutas migratorias de algunos animales como las hienas (Rohland *et al.* 2005). En el mismo año 2005, Lalueza-Fox y colaboradores analizaron el mtDNA de un *Myotragus balearicus*, una especie de la subfamilia

Caprinae que habitaba en las islas de Baleares hasta su extinción hace unos 3700 y 2040 años BP (Lalueza-Fox *et al.* 2005b), e incluso la recuperación de DNA de animales y plantas a partir de muestras de suelo (Willerslev *et al.* 2003).

En el área de la arqueobotánica, se pueden señalar los trabajos realizados por Jaenicke-Despres y colaboradores (2003), donde se analizaron tres genes específicos del maíz, en muestras arqueológicas de México y del suroeste de Estados Unidos, con una antigüedad de aproximadamente 4500 años BP, resultando que alelos típicos del maíz contemporáneo fueron encontrados en las muestras antiguas. Otro trabajo es el publicado por Erickson y colaboradores (2005), sobre el origen asiático de una especie de calabaza encontrada en diferentes yacimientos a lo largo del continente americano, los autores utilizaron 3 marcadores genéticos del cloroplasto. En el mismo trabajo se observó que las muestras recuperadas en un yacimiento del post-contacto mexicano (datado del año 1660), reflejan un origen estrictamente africano y probablemente, esta variedad de calabaza, fue introducida a las Américas por los europeos durante la época colonial.

En paleomicrobiología, el aDNA ha permitido determinar la incidencia y prevalencia de algunas enfermedades infecciosas, la interacción huésped-patógeno y la identificación de diversos agentes infecciosos (ver Malgosa *et al.* 2005 para una revisión reciente), tales como: *Mycobacterium tuberculosis* (Spigelman & Lemma 1993; Zink *et al.* 2005, entre otros, aproximadamente 40 publicaciones), *Mycobacterium leprae* (Rafi *et al.* 1994) *Treponema pallidum* (Kolman *et al.* 1999), *Yersinia pestis* (Drancourt *et al.* 1998), además de otros microorganismos. Asimismo, en nuestro laboratorio de aDNA en la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), hemos logrado recuperar y secuenciar DNA de *Mycobacterium leprae*, a partir de restos óseos de 4 individuos con características paleopatológicas de lepra (Montiel *et al.* 2003), la amplificación del DNA de *Treponema pallidum* recuperado a partir de restos óseos infantiles con lesiones que suponen una treponematosi congénita (Solórzano *et al.* 2004) y recientemente la secuenciación de fragmentos de 120 pb del gen de la dextranasa de *Streptococcus mutans*, a partir de caries y tártaro dental (Smerling 2004).

De igual manera, ha sido motivo de especial interés el estudio del DNA de restos humanos, lo cual ha proporcionado grandes perspectivas en el origen de nuestra especie, no sólo por el hecho de analizar genéticamente restos humanos antiguos o muy antiguos, sino por la posibilidad de ampliar el campo de la investigación en la antropología física y en la arqueología; como por ejemplo, en el estudio de la relación entre las variaciones moleculares y las variaciones morfológicas durante la evolución humana más reciente, trabajo presentado por Adcock y colaboradores (2001), en poblaciones australianas. Sin embargo, los resultados de este estudio han sido fuertemente criticados (Relethford 2001; Pääbo *et al.* 2004).

Otro de los aportes de las investigaciones con DNA a partir de restos humanos antiguos, es la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre poblaciones humanas, quizás, el campo científico donde más aplicabilidad ha tenido el análisis de aDNA. Entre los estudios pioneros en esta área podemos citar:

- Los trabajos presentados por Horai *et al.* (1989; 1991) que permitieron establecer la filogenia de antiguos colonizadores de Japón y sus contemporáneos.
- El trabajo publicado en 1993 por Stone & Stoneking, uno de los primeros estudios de tipo poblacional en muestras antiguas americanas, que posteriormente fue complementado, por los mismo autores, con los trabajos publicados en 1998 y 1999.
- En 1994, Hagelberg y colaboradores determinan las relaciones filogenéticas entre antiguos habitantes de la Isla de Pascua y Polinesios (Hagelberg *et al.* 1994b)
- En Europa, el trabajo presentado por Izagirre & de la Rúa (1999), en 121 individuos de diferentes regiones vascas, cronológicamente datadas entre el Neolítico y la Edad del Bronce. Asimismo, las primeras secuencias de mtDNA de una serie europea fueron publicadas por Montiel *et al.* (2001) y en el 2005, Haak y colaboradores analizan el mtDNA de 6 individuos neolíticos del este de Europa, con la finalidad de intentar dilucidar el origen de los linajes mitocondriales actuales en el continente, entre otros trabajos.

El aDNA también ha permitido esclarecer algunos aspectos sobre la historia evolutiva humana más antigua, como el trabajo presentado por el grupo de S. Pääbo, que lograron recuperar secuencias de la región HVI (Krings *et al.* 1997) y de la región HVII del mtDNA (Krings *et al.* 1999) de un individuo Neandertal-tipo, hallado en el año 1856, en el Valle Neander al oeste de Alemania y que dio nombre a este grupo de homínidos, que vivieron en Europa y el oeste de Asia entre aproximadamente 100000 y 30000 años BP (Schmitz *et al.* 2002).

En los trabajos presentados por Krings y colaboradores (1997), refieren la posibilidad de que los Neandertales se extinguieron sin aportar ninguna contribución al *pool* genético mitocondrial del hombre moderno. Un segundo individuo, proveniente del mismo yacimiento arqueológico, fue también sometido al análisis genético, obteniéndose resultados concordantes con el primero (Schmitz *et al.* 2002).

Otros estudios en individuos Neandertales han sido presentados desde distintos lugares de Europa: Un niño Neandertal en el norte del Cáucaso en Rusia (Ovchinnikov *et al.* 2000), 3 en Croacia (Krings *et al.* 2000; Serre *et al.* 2004), 2 en Bélgica (Serre *et al.* 2004) y más recientemente, en 2005 se presentó la secuencia de un individuo Neandertal de la península Ibérica (Lalueza-Fox *et al.* 2005a). Los datos genéticos aportados por estos estudios apoyan la hipótesis de que los Neandertales surgieron como una entidad biológica distinta al hombre anatómicamente moderno, y que posiblemente nunca se mezclaron (Lalueza-Fox *et al.* 2005a). No obstante, queda preguntarse si estas diferencias también pueden ser observadas a nivel nuclear; sin embargo, hasta el presente, no se han publicado análisis de DNA nuclear en restos tan antiguos.

En el ámbito forense, las técnicas del aDNA han contribuido en el esclarecimiento de importantes casos, como el publicado por Hagelberg *et al.* (1991), que identificaron un cadáver de 8 años de antigüedad utilizando el análisis de STRs autosómicos del DNA obtenido a partir de hueso, datos que fueron comparados con los presuntos padres de la víctima, demostrando la viabilidad del DNA obtenido de hueso en investigaciones forenses. A pesar de esto, en muchas

ocasiones, el análisis forense no ha sido considerado como aDNA (O'Rourke *et al.* 1996), aunque, no cabe duda, que ambas disciplinas son complementarias.

El análisis genético a partir de restos antiguos, también ha permitido elucidar casos de personajes históricos como la identificación de los restos de la familia Romanov (Gill *et al.* 1994). Este estudio revela, a través de STRs autosómicos, que el grupo hallado estaba compuesto por los padres (el Zar y la Zarina) y 3 de sus 5 hijos. Por otra parte, la secuencia de la región de control del mtDNA de la posible Zarina es idéntica a las secuencias de los 3 esqueletos infantiles femeninos localizados en el enterramiento (posibles hijas), e idéntica a la secuencia de la región de control mtDNA de un pariente vivo, el Duque de Edimburgo -Sobrino-nieto de la Zarina Alexandra-. Igualmente, una posición heteroplástica en la secuencia de la región de control del mtDNA del posible Zar Nicolas II, coincide con los análisis genéticos realizados en los restos esqueléticos de Georgij Romanov -hermano del Zar-, (Ivanov *et al.* 1996), demostrando que lo más probable es que los restos analizados pertenezcan a la familia real rusa.

Desafortunadamente, el estudio del aDNA presenta dos grandes dificultades, relacionadas por una parte con la contaminación del material genético antiguo con DNA exógeno y por la otra con el daño molecular, lo que ha puesto en duda la autenticidad de muchas investigaciones (Pääbo 1989; Gilbert *et al.* 2003a; 2003b; Pääbo *et al.* 2004). A continuación se detallarán algunos aspectos asociados con estas dos complicaciones.

1.5.1. Contaminación con DNA exógeno.

La contaminación con DNA exógeno es uno de los problemas más complejos que debe enfrentar cualquier investigación con DNA antiguo. Las fuentes de contaminación varían considerablemente dependiendo del tipo de material arqueológico y de la investigación a realizar y es probable que ambos (DNA endógeno y DNA contaminante) puedan ser co-extraídos, por tanto, también es

probable que ambos puedan ser amplificados o en el peor de los casos amplificado, preferentemente, el DNA contaminante.

De cualquier modo, la contaminación que pudiera suceder previa a la excavación es, obviamente, imposible de evitar; sin embargo, el DNA exógeno, probablemente presente las mismas características de degradación y daño molecular que el DNA de la muestra y podría ser detectado realizando extracciones independientes desde un mismo individuo (Francalacci 1995). En relación a DNAs de microorganismos del medio ambiente, la especificidad de los *primers*, juega un papel sustancial a la hora de amplificar selectivamente sólo el DNA de interés; no obstante, queda claro que, en casos de material muy degradado, es muy difícil excluir la posibilidad de amplificar pequeñas secuencias de DNA que sean homólogas entre la muestra y los contaminantes (Sidow *et al.* 1991).

La contaminación pre-laboratorio es quizás, de las más difíciles de controlar, los arqueólogos y antropólogos años atrás, no pudieron haber imaginado los avances del análisis de aDNA en el futuro, por lo que, la manipulación de los restos era realizada sin ningún tipo de precaución; en el caso de muestras provenientes de museos, generalmente, han sido previamente tratadas con sustancias que contienen derivados animales, lo que podría ser una fuente probada de contaminación (Nicholson *et al.* 2002). No obstante, en el presente, se están tomando las previsiones necesarias para detectar y minimizar la contaminación durante esta fase de la investigación (Yang & Watt 2005), tales como:

- Caracterizar genéticamente a los arqueólogos y todo el equipo humano que participe en la excavación.
- Utilizar mascarillas y guantes estériles y desechables para la manipulación de los restos.
- Evitar el lavado de los especímenes con agua.
- En la medida de lo posible, evitar el uso de sustancias preservativas que pudieran contaminar y/o inhibir las amplificaciones mediante PCR.
- Almacenar los restos arqueológicos en lugares secos, fríos y separados del material moderno de referencia.

- Finalmente, antes de cualquier procedimiento dentro del laboratorio, hacer una limpieza exhaustiva de las muestras con hipoclorito de sodio e irradiación ultravioleta, para inactivar, de esta manera, cualquier DNA exógeno.

Una de las estrategias mas importantes en la etapa pre-laboratorio es la adecuada selección del material arqueológico, preferentemente el uso de dientes ya que, debido a sus características morfológicas e histológicas, la contaminación por manipulación es menos probable (Drancourt *et al.* 1998; Gilbert *et al.* 2003a). Se ha demostrado que los factores ambientales y las condiciones tafonómicas inducen lesiones más destructivas en el DNA que se encuentra en los huesos que en el DNA de los dientes (Degusta *et al.* 1994; Ricaut *et al.* 2005), ya que el esmalte y el cemento dental se convierten en una barrera natural contra los cambios físicos y químicos a los que se expone el enterramiento.

En relación a la contaminación en el laboratorio, se han publicado distintos procedimientos metodológicos dirigidos especialmente para evitar que el DNA contaminante (similar o idéntico al DNA endógeno) sea amplificado mediante la técnica de PCR (Pääbo 1989; Lindahl 1993a; 1993b; Cooper & Poinar 2000; Cipollaro *et al.* 2005; Willerslev & Cooper 2005; Yang & Watt 2005). Asimismo, estos procedimientos van dirigidos a prevenir la llamada contaminación cruzada (*carryover*), que supone que DNAs previamente extraídos o amplificados –amplicones–, puedan permanecer a manera de aerosol en el ambiente y/o quedar adheridos a la superficie de los equipos de trabajo por largos períodos de tiempo (Kwok & Higuchi 1989). De los aspectos generales más importantes a tomar en cuenta, para minimizar la contaminación dentro del laboratorio, se pueden citar:

- Caracterización genética de los investigadores.
- Laboratorios de uso exclusivo para los procesos pre-PCRs, separados física y logísticamente de cualquier procedimiento post-PCR y de investigaciones con DNA moderno.
- Ubicación estratégica del termociclador, lejos de los laboratorios pre-PCRs.
- Uso de indumentaria estéril desechable, mascarillas y guantes estériles.
- Limpieza del área de trabajo, equipos e instrumental con soluciones de hipoclorito de sodio y alcohol al 70%.

- Esterilización de los reactivos de extracción y PCRs.
- Esterilización de instrumental en autoclave e irradiación con luz ultravioleta.

El conocimiento de las características moleculares del DNA antiguo (Pääbo & Wilson 1991) y la falta de reproducibilidad de muchos de los primeros trabajos (Sidow *et al.* 1991; Walden & Robertson 1997, entre otros), tuvo como consecuencia un ambiente de gran desconfianza hacia los trabajos publicados en aDNA, es por ello que, desde el mismo inicio de las investigaciones en esta disciplina científica, se han establecidos pautas o criterios a seguir que intentan demostrar la autenticidad de los resultados (Pääbo 1989; Lindahl 1993a; Cooper & Poinar 2000; Montiel *et al.* 2001, Pääbo *et al.* 2004; Willerslev & Cooper 2005; Yang & Watt 2005), entre los que se pueden destacar:

- Uso de controles negativos de extracción y de amplificación.
- Repetidas amplificaciones desde el mismo o de diferentes extractos de un mismo individuo.
- Clonación de producto amplificado y secuenciación de múltiples clones.
- Reproducción de los experimentos en un segundo laboratorio.
- En el caso de DNA mitocondrial antiguo, la correspondencia entre las sustituciones nucleotídicas en las secuencias de la región HVI y el análisis de sitios polimórficos estables en la región codificante.
- Sentido filogenético. En poblaciones humanas, este criterio es posible aplicarlo, sólo en algunos casos, donde el DNA de la población analizada puede ser claramente diferenciado del DNA de los investigadores, como en el análisis de restos de Nativos americanos o de poblaciones aisladas.
- Correlación inversa entre efectividad de las amplificaciones y la longitud del fragmento amplificado, entre otros.

La estricta aplicación de una apropiada metodología es una herramienta indispensable para la validación de los resultados en los estudios con aDNA. Sin embargo, el inherente riesgo del daño molecular *post-mortem* es, sin duda, la segunda gran dificultad a la cual se enfrentan este tipo de investigaciones.

1.5.2. Daño post-mortem del material genético.

Inmediatamente después de la muerte, los procesos autolíticos debidos a las enzimas propias del organismo (lipasas, proteinasas, amilasas, nucleasas) y la descomposición producida, especialmente, por bacterias, hongos e insectos, causan un rápido deterioro de los tejidos blandos y por ende, el deterioro del DNA que se va acumulando progresivamente, con la irreversible pérdida de la continuidad en la información de su secuencia nucleotídica.

En cuestión de semanas no debería existir ningún tipo de DNA amplificable; no obstante, algunas veces, debido a ciertas condiciones, este deterioro no es completo, siendo el daño más significativo la degradación del DNA en fragmentos de pequeño tamaño, que oscilan entre 100 y 500 pb (Pääbo 1989; Hofreiter *et al.* 2001b), debido principalmente, a la acción de las endonucleasas y exonucleasas que fraccionan la cadena de DNA y que luego eliminan nucleótidos a partir de los extremos libres de los pequeños fragmentos. No obstante y dependiendo de ciertas características propias de la muestra, ha sido posible la amplificación de fragmentos de mayor número de pares de bases, como se informa en las publicaciones de, por ejemplo, Hagelberg (1994a; 1994b); Lambert *et al.* (2002) y Barnes *et al.* (2002).

Esta condición de fragmentación del DNA antiguo supone, incluso, un criterio de autenticidad, ya que la amplificación de fragmentos de DNA superiores a 500 pb podría, muy probablemente, tratarse de que el DNA extraído estuviera contaminado con DNA exógeno (Pääbo *et al.* 1989). De las hipótesis que intentan explicar la supervivencia del DNA *post-mortem* en tejidos duros (hueso y diente), está la presencia de la matriz orgánica mineralizada que recubre a las células metabólicamente activa de estos tejidos, tal es el caso de los osteocitos en el hueso y de las prolongaciones de los odontoblastos en la dentina, siendo las mitocondrias una de las estructuras intracelulares más abundantes. Es posible que estos elementos celulares puedan sufrir un proceso de “momificación” al estar rodeados de la matriz mineralizada y quedar excluidos físicamente de microbios y contaminantes externos (Hummel & Herrmann 1994); o bien, que el DNA, por su

afinidad a la hidroxiapatita (compuesto cristalino de fosfato de calcio), pueda unirse a este compuesto y por lo tanto quedar protegido, en gran medida, de la acción de las enzimas autolíticas (Lindahl 1993a; Nielsen *et al.* 1994).

En el análisis de aDNA es muy frecuente encontrar falsos negativos debido a la presencia de sustancias inhibidoras, entre los que se destacan los derivados medio ambientales como ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, que bloquean la actividad de la *Taq* DNA-polimerasa, durante la PCR. Hoy en día, aún se desconoce la naturaleza y los mecanismos de acción de los inhibidores y es probable que la inhibición sea un problema de tipo multifactorial, por lo cual, las estrategias para evitarlo pueden traer como consecuencia un mayor riesgo de contaminación. En nuestro laboratorio, el DNA extraído a partir de dientes, es almacenado durante 3 días, a 4° C antes de ser amplificado; pasado este tiempo, se procede a realizar la PCR, extrayendo alícuotas de DNA en suspensión con micropipetas sin tocar las paredes del microtubo (Montiel *et al.* 1997). La hipótesis propuesta por Montiel es que la baja temperatura promueve la absorción de las sustancias inhibidoras en las paredes del microtubo de polipropileno, de esta manera, el producto en suspensión es más puro, incrementando significativamente la eficacia de las amplificaciones (Montiel 2001).

Una de las estrategias usualmente utilizada con la finalidad de minimizar la acción de los inhibidores, que pudieran ser co-extraídos con el DNA y que además, es un procedimiento de rutina en nuestro laboratorio, es la incorporación de BSA (*Bovine Serum Albumin*) al *master-mix* de PCR, ya que esta sustancia se une a gran cantidad de compuestos potencialmente inhibidores de la *Taq* DNA-polimerasa (Pääbo & Wilson 1988, Sensabaugh & Blake 1994). Por otra parte, se utiliza poca cantidad de extracto de DNA en suspensión, para evitar así, añadir mayor cantidad de posibles sustancias inhibidoras a la mezcla final de reacción de PCR.

Aparte de la fragmentación y de la presencia de sustancias que obstaculizan la PCR, es posible también, la existencia de otros tipos de modificaciones químicas, causadas fundamentalmente por procesos de hidrólisis y oxidación, que suceden con cierta regularidad en la molécula de DNA metabólicamente activa, pero que en el caso del aDNA la pérdida de los procesos de reparación provocan la ineludible discontinuidad de la molécula, incrementando así, la degradación del material

genético *post-mortem*. Además, las lesiones ocasionadas por procesos oxidativos, son también considerados inhibidores de la PCR (Pääbo 1989).

Entre los procesos hidrolíticos tenemos:

- Ruptura de enlaces glicosídicos que originan sitios sin bases (*Baseless*), los cuales son susceptibles a la ruptura de la doble cadena. Siendo más frecuentes en las purinas (adeninas, guaninas), llamado depurinización que en las pirimidinas (citocinas, timinas) que se conoce como depirimidización (Lindahl & Nyberg 1972).
- Desaminación hidrolítica, que causa la incorrecta incorporación de las bases (A→G y C→T) durante la PCR. La desaminación hidrolítica de las purinas es menos frecuente que la desaminación hidrolítica de las pirimidinas, principalmente, la desaminación de la citosina que la convierte en uracilo, por lo que el número de mutaciones espontáneas C→T es mayor (Gilbert *et al.* 2003a), por lo tanto, si una secuencia de aDNA presenta un número inusual de sustituciones C→T, podría ser considerada como daño molecular (Hansen *et al.* 2001; Hofreiter *et al.* 2001b; Gilbert *et al.* 2003a), ya que otro tipo de daños producen otro tipo de sustituciones.

Entre los procesos oxidativos se encuentran:

- La acción de radicales libres, tales como: hidroxilos ($\bullet\text{OH}$), peróxidos ($\bullet\text{O}_2$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que pueden suceder durante la degradación bacteriana después de la muerte (Poinar 2002), estos radicales libres rompen la integridad de la molécula de DNA por adición a los carbonos C5 o C6 de las pirimidinas y en el caso de las purinas por la adición a los carbonos C4 o C8.
- Puentes cruzados (*Cross-links*), se pueden producir entre cadenas de DNA o entre el DNA y las proteínas del medio. Generalmente se producen por la condensación de los azúcares de la cadena de DNA y los grupos amino de las bases nitrogenadas o de las proteínas (Reacción de Maillard). Cuando los extractos de DNA en suspensión presentan una coloración que varía entre distintas intensidades del marrón, es posible suponer que es el producto de esta reacción.
- Transformación de las pirimidinas en compuestos de la hidantoína.

Otras modificaciones son las originadas por incorporaciones erróneas de bases producidas por la propia *Taq* DNA-polimerasa que, habitualmente, suceden de forma aleatoria, enmascarando los cambios reales en el DNA endógeno. Recientemente se han utilizado las enzimas llamadas *Hi-fidelity*, que posiblemente producen un menor número de incorporaciones erróneas (*misincorporations*) que las producidas por la *Taq* tradicionalmente utilizada, y han permitido identificar y caracterizar los dos tipos de cambios más frecuentes: los tipo I $T \rightarrow C$ y $A \rightarrow G$ y los tipo II $C \rightarrow T$ y $G \rightarrow A$ (Hansen *et al.* 2001).

La obtención de secuencias quiméricas producidas por el efecto PCR saltarina (*jumping PCR*), es otro de los problemas a los que se enfrentan los estudios con aDNA (Pääbo 1989), los productos quiméricos de estas reacciones pueden ser fácilmente confundidos con DNA nuclear o mitocondrial endógeno. Tal es el caso de Kuznetsov *et al.* (2001), citado por Olson & Hassanin (2003), los cuales habían identificado una nueva especie de búfalos en Vietnam con base en un fragmentos de 962 pb, del gen 12S rRNA del mtDNA; sin embargo, un año más tarde, Hassanin (2002), citado también por Olson & Hassanin (2003), demostraba que las secuencias correspondían a quimeras de DNA de otros mamíferos presentes en los extractos.

En el DNA mitocondrial de individuos vivos se han definido algunas posiciones nucleotídicas dentro de la región HVI que son altamente hipermutables, los cuales son llamados *hot spots* (Heyer *et al.* 2001), y que posiblemente los mismos sitios podrían ser también susceptibles de daños *post-mortem*. Estudios realizados en aDNA por Gilbert *et al.* (2003b), soportan la presunción de la existencia de daños *hot spots post-mortem*, y además que hay una correlación entre los sitios mutacionales *in vivo* y los *hot spots post-mortem*; ya que, según Meyer S, *et al.* (1999), los procesos que suceden en las modificaciones *post-mortem* de las secuencias, son análogos a los que conducen a las mutaciones *in vivo*, y que las estructuras secundarias y terciarias del DNA pueden predisponer o proteger ciertos sitios nucleotídicos de ser dañados.

Distintos métodos han sido propuestos para intentar disminuir los efectos de cualquiera de las lesiones referidas y de esta manera, incrementar la calidad y cantidad del aDNA amplificable; sin embargo, pocos trabajos significativos han sido

divulgados con la aplicación de estas técnicas, tales como, las investigaciones publicadas por el grupo de la Universidad de Oxford, Inglaterra (Gilbert *et al.* 2003a; 2003b).

En resumen, como lo expresan Pääbo y colaboradores (2004), el estudio del DNA antiguo requiere resultados que sean fiables y reproducibles, la exigencia más importante ante cualquier proyecto es una actitud razonablemente escéptica del investigador a su propio trabajo y su eficiencia dependerá, de un claro concepto científico que incluya las estrategias metodológicas necesarias para asegurar la validez de sus resultados. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el análisis de DNA a partir de restos antiguos nos ofrece la posibilidad de contribuir a la comprensión de la evolución de las poblaciones antiguas mediante la genética molecular.



Piedra del Sol
Calendario Azteca

2. Objetivos

2.1. Objetivo general.

En la actualidad no existen poblaciones humanas que no hayan recibido la contribución genética de otras poblaciones y la población americana es uno de los ejemplos más claros que sustenta este postulado.

En este trabajo, intentamos aportar datos para la caracterización genética desde la Mesoamérica Prehispánica hasta el Virreinato de la Nueva España, especialmente a partir del DNA mitocondrial, y de esta manera inferir los posibles movimientos poblacionales que han dado origen a la población actual mexicana.

Para alcanzar este objetivo principal, analizamos los linajes matrilineales de individuos de tres épocas históricas diferentes, precontacto, contacto y post-contacto, localizados en el Valle Central de México, a partir de DNA recuperado de restos esqueléticos. Por ello nos hemos planteado una serie de objetivos específicos de carácter metodológico, relacionados específicamente con los procedimientos técnicos que permiten recuperar y analizar material genético antiguo; y otros objetivos de carácter poblacional y filogenético, que incluyen métodos de reconstrucción filogenética entre las series antiguas del Valle Central mexicano analizadas en este trabajo y un conjunto de poblaciones antiguas y contemporáneas de América y Asia. Estos objetivos se describen a continuación.

2.1. Objetivos específicos.

2.1.1. Objetivos metodológicos.

Estos objetivos van dirigidos a valorar y mejorar los métodos de obtención y procesamiento de DNA antiguo, desarrollados en la Unidad de Antropología Biológica de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), en cuanto a:

- Optimizar los protocolos de obtención de la muestra, extracción y amplificación mediante PCR de DNA antiguo.
- Obtener DNA amplificable y secuenciable de restos humanos antiguos provenientes del continente americano.
- Adecuar un protocolo de reacción de secuenciación para el análisis de la región HVI del mtDNA en material genético antiguo.
- Poner a punto en nuestro laboratorio el protocolo para la amplificación de STRs a partir de DNA antiguo.
- Diferenciar los tipos mitocondriales mediante el análisis de enzimas de restricción específicos para poblaciones americanas y la secuenciación de un fragmento de la región HVI.
- Autenticar el DNA extraído de restos antiguos, a partir de los criterios clásicos para investigaciones con DNA antiguo, propuestos por diversos autores y que se encuentran ampliamente descritos en Pääbo *et al.* (2004); y además, considerar el uso de la correspondencia entre los polimorfismos de restricción y los polimorfismos de la región HVI del mtDNA, propuesto por Montiel *et al.* (2001), para autenticar los resultados.

2.2.2. Objetivos poblacionales y filogenéticos.

- Caracterizar genéticamente tres series antiguas cronológicamente distintas dentro del contexto geográfico y cultural mesoamericano, designadas como: Precontacto, Contacto y Post-contacto, mediante el análisis de RFLPs y la delección de 9 pb entre los genes COII/tRNA^{lys} de la región codificante y la secuenciación de un fragmento de la región de control HVI del DNA mitocondrial. Eventualmente, caracterizar las series mediante el análisis de STRs.

- Analizar el grado de endogamia y parentesco de cada serie con el uso de los haplogrupos y secuencias mitocondriales y STRs.
- Comparar con análisis estadísticos y filogenéticos la relación genética entre las series precontacto, contacto y post-contacto caracterizadas en este estudio, entre sí y con poblaciones antiguas y contemporáneas mexicanas.
- Comparar con análisis estadísticos y filogenéticos, la frecuencia de haplogrupos mitocondriales y la variabilidad nucleotídica de la región HVI de las tres series antiguas del Valle Central de México (precontacto, contacto y post-contacto), con datos procedentes de otros grupos antiguos y contemporáneos de Nativos americanos.
- Valorar el uso del fragmento de la región HVI del mtDNA utilizado en este trabajo, en las reconstrucciones filogenéticas con poblaciones asiáticas, especialmente, en la comparación con grupos antiguos del norte de Mongolia y aborígenes contemporáneos del suroeste de Siberia.
- Contribuir, con datos genéticos de poblaciones antiguas, al conocimiento del poblamiento del subcontinente mesoamericano, especialmente en el área del Valle Central mexicano.
- Determinar el impacto, en la herencia matrilineal, del proceso de conquista del territorio mexicano por parte de la colonia española, que se extendió entre los siglos XVI-XIX y que determinó, por una parte, una clara caída demográfica y, por otra, el mestizaje cultural americano.



¹¹ "...los que nacían aquí habían de llegar a viejos y ser ricos hombres". Códice Borbónico.

3. Materiales y Métodos

3.1. Muestra.

Se seleccionaron de forma aleatoria 102 dientes, en buenas condiciones de conservación y sin ningún tipo de patologías de individuos pertenecientes a cuatro de las colecciones esqueléticas del INAH (Instituto Nacional de Antropología e Historia) de México. Este material fue proporcionado por los investigadores del proyecto *"Time variation in Mesoamerica: testing the effects of the European contact and reconstructing scenarios"* GR 6863, de la *Wenner-Gren Foundation for Anthropological Research* y parcialmente financiado por éste. Se excluyeron todos aquellos dientes con caries, fracturas o fisuras, asimismo, se descartaron los dientes de individuos infantiles o jóvenes con raíces incompletas o forámenes apicales abiertos ya que en cualquiera de los casos, podrían representar una puerta de entrada de DNA contaminante.

La muestra comprende tres series cronológicamente distintas, localizadas en el contexto cultural y geográfico azteca del Valle Central mexicano (figura 3.1):

- 1 Treinta individuos del yacimiento precontacto de la ciudad de Tlatelolco, en el estado de México (Post-clásico tardío mesoamericano, datados entre 1350-1400, aproximadamente).
- 2 Treinta y seis individuos del yacimiento de contacto de la comunidad de Los Olmos, que corresponde a un asentamiento colonial llamado Tetetzontilco, en el municipio Tizayuca, estado de Hidalgo (Colonial temprano, siglo XVI entre 1531-1600).
- 3 Treinta y seis individuos de los yacimientos de post-contacto de Santa María Texcalac en el estado de Tlaxcala y Hospital San Juan de Dios en la Ciudad de México, (ambos del período Colonial tardío, de los siglos XVII y XIX), las muestras de estos dos yacimientos se tomaron como un grupo por pertenecer a un mismo período histórico.

Los individuos pertenecientes a la serie prehispánica o precontacto del período Post-Clásico tardío, fueron recuperados del yacimiento de Tlatelolco, ciudad gemela de Tenochtitlán, fundada aproximadamente en el año 1338 d.C., localizada en el lago de Texcoco en lo que hoy es el estado de México. Tlatelolco fue una de las ciudades más importantes del Imperio Azteca, en ese lugar funcionaba el gran mercado que abastecía de productos provenientes de toda Mesoamérica a la capital azteca. Es de destacar que los esqueletos recuperados en este sitio arqueológico se encuentran muy bien preservados (Martínez-Abadías *et al.* 2006).

El cementerio hallado en lo que hoy es la comunidad de Los Olmos, en el municipio Tizayuca, estado de Hidalgo, ubicado a 52 Km de la Ciudad de México, tiene una cronología cercana a la época de la Conquista española, razón por la cual fue denominada serie contacto. Según Prada & Sterpone (1999), este cementerio típicamente indígena, ubicado en un medio rural, en un poblamiento llamado Tetetzontlilco, estaba habitado por un reducido número de personas y ubicado distante a los poblados aledaños. Funcionó desde 1531-1533, a la llegada de los primeros evangelizadores franciscanos, hasta aproximadamente el año 1600; estos datos se sustentan en que el asentamiento no aparece registrado en ninguna de las fuentes históricas posteriores a la fecha. Las características de los enterramientos siguen el rito cristiano, lo que supone la aceptación de la religión católica en las primeras fases de la conquista (Prada & Sterpone 1999).

Finalmente, los 2 yacimientos del período Colonial, definidos como serie post-contacto, debido a que, para los siglos XVII-XIX la sociedad mexicana y en especial la del Valle Central de México, estaba conformada por grupos españoles e indígenas con una pequeña aportación africana (Aguirre Beltrán 1972). Las muestras proceden de dos hallazgos arqueológicos, ambos con características indígenas: uno que pertenece al convento franciscano de Santa María Texcalac en el estado de Tlaxcala (siglo XVII-XVIII) y otro que representa la población urbana de la época, localizado en el Hospital San Juan de Dios en Ciudad de México (siglo XIX).

Debido a que era necesario ajustar algunos de los procesos metodológicos para poblaciones americanas (especificidad de los *primers*, temperaturas de *annealing*, diferenciación de los cortes enzimáticos, reacciones de secuenciación,

etc.) y teniendo en cuenta que sólo se disponía de un diente de la mayoría de los individuos de los yacimientos mesoamericanos descritos, seleccionamos 7 muestras dentarias de otro yacimiento mexicano de datación desconocida que no pertenece al área geográfica de Mesoamérica, específicamente del yacimiento de Barrancos Caídos, localizado en el estado de Nuevo León, para ser utilizadas como controles y que no fueron incluidas en los análisis poblacionales.

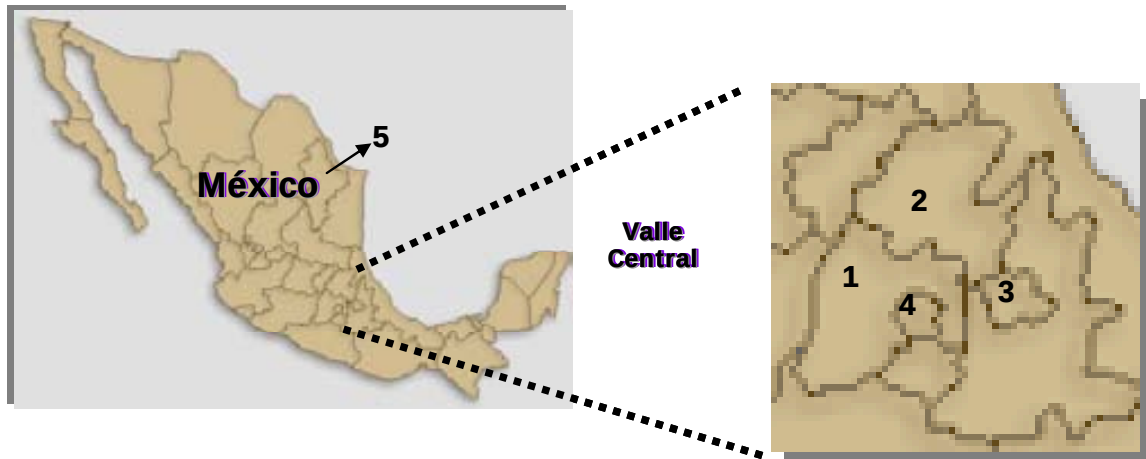


Figura 3.1. Localización geográfica de los sitios arqueológicos analizados en este estudio.

1. Estado de México. Yacimiento precontacto de Tlatelolco.
2. Estado de Hidalgo. Yacimiento contacto de la Comunidad de Los Olmos.
3. Estado de Tlaxcala. Yacimiento post-contacto de Santa María Texcalac.
4. Ciudad de México. Yacimiento post-contacto Hospital San Juan de Dios.
5. Estado de Nuevo León. Yacimiento de Barrancos Caídos (Población de Control).

3.2. Método.

La fase experimental se realizó siguiendo la metodología desarrollada por Montiel (2001), sobre la que se han efectuado modificaciones que se encuentran detalladas en el "*Manual de laboratorio de DNA antiguo*", elaborado por Montiel R, Solórzano E, Díaz N, y Malgosa A, en el año 2003 y que se utiliza como protocolo de referencia en el laboratorio de aDNA-UAB. Asimismo, se han aplicado, de manera estricta, todos los criterios de esterilización establecidos en el laboratorio y que se describen en este trabajo.

Los procesos de extracción y amplificación mediante PCR se realizaron en un laboratorio dedicado exclusivamente al trabajo con aDNA, provisto de aire ultrafiltrado con presión positiva y todo el equipamiento necesario para los

procedimientos pre-PCR (cabina de flujo laminar, estufa, micromotor de baja velocidad con pieza de mano, *vortex*, agitador magnético, nevera y congelador); asimismo, el laboratorio se encuentra separado física y logísticamente de cualquier procedimiento post-PCR. Además, se utilizaron micropipetas distintas para cada proceso, que fueron esterilizadas periódicamente con alcohol al 70% e irradiadas con luz ultravioleta (UV-254 nm), puntas estériles con filtros resistentes a los aerosoles, indumentaria estéril desechable, mascarillas, protectores plásticos para los brazos y guantes que fueron cambiados con frecuencia durante cada procedimiento (figura 3.2).

La cabina de flujo laminar se sometía, después de cada proceso, a una estricta limpieza y esterilización que consistía en lavado con agua jabonosa (mezcla de agua desionizada y detergente aniónico), hipoclorito de sodio, aclarado con agua desionizada y alcohol al 70%. Finalmente, se colocaba dentro de la campana el material necesario para el siguiente proceso y se irradiaba por 1 hora con luz ultravioleta. Como paso opcional, cuando se consideraba necesario, se incluyó un lavado con Termi-DNA-Tor Biotools®, reactivo que elimina DNA y RNA de superficies e instrumental de trabajo.

Los equipos, material de vidrio e instrumental odontológico utilizado para la toma de la muestra, se sometieron constantemente al proceso de esterilización adecuado, que en forma general consistía de:

- 1 Lavado exhaustivo con agua jabonosa (utilizando detergente aniónico) y posteriormente con solución de hipoclorito de sodio al 25%.
- 2 Aclarado con agua desionizada.
- 3 Secado dentro de la cabina con el flujo laminar conectado e irradiado con la luz ultravioleta de la propia cabina, durante 30 minutos aproximadamente.

Los instrumentos odontológicos, luego de lavados y secados, fueron colocados en bolsas estériles especialmente diseñadas para esterilización en autoclave. En cada bolsa se incluía un equipo de extracción (figura 3.3) que consiste en: un fórceps recto (específico para extracción de dientes anteriores), una pinza algodoner, un disco con borde diamantado y una fresa cónica con cubrimiento de

diamantes (se utilizaba un equipo de extracción por cada diente tratado), el resto del instrumental fue envuelto con papel aluminio previamente esterilizado. A las pipetas *Pasteur*, antes de ser esterilizadas, se les colocaba algodón en su extremo superior con la finalidad de retener aerosoles. Finalmente, todo el instrumental y el material de vidrio fueron autoclavados a 121° C, durante 60 minutos.



Figura 3.2. Indumentaria de trabajo de laboratorio.



Figura 3.3. Equipo para obtención de la muestra.

Los reactivos fueron preparados dentro de la cabina de flujo laminar, utilizando agua desionizada, estéril y material previamente esterilizado; además, después de su preparación, se sometieron a los procesos de esterilización que dieran lugar. En general, la mayoría de los reactivos fueron alicuotados y almacenados según las indicaciones de la casa comercial.

3.2.1. Extracción y purificación de DNA.

En cada extracción fueron procesados de 4 a 5 dientes para un extracto de DNA cada uno; asimismo, en cada proceso se incluyó un blanco de extracción (KE) que contenía sólo los reactivos para el control de la contaminación. Antes de la toma de la muestra, los dientes se esterilizaron, colocándolos durante 10 minutos en tubos estériles de 50 ml que contenían hipoclorito de sodio, agitando varias veces con la finalidad de desprender la tierra que pudiera estar adherida a la superficie dentaria. Luego se irradiaron con luz ultravioleta, durante 15 minutos, por cada una de las caras, vestibular y lingual/palatina, utilizando la tapa del tubo como soporte.

Para la obtención de la muestra se procedió de la siguiente manera: El diente se sostenía por la porción radicular con el fórceps y utilizando un micromotor de baja velocidad con pieza de mano y disco de borde diamantado, se seccionó transversalmente por el límite amelo-cementario (figura 3.4). Una vez separada la corona de la raíz, se limpiaron las paredes del o de los conductos radiculares usando una fresa cónica de diamante (figura 3.5), obteniéndose, de esta manera, polvo de dentina del conducto radicular, que se recolectó directamente en tubos estériles de 15 ml.

El polvo de dentina (aproximadamente 0.05 gr) fue sometido a digestión enzimática con 50 µl de *proteínasa K* (PK), a la concentración de 10 mg/ml; y 5 ml de tampón de extracción, llamado también solución de lisis. La PK es una proteasa que digiere químicamente las proteínas y tiene la ventaja de no ser inhibida por el EDTA utilizado en la solución de lisis.



Figura 3.4. Corte del diente por el límite Amelo-cementario.



Figura 3.5. Obtención de polvo de dentina de los conductos radiculares.

El tampón de extracción contenía los siguientes reactivos:

- 1 EDTA 0.5 M, ajustado a pH 8 con NaOH concentrado. Es un quelante iónico que actúa descalcificando el tejido mineralizado.
- 2 Tris-HCl 1 M, pH 8.0-8.5, que actúa como estabilizador de pH.
- 3 SDS al 10%. Es un detergente aniónico que actúa disolviendo los lípidos orgánicos.
- 4 H₂O deionizada estéril.

Después de agregar la solución de lisis a cada tubo con polvo de dentina, estos tubos se agitaron e incubaron a 37° C, durante toda la noche. Finalmente, se procedió a la limpieza y esterilización de la cabina de flujo laminar, colocando dentro el material necesario para la continuidad del proceso de extracción e irradiando con luz ultravioleta durante 1 hora. Es importante destacar, que entre la toma de las muestras y la extracción de DNA, nunca se realizó otro procedimiento dentro del laboratorio de aDNA.

Al siguiente día, se continuó con la fase de extracción mediante un procedimiento basado en fenol/cloroformo, con el propósito de separar el DNA de los restos celulares, como se describe a continuación:

- 1 Se agrega 5 ml de fenol al producto digerido, se agita vigorosamente y se centrifuga a 2000 rpm, durante 7 minutos a 8° C, al final del centrifugado se observan dos fases, descartándose la fase superior o fenólica⁹, utilizando pipetas *Pasteur* estériles.
- 2 A la fase acuosa se adiciona 5 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se agita y se centrifuga con las condiciones previamente puntualizadas, nuevamente se forman dos fases y en este paso se recupera el sobrenadante (fase superior) con la ayuda de las pipetas *Pasteur*.
- 3 Al producto recuperado, se le agrega 5 ml de cloroformo, y se centrifuga bajo las mismas condiciones antes especificadas; se forman nuevamente dos fases. Se recupera la fase superior con pipetas *Pasteur* y se traslada a un

⁹ Cuando se utilizan altas concentraciones de EDTA en el tampón de extracción, como es nuestro caso, las fases se invierten, quedando la fase acuosa por debajo de la fenólica.

tubo que no contiene ningún reactivo. Se centrifuga y se verifica que no queden dos fases; si fuera el caso, se recupera nuevamente la fase superior y se repite el centrifugado en otro tubo, ya que si quedaran trazas de cloroformo podrían dañar la membrana filtrante del dispositivo de concentración en los pasos subsiguientes.

- 4 A continuación, la fase acuosa resultante del último centrifugado se concentra y purifica en dispositivos de ultrafiltración, (*centricon with Ultracel YM-30, membrane Millipore®*) (figura 3.6), que contienen una membrana filtrante con capacidad de retener moléculas con un peso molecular mayor de 30000 Daltons, a una carga máxima de 2 ml y una fuerza de centrífuga máxima de 5000 x g, por no más de 5 ciclos de centrifugaciones, ya que mayor cantidad de ciclos pueden provocar la ruptura de la membrana filtrante. Los últimos lavados se completan con agua ultrapura estéril.
- 5 Finalmente, para recuperar el producto concentrado se invierte el dispositivo y se centrifuga durante 10 minutos. Los extractos de DNA en suspensión (entre 20 y 35 µl) se trasladan a tubos estériles de 1.5 ml y se almacenan a 4° C durante 3 días con la finalidad de minimizar los efectos de los inhibidores de PCR (Montiel *et al.* 1997). Este último paso está descrito en la sección 1.3.2 de la Introducción.

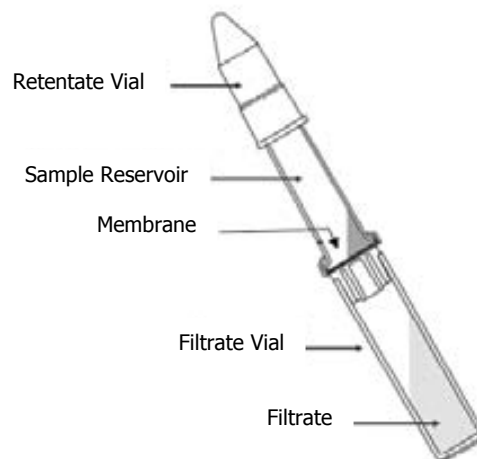


Figura 3.6. Esquema de un centricon YM-30. Se describe cada una de sus partes. Modificado de *Centricon Centrifugal Filter Devices. User Guide*. www.millipore.com

3.2.2. Caracterización Genética.

El estudio del DNA mitocondrial (mtDNA) se basó en la combinación y correspondencia del análisis de sitios polimórficos estables en la región codificante, incluyendo polimorfismos de restricción (RFLPs) y una delección polimórfica, y la secuenciación de un fragmento de la región HVI. El uso de la correspondencia entre los polimorfismos de restricción y las sustituciones nucleotídicas en la región de control tiene como objetivo diferenciar los tipos mitocondriales (Torroni *et al.* 1996); por otra parte, es uno de los criterios que se han propuesto para autenticar los resultados en investigaciones con DNA antiguo (Montiel *et al.* 2001).

3.2.2.1. Región Codificante.

Se analizaron los 4 marcadores del mtDNA descritos para linajes de nativos americanos por Wallace *et al.* (1985); Schurr *et al.* (1990) y Torroni *et al.* (1992); sólo en el caso de que la muestra no fuese asignada a ninguno de los principales linajes americanos, se procedía al análisis de la posición polimórfica que define al haplogrupo X. En todos los casos se amplificaron, mediante PCR, fragmentos de entre 120 y 182 pb de la región codificante que contienen los sitios de restricción específicos para los linajes americanos y la delección de 9 pb. Los *primers* para definir los haplogrupos A, B, C y D están descritos y recopilados en el trabajo de Stone & Stoneking (1998), y los utilizados para el haplogrupo X, fueron especialmente diseñados para este estudio; todos están especificados en la tabla 3.1.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, que contenía: 10 mM Tris HCl pH 9; 2 mM de Mg₂Cl, 200 µM de cada dNTP, 50 pmol de cada primer, 160 mg/ml de BSA, 2 U de Taq DNA-polimerasa Bioline® y 1-2 µl de DNA en suspensión (generalmente se utilizó 1 µl para amplificar región codificante y 2 µl para amplificar la región de control).

Tabla 3.1.
Descripción de las parejas de *primers* para cada uno de los fragmentos amplificados en la región codificante.

Haplogrupo	<i>Primers</i> ^a	Tamaño (bp)	Coordenadas ^a	Secuencias de <i>Primers</i> (5' - 3')	Referencias
A	F-635/R-708	120	609-635	TGAAAATGTTTAGACGG <u>C</u> CTCACATC	Handt <i>et al.</i> (1996)
			729-708	TAGAGGGTGAACCTCACTGGAAC	
B	F-8215/R-8297	121	8195-8215	ACAGTTTCATGCCCATCGTC	Wrischnik <i>et al.</i> (1987)
			8316-8297	ATGCTAAGTTAGCTTTACAG	
C	F-13257/R-13393	181	13235-13257	AATCGTAGCCTTCTCCACTTCA	Handt <i>et al.</i> (1996)
			13416-13393	TCCTATTTTTCGAATATCTTGTTTC	Ward <i>et al.</i> (1991)
D	F-5054/R-5189	182	5028-5054	TAGGATGAATAATAGCAG <u>C</u> TCTACCG	Stone & Stoneking (1998)
			5210-5189	GGGTGGATGGAATTAAGGGTGT	Handt <i>et al.</i> (1996)
X	F-14419/R-14513	134	14399-14419	ACACTCACCAAGACCTCAAC	Este estudio
			14533-14513	GGGAGGTTATATGGGTTTAA	

a: numerado según *Cambridge reference sequence*, Anderson *et al.* 1981

C: Citosina. T: Timina. A: Adenina. G: Guanina.

Subrayados los nucleótidos modificados en el diseño de los *primers*.

F (*forward*), R (*reverse*).

El programa del termociclador para las reacciones de PCR, consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94° C, 39 ciclos de 50 segundos de desnaturalización a 94° C, 1 minuto a la temperatura de *annealing* correspondiente -entre 56 y 57° C, en función de los *primers* utilizados-, y 1 minuto de extensión a 72° C, terminando con un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72° C. Por último la temperatura del bloque se mantuvo a la temperatura de almacenamiento (4° C). Cada proceso de PCR se realizó para un máximo de 12 muestras, incluidos los controles de extracción (KE) que dieran lugar, y un control negativo de amplificación (K-) que contenía todos los reactivos excepto DNA, para el control de contaminación de los reactivos de PCR.

Para comprobar la efectividad del proceso de amplificación, 8.5 µl del producto amplificado y 3 µl de tampón de carga (azul de bromofenol) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa estándar al 3%, que contenía bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml. Una vez terminada la migración del producto amplificado se visualizó bajo luz ultravioleta. El bromuro de etidio es una

molécula fluorescente que se intercala en las bases del DNA y permite visualizar la banda del producto amplificado.

Para verificar la delección de 9 pb (tabla 3.2, figura 3.7), se procedió según lo descrito en el párrafo anterior, utilizando 10 µl del producto de PCR y se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa NuSieve GTG® al 3% (NuSieve es una agarosa de bajo punto de fusión que permite resolver fragmentos pequeños de DNA de entre 10 pb y 1000 pb). El tamaño de la banda se determinó por comparación con un control de tamaño conocido que se amplificaba con las mismas condiciones que el grupo de extractos analizados; además, en todos los casos se incluía un marcador de peso molecular.

Como la delección polimórfica es de sólo 9 pb, se utilizó un control conocido para su comprobación. Este control no es más que una de las muestras antiguas de la población que nos permitió optimizar la técnica y que había sido caracterizada, tanto en la región codificante como de control como perteneciente al haplogrupo B, esta muestra nos permitió confirmar las pequeñas diferencias en el gel de NuSieve entre los productos de PCR con la delección y sin la delección, en cada grupo de amplificados.

Tabla 3.2.
Delección polimórfica para el haplogrupo B.

Haplogrupo	Sitio que define al haplogrupo	Fragmentos
B	Delección de 9 pb entre los genes COII y tRNALys	Derivado (B): 112 pb
		Ancestral (No B): 121 pb

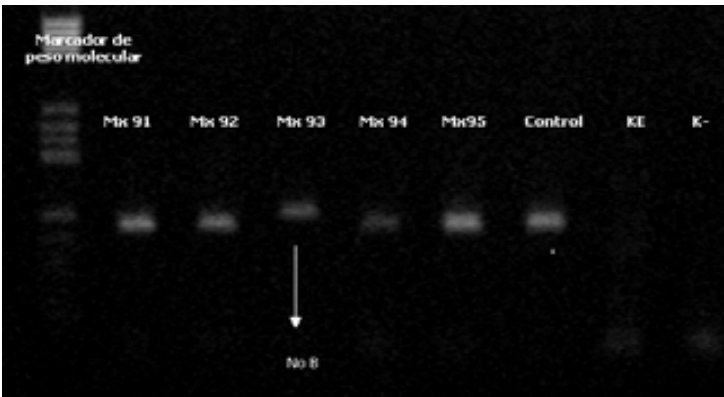


Figura 3.7. Gel de NuSieve 3% para verificar la delección polimórfica de 9 pb que caracteriza al haplogrupo B.
Muestras: Mx 91 al Mx 95, Control: Control conocido amplificado bajo las mismas condiciones, KE: Control de Extracción, K-: Control negativo de amplificación.

Para los otros 3 polimorfismos de restricción, descritos por Torroni *et al.* (1992), (figura 3.8a, 3.8b y 3.8c), y para el haplogrupo X si fuese el caso, se tomaron 10 µl del producto amplificado y se incubaron con 5 unidades de la enzima de restricción específica, en un baño termostático a 37° C, durante toda la noche, y posteriormente fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa NuSieve GTG® al 3%. Los patrones de ausencia-presencia se describen en la tabla 3.3.

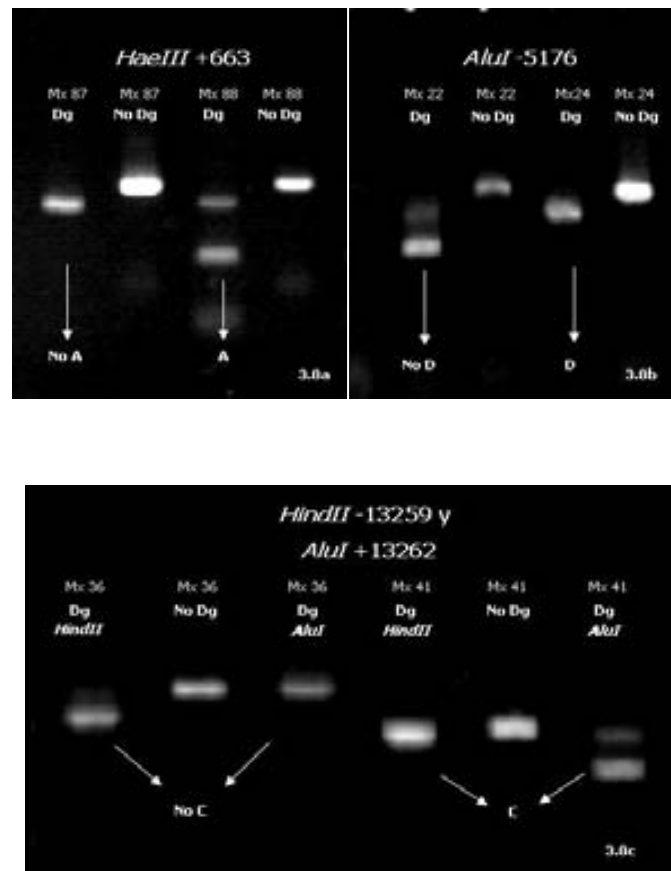


Figura 3.8a, 3.8b y 3.8c. Geles de NuSieve 3% para comprobar los fragmentos de restricción para los tres marcadores mitocondriales americanos.
Dg: Producto de PCR digerido, No Dg: el mismo producto de PCR que no ha sido sometido a digestión enzimática.

Tabla 3.3.
Posiciones polimórficas utilizadas en el análisis de restricción.

Haplogrupo	Sitios que definen a cada haplogrupo ^a	Nucleótido modificado en el primer <i>forward</i> ^b	Fragmentos de restricción
A	+663 <i>Hae</i> III	627(C→G)	Ancestral (No A): 18/102 Derivado (A): 18/36/66
C	-13259 <i>Hinc</i> II y +13262 <i>Alu</i> I		Ancestral (No C): 24/157 Derivado (C) : 181 Ancestral (No C): 181 Derivado (C): 27/154
D	-5176 <i>Alu</i> I	5047(C→T)	Ancestral (No D): 18/130/34 Derivado (D): 18/164
X	+14465 <i>Acc</i> I		Ancestral (No X): 134 Derivado (X): 66/68

a: numerado según *Cambridge reference sequence*, Anderson *et al.* 1981

Las muestras que resultaron negativas para los 5 haplogrupos fundadores americanos, se analizaron para la posición polimórfica 10871 *Mn*/I, la cual define, si la restricción es positiva, que la muestra puede pertenecer a cualquiera de los haplogrupos europeos (Pre-HV, HV, H, V, U, K, J, T, I, X, W, otros); por otra parte, si la restricción resulta negativa, la muestra puede pertenecer a cualquiera de los haplogrupos L1, L2, L3 o M, (Santos C, *et al.* 2004). En este caso, también se siguieron los procedimientos de amplificación y restricción anteriormente descritos, además, se incluyó como control, una muestra antigua del continente europeo perteneciente al haplogrupo H. Los *primers* están detallados en la tabla 3.4.

Tabla 3.4.
Descripción de la pareja de *primers* para la posición 10871 *Mn*/I

<i>Primers</i> ^a	tamaño (bp)	Coordenadas ^a	Secuencias <i>primers</i> (5' - 3')	Referencia
10871 <i>Mn</i> /I		10828-10849	TGAATCAACACAACCAACCCAC	Montiel R. Comunicación personal
F-10849/R-10912	104	10932-10912	AGGAAAAGGTTGGGGAACAG	

a: numerado según *Cambridge reference sequence*, Anderson *et al.* 1981

3.2.2.2. Región Hipervariable I.

Para el análisis de la región HVI, se amplificaron mediante PCR y siguiendo la metodología detallada en la sección 3.2.2.1, fragmentos de entre 129 y 445 pb (los *primers* están descritos en la tabla 3.5). Cuando la intensidad de la banda del producto de PCR de 230 pb era muy buena, se procedía a la amplificación de fragmentos de mayor tamaño (300 ó 445 pb). En el caso contrario, se amplificaron los fragmentos solapantes de menor tamaño (150 y 129 pb). Cuando las bandas se observaron tenues, el producto de PCR fue reamplificado, tomando en cuenta condiciones especiales ya que se trata de un procedimiento post-PCR y en todos los casos se incluyó un blanco de reamplificación (RK).

Tabla 3.5.
Descripción de los *primers* utilizados para amplificar la región HVI.

<i>Primers</i> ^a	Coordenadas ^a	Secuencias <i>primers</i> (5' - 3')	Referencias
F-15996	15975-15996	CTCCACCATTAGCACCCAAAGC	Vigilant <i>et al.</i> 1991
R-16255	16274-16255	CCTAGTGGGTGAGGGGTGGC	Francalacci P. Comunicación Personal
F-16209	16190-16209	CCCCATGCTTACAAGCAAGT	Montiel 2001
R-16401	16420-16401	TGATTTACGGAGGATGGTG	Vigilant <i>et al.</i> 1991
F-16313	16292-16313	CACCCTTAACAGTACATAGTAC	Montiel 2001
R-16320	16339-16320	GTGCTATGTACGGTAAATGG	Este estudio

a: numerado según *Cambridge reference sequence*, Anderson *et al.* 1981
F (*forward*) y R (*reverse*).

El producto amplificado o reamplificado si fuera el caso, debe ser separado de los componentes de la reacción de PCR para ser secuenciado, para ello, se recortó la banda de gel de agarosa (NuSieve GTG® al 3%) utilizando una hoja de bisturí para cada muestra, a partir de la cual se recuperó el DNA. El corte de la banda debe realizarse en menos de 20 segundos, para evitar degradación o

mutaciones espontáneas producidas por la luz ultravioleta. Las bandas recortadas se trasladaron a tubos de 0.5 ml que previamente se les había cortado la base (figura 3.9) y que contenían lana de vidrio. Estos tubos se colocaron dentro de tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a alta velocidad para disolver la agarosa; la solución tampón-DNA recuperada en los tubos de mayor volumen se purificó, en nuestro caso, siguiendo un protocolo basado en fenol-cloroformo.

Se utilizó fenol saturado pH 8 y cloroformo, a razón de una vez el volumen de reactivo por fase acuosa. El producto purificado se concentró mediante *microcon with Ultracel YM-30 membrane* Millipore®, (figura 3.10). La membrana filtrante tiene la capacidad de retener moléculas con un peso molecular superior a 30000 Daltons, a una carga máxima de 0.5 ml de agua desionizada y estéril, con una fuerza centrífuga máxima de 14000 x g, durante 9 minutos, por 3 ciclos de centrifugado.

Finalmente, para recuperar el producto concentrado se invierte el dispositivo que contiene la unidad filtrante y se centrifuga durante 2 minutos; el DNA purificado (entre 12 y 20 µl) se almacenó a -20° C, hasta su utilización para la reacción de secuenciación.

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en el laboratorio de la Unidad de Antropología de la Universidad de Barcelona, mediante PCRs de extensión para ambas cadenas (F y R) por separado, utilizando *BigDye Terminators Cycle Sequencing Kit* v. 3.1 ABI PRISM® y los mismos *primers* que fueron utilizados para las reacciones de PCR de los fragmentos de HVI y que se especifican en la tabla 3.5, en un volumen final de 10 µl: 3 µl de *BigDye* v3.1; 0.5 µl de *primer* (3.2 pmol) y 4 µl de DNA purificado. Para este procedimiento se utilizó un termociclador *GeneAmp PCR System* 9600, y el programa del termociclador consistió en un ciclo inicial de 1 minuto a 96° C, 25 ciclos de 10 segundos a 96° C, 5 segundos a 50° C y 4 minutos de extensión a 60° C, terminando con un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72° C; por último la temperatura del bloque desciende a la temperatura de almacenamiento (4° C).

La eliminación de los terminadores de reacción que no son incorporados al producto de extensión, también llamada purificación del producto de extensión, se

realizó por precipitación del DNA con Etanol/EDTA. Cuando se utiliza el kit comercial *BigDye terminators v3.1*, este método produce señales consistentes y claras. Para ello, se procedió de la siguiente manera:

- 1 Transferir el volumen total (10 μ l) del producto de extensión a tubos de 1.5 ml.
- 2 Agregar 5 μ l de EDTA 125mM y 60 μ l de Etanol al 100%, mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, para precipitar el producto.
- 3 Centrifugar a 13000 rpm, durante 20 minutos.
- 4 Retirar el sobrenadante aspirándolo de una sola intención, utilizando pipetas con puntas estériles.
- 5 Secar hasta eliminar cualquier residuo de alcohol.
- 6 Agregar 60 μ l de etanol al 70%, mezclar y centrifugar, nuevamente, con las mismas condiciones.
- 7 Retirar el sobrenadante aspirando con pipeta y dejar secar muy bien, finalmente se incubó a 37° C, por 15 minutos aproximadamente.

Los fragmentos de mtDNA fueron secuenciados en el Servicio Científico-técnico de la Universidad de Barcelona, Unidad de Genómica, *Parc Científic* de Barcelona, utilizando un equipo *ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer*. Las secuencias fueron visualizadas con el programa Chromas v 1.45 (figura 3.11) y fueron alineadas con el programa BioEdit v 5.0.9.1 (Hall 1999) verificándose manualmente, usando como referencia la secuencia de Cambridge (CRS) (Anderson *et al.* 1981).

Al final del proceso, entre los individuos analizados en la serie pre-contacto se seleccionaron, al azar, dos muestras a las que se realizaron extracciones independientes internas; éste es uno de los procedimientos considerados como criterio de autenticidad en investigaciones con aDNA (Montiel 2001; Pääbo *et al.* 2004), en el que los resultados concordantes demuestran la reproducibilidad del experimento. Desafortunadamente, en las series contacto y post-contacto no se disponía de más de un diente por individuo, razón por la cual sólo se replicaron muestras de individuos del precontacto.



Figura 3.9. Corte de la base del tubo de 0.5 ml.

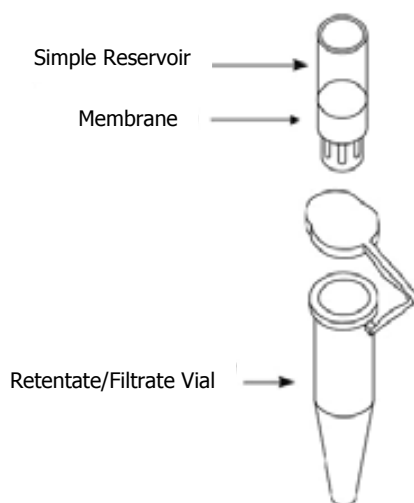


Figura 3.10. Esquema de un microcon YM-30. Se describe cada una de sus partes. Modificado de *Microcon Centrifugal Filter Devices. User Guide*. www.millipore.com

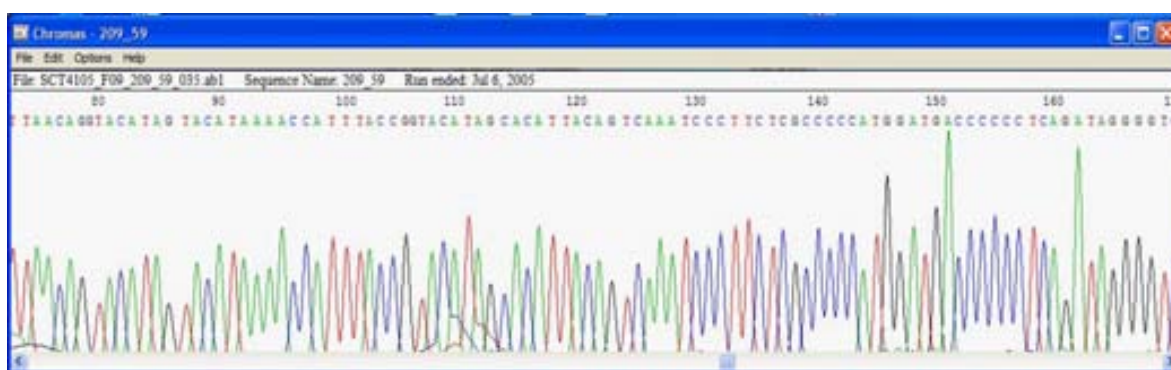


Figura 3.11. Secuencia visualizada en el programa Chromas v 1.45

3.2.2.3. STRs Autosómicos.

Las amplificaciones para el análisis de STRs autosómicos fueron realizadas con el kit comercial *AmpFISTR Profiler Plus*[®] (Applied Biosystems), que co-amplifica las regiones repetitivas de 9 STRs y un segmento del gen de la amelogenina (tabla 3.6). El gen de la amelogenina es utilizado para la identificación del sexo, a partir de una pareja de *primers* que amplifica un fragmento de diferente longitud para cada uno de los cromosomas X e Y.

Un *primer* de cada pareja que amplifica un locus específico es marcado en el extremo 5' con uno de los tres fluorocromos *N-hydroxysuccinimide* (NHS) *ester dye*, 5-FAM, JOE, o NED que son detectados como azul, verde y amarillo respectivamente, cada uno de los cuales emite su máxima fluorescencia a diferentes longitudes de ondas.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 µl, que contenía: 3.8 µl de *PCR reaction mix*, 2 µl de *primer set*, 0.19 µl de *AmpliTaQ Gold*[®] y 4-5 µl de DNA en suspensión. El programa del termociclador, consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de 11 minutos a 94° C, 37 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94° C, 1 minuto de *annealing* a 59° C, y 1 minuto de extensión a 72° C, terminando con un ciclo de extensión final de 45 minutos a 60° C. Por último la temperatura del bloque se mantiene a la temperatura de almacenamiento, en este caso a 25° C.

El análisis de multi-componentes, es el proceso que separa diferentes fluorescencias en componentes espectrales distintos. En este proceso se analizan 4 fluorescencias, las tres utilizadas en el *AmpFISTR Profiler Plus*[®], 5-FAM, JOE Y NED y la cuarta (ROX-rojo) que es proporcionada por el marcador incorporado en el GeneScan[™] 500 ROX, esencial para determinar con precisión el tamaño de los fragmentos de DNA en la electroforesis. Para ello se agrega a 1.5 µl de producto de PCR, 0.5 µl de GeneScan[™] 500 ROX en 12 µl de formamida (formamide HiDi[™]/highly deionized formamide), se desnaturaliza por 1 minuto a 94° C y se enfría rápidamente, colocando las muestras en hielo durante al menos 4 minutos,

con la finalidad de suspender el proceso de desnaturalización. Además, con cada grupo de muestras se incluyó un control que contenía fragmentos de DNA de tamaño conocido y marcado con los mismos fluorocromos, con la finalidad de calibrar los resultados de la electroforesis. El producto final se analizó en un secuenciador automático, ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer*.

Tabla 3.6.
Descripción de los STRs que amplifican con el AmpFISTR Profiler®

Locus	Secuencia repetitiva	Tamaño del fragmento (bp)	Marcador
D3S1358	TCTA (TCTG)1-3(TCTA)n	114–142	5-FAM
vWA	TCTA (TCTG)3-4(TCTA)n	157–197	5-FAM
FGA	(TTTC)3TTTT TTCT (CTTT)nCTCC (TTCC)2	219–267	5-FAM
Amelogenina	X	107	JOE
	Y	113	
D8S1179 ^a	(TCTR)n ^b	128–168	JOE
D21S11	(TCTA)n(TCTG)n[(TCTA)3TA (TCTA)3 TCA (TCTA)2TCCA TA] (TCTA)n	189–243	JOE
D18S51	(AGAA)n	273–341	JOE
D5S818	(AGAT)n	135–171	NED
D13S317	(GATA)n	206–234	NED
D7S820	(GATA)n	258–294	NED

a: En alguna literatura este locus es designado como D6S502.

b: R puede representar una A o una G.

Tomado de AmpFSTR® Profiler Plus™ PCR Amplification Kit *User's Manual*.

3.3. Tratamiento Estadísticos.

3.3.1. Análisis Intrapoblacional.

Para el análisis de frecuencias de haplogrupos, en las tres series antiguas, se utilizó el programa Arlequín 2000 (Schneider *et al.* 2000); y el análisis de las secuencias de la región de control (HVI), se basó en un fragmento de 162 pb, situados entre las posiciones 16209 y 16370 (de acuerdo con la secuencia de Anderson *et al.* 1981). Según Gilbert *et al.* 2003a, la llamada región media del

HVI (entre las posiciones 16209-16356) contiene la mayoría de las variables filogenéticas. Con estos datos se calcularon:

- 1 Los Índices de Diversidad Genética (H), número de sitios polimórficos, haplotipos compartidos y haplotipos únicos, utilizando el programa Arlequín 2000 (Schneider *et al.* 2000).
- 2 La distancia genética basada en el modelo de Tamura & Nei (1993), utilizando la corrección de distribución gamma con parámetro $\alpha = 0.47$, estimado por Wakeley (1993) para la región HVI del mtDNA, se analizó con el programa MEGA v3.1 (Kumar *et al.* 2004).
- 3 La construcción del árbol filogenético sin raíz por el método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei 1987) y el cálculo de los valores de *bootstrap* se realizaron con el programa MEGA v3.1 (Kumar *et al.* 2004).

3.3.2. Análisis Interpoblacional.

Las frecuencias de haplogrupos de las tres series analizadas se compararon con datos similares procedentes de 31 poblaciones antiguas y actuales de América y Asia (tabla 3.7 y 3.8). A cada población se le asignó un código, que en los casos de dos o más series en una misma área geográfica, se le agregó un número correlativo ascendente, seguido de .1 si corresponde a series antiguas y .2 si se trata de una población contemporánea. Con estos datos se realizó:

- 1 La prueba exacta de Diferenciación Poblacional, la Distancia Genética de Reynolds entre parejas de poblaciones (Reynolds *et al.* 1983) y los Índices de Diversidad Genética (Nei 1987), utilizando el programa Arlequín 2000 (Schneider *et al.* 2000).
- 2 El árbol sin raíz entre poblaciones antiguas se construyó utilizando el método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei 1987) y se visualizó con el programa *TreeView* (Win32) 1.6.6 (Page 1996).
- 3 El Análisis de Componentes Principales y Escalamiento multidimensional, utilizando el paquete estadístico SPSS v13.0.

Para el análisis de secuencias de la región HVI, entre las 3 series antiguas y 20 poblaciones de comparación (tablas 3.7 y 3.8) se utilizó el mismo fragmento de 162 pb, entre las posiciones 16209 y 16370. Para ello se construyó una base de datos de secuencias mitocondriales utilizando, en algunos casos, la base de datos: *Compilation of human mtDNA control region sequences* (Handt *et al.* 1998, disponible en: www.hvrbase.org); sin embargo, para la mayoría de las poblaciones las secuencias fueron construidas individualmente a partir de los datos obtenidos desde los artículos publicados. A partir de la base de datos con 1263 secuencias se calcularon:

- 4 Distancia Genética de Reynolds entre parejas de poblaciones (Reynolds *et al.* 1983), Número de haplotipos diferentes (K), Número de sitios polimórficos (S), Número de sitios con transiciones y con transversiones, Número medio de diferencias por parejas (π), Diversidad genética ($\hat{H}$) y Diversidad nucleotídica ($\theta\pi$) con sus respectivas desviaciones estándares, utilizando el programa Arlequín 2000 (Schneider *et al.* 2000).
- 5 Se construyeron redes filogenéticas utilizando el algoritmo *Median Joining Networks* del programa Network v4.1.1.2, disponible en: <http://www.fluxus-technology.com> (Bandelt *et al.* 1999). Se agruparon los haplotipos (cada secuencia diferente representa un haplotipo) de cada uno de los haplogrupos principales fundadores americanos A, B, C y D, para facilitar su interpretación, debido a los altos niveles de reticulaciones que fueron observados sobre todo en relación a los haplotipos del haplogrupo A. Los pesos para cada posición fueron otorgados sobre la base de la relativa frecuencia de cada una en el conjunto de las muestras analizadas, según Malhi *et al.* (2002).

Para la construcción de las redes se utilizaron los haplotipos de las poblaciones contemporáneas con frecuencia mayor o igual a 2, asumiendo el supuesto que los haplotipos más frecuentes suelen ser los más antiguos (Donnelly & Tavaré 1986; Crandall & Templeton 1993), todos los haplotipos de las series antiguas de referencia y todos los haplotipos recuperados en las 3 series antiguas

analizadas. La serie antigua del Noreste de Estados Unidos (Malhi *et al.* 2004) no se incluyó ya que sólo tiene secuencia de 147 pb de las 162 analizadas.

Tabla 3.7.
Descripción de las poblaciones antiguas utilizadas para los análisis estadísticos.

País	Población	Código ^a	<i>n</i> ^b	Antigüedad años BP ^c	Métodos de Análisis	Referencias
ASIA						
*Mongolia	Xiongnus Valle Egiyín Gol	MG.1	41	2000	Secuencia-HVI	Keyser-Traqui <i>et al.</i> 2003
AMERICA						
<u>Esquimo-aleutiano</u>						
Alaska	Aleutianos Islas Aleutianas	AL.1	17	2000-4000	RFLP/delección	Hayes 1998, O'Rourke <i>et al.</i> 2000
<u>Amerindio</u>						
Estados Unidos	Northern Pauite Western Great Basin	US1.1	41	300-6000	RFLP/delección	Kaestle 1997, citado por O'Rourke <i>et al.</i> 2000
*Estados Unidos	Wishram Noroeste de E.U.	US2.1	60	200-1500	RFLP/delección Secuencia-HVI	Malhi <i>et al.</i> 2004
*Estados Unidos	Oneota E. de Illinois	US3.1	52	700	RFLP/delección Secuencia-HVI	Stone & Stoneking 1998
Estados Unidos	Fremont Suroeste de E.U.	US4.1	34	500-1500	RFLP/delección	Parr <i>et al.</i> 1996, O'Rourke <i>et al.</i> 2000
Estados Unidos	Anasazis Suroeste de E.U.	US5.1	22	1010-2010	RFLP/delección	Carlyle <i>et al.</i> 2000 O'Rourke <i>et al.</i> 2000
México	Aztecas Tlatelolco	MX1.1	23	700	RFLP/delección	Kemp <i>et al.</i> 2005
México	Maya E. de Xcaret	MX2.1	25	1400-700	RFLP/delección	González-Oliver <i>et al.</i> 2001
*Cuba	Siboneyes	CB.1	15	1990	RFLP/delección Secuencia-HVI	Lalueza-Fox <i>et al.</i> 2003
*República Dominicana	Tainos La Caleta	DR.1	24	1400-400	RFLP/delección Secuencia-HVI	Lalueza-Fox <i>et al.</i> 2001
*Brasil	Indígenas del Amazona	BR.1	18	500-4000	RFLP/delección Secuencia-HVI	Ribeiro-dos-Santos <i>et al.</i> 1996
*Chile	Varios grupos de los Valles desérticos del N. de Chile	CH.1	61	500-3900	RFLP/delección Secuencia-HVI	Moraga <i>et al.</i> 2005
*Argentina	Fueguinos & Patagones	AR.1	60	100-200	RFLP/delección Secuencia-HVI	Lalueza <i>et al.</i> 1997, García-Bour <i>et al.</i> 2004

a: .1 → series antiguas

b: Tamaño de la muestra.

b: BP (antes del presente).

Tabla 3.8.
Descripción de las poblaciones contemporáneas utilizadas para los análisis estadísticos.

País	Población	Código ^a	n ^b	Métodos de Análisis	Referencia
ASIA					
*Sur de Siberia	Tuvinians & Buryats Altai Mountans	SS.2	71	RFLP/delección Secuencia-HVI	Derenko <i>et al.</i> 2000
AMERICA					
<u>Esquimo-aleutiano</u>					
*Alaska	Aleutianos Islas Aleutianas	AL.2	163	RFLP/delección Secuencia-HVI	Rubicz <i>et al.</i> 2003
<u>Na-Dene</u>					
*Canadá	Na-Denes Haida	ND.2	40	RFLP/delección Secuencia-HVI	Ward <i>et al.</i> 1993
<u>Amerindio</u>					
*Canadá	Tribus aborígenes de Nuu- Chah-Nult & Bella Coola	CA.2	102	RFLP/delección Secuencia-HVI	Ward <i>et al.</i> 1991, 1993
*México	Mestizos de Centro-Norte E. de Chihuahua	MX1.2	199	RFLP/delección Secuencia-HVI	Green <i>et al.</i> 2000
México	Nazahuas E. México	Mx2.2	73	RFLP/delección	Moreno 2005 González-Martín A. (CP)
México	Huastecos E. de Hidalgo	MX3.2	97	RFLP/delección	Hernández 2005 González-Martín A. (CP)
México	Pachuca E. de Hidalgo	MX4.2	99	RFLP/delección	Vergara 2005 González-Martín A. (CP)
México	Maya Península de Yucatán	MX5.2	27	RFLP/delección	Schurr <i>et al.</i> 1990, Torroni <i>et al.</i> 1992
México	Mixteco-Zapotecas E. de Oaxaca	MX6.2	44	RFLP/delección	Torroni <i>et al.</i> 1994a
*Costa Rica	Huetar	CR.2	30	RFLP/delección Secuencia-HVI	Santos M, <i>et al.</i> 1994
*Panamá	Emberá-Wounnan	PN.2	75	RFLP/delección Secuencia-HVI	Kolman & Birmingham 1997
*Venezuela	Guahibos	VZ.2	59	RFLP/delección Secuencia-HVI	Vona <i>et al.</i> 2005
*Brasil	Yanomamös	BR.2	155	RFLP/delección Secuencia-HVI	Williams <i>et al.</i> 2002
*Ecuador	Cayapas	EC.2	94	RFLP/delección Secuencia-HVI	Rickards <i>et al.</i> 1999
*Perú	Ancash	PR.2	33	RFLP/delección Secuencia-HVI	Lewis <i>et al.</i> 2005
*Chile	Mapuches, Pehuenches & Yaghan	CH.2	237	RFLP/delección Secuencia-HVI	Moraga <i>et al.</i> 2000

a: .2 → poblaciones contemporáneas.

b: Tamaño de la muestra.

*: Poblaciones de comparación con haplogrupos y con haplotipos.

CP: Comunicación Personal.



4. Resultados

4.1. Consideraciones sobre la metodología.

Se analizaron 111 dientes de individuos provenientes de 5 colecciones arqueológicas de México, descritas en la sección 3.1 de Materiales y Métodos, distribuidos de la siguiente manera:

- 7 dientes de individuos provenientes del yacimiento de Barrancos Caídos del que se desconoce su datación y por lo cual no fueron incluidos en los estudios poblacionales. Estas muestras fueron utilizadas para la optimización de la metodología.
- 104 dientes de 102 individuos de los cuatro yacimientos que fueron sometidos a análisis poblacionales: Tlatelolco, Los Olmos, Santa María Texcala y Hospital San Juan de Dios. Todos fueron analizados genéticamente utilizando los marcadores del mtDNA.

En total se realizaron 25 procesos de extracción siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos (sección 3.2); cada proceso incluía de 4 a 5 dientes y un blanco de extracción (KE) cada uno. En todos los procedimientos de amplificación mediante PCR, tanto para la región codificante como para la región de control HVI del DNA mitocondrial y en las reamplificaciones que fueron necesarias, se incluyeron los blancos de extracción (KE); es de resaltar que en ninguno de los casos se detectó la presencia de DNA contaminante.

En relación a la eficiencia de las amplificaciones, en general se observaron bandas bien definidas; no obstante, en 12 extractos de distintos procesos o grupos de extracción no se lograron resultados positivos para más de un sitio de restricción, luego de realizar por lo menos tres intentos de amplificaciones con distintos grupos de PCRs, por lo cual fueron excluidos del análisis: 6 del yacimiento de Los Olmos del período de contacto (*Nº 66 Inv. 18 M. 18, Nº 85 Inv. 37 M. 37, Nº 06 Cap. 10B-240, Nº 07 Cap. 9, Nº 18 Cap. 14B y Nº 15 Caja 21*), 5 del yacimiento de Santa María Texcala (*SMT Ent. 40, SMT Ent. 24, SMT Ent. 6, SMT Ent. 61 y SMT Ent. 39*) y 1 del yacimiento del Hospital San Juan de Dios (*HSD Osario 15*) estos últimos

pertenecientes al período de post-contacto. En ninguno de los casos se puede afirmar que la presencia de inhibidores sea la responsable de falsos negativos, ya que, o bien la banda de amplificación en el análisis de electroforesis era demasiado tenue como para obtener resultados definitivos con la restricción, o sólo se observaban los dímeros de *primers*, lo que indicaba que la polimerasa estaba funcionando y supone, por tanto, ausencia de sustancias inhibidoras de la reacción de PCR.

Por otra parte, 2 individuos de la serie contacto (*O1 Cap. Ent. 14-B* y *O17 EA4*) pudieron ser caracterizados a pesar de no dar resultados positivos para uno de los segmentos de la región codificante, que en estos casos no contenía los sitios polimórficos específicos del haplogrupo al cual pertenecía el individuo analizado, razón por la cual fueron tomados como válidos. Sin embargo, estamos conscientes de que no se pudo analizar las posibles contradicciones entre los sitios que definen los haplogrupos; lo cual es fundamental en aDNA.

Se lograron amplificaciones positivas, según el análisis de electroforesis, para 1 ó 2 segmentos de la región HVI de 84 extractos (81 pertenecen a las series de estudios y 3 al grupo control), en algunos casos, aproximadamente el 20%, fue necesario someter el producto de PCR a reamplificación. Posteriormente, los productos amplificados fueron purificados y secuenciados obteniéndose secuencias legibles de entre 190 y 400 pb: 4 secuencias de 400 pb, 8 secuencias de 400 pb construidas con 2 segmentos solapantes de 257 y 190 pb, 62 secuencias de 190 pb y 10 secuencias construidas con dos segmentos solapantes de 111 y 87 pb. En el tamaño del fragmento secuenciado no se incluyen los pares de bases que corresponden a cada *primer*, los cuales pueden ser detallados en la tabla 4.1.

Tabla 4.1.
Fragmentos secuenciados.

Nº de secuencias	Fragmentos	Tamaño del fragmento ^a	Primers	
4	1	400 pb	F15996	R16401
8	2	257 pb	F15996	R16254
		190 pb	F16209	R16401
62	1	190 pb	F16209	R16401
10	2	111 pb	F16209	R16320
		87 pb	F16313	R16401

El tamaño del fragmento no incluye los *primers*.
F (*forward*) y R (*reverse*).

El excelente grado de preservación de las muestras debido, posiblemente, a la antigüedad de los yacimientos -de entre 300 y 600 años BP-, y el medio ambiente al cual posiblemente estuvieron expuestas, parecen haber favorecido, el éxito en la recuperación del DNA. Asimismo, el tejido elegido y el método de obtención del material genético han sido los más ventajosos, dado que las características morfológicas e histológicas del diente se convierten, en gran medida, en una barrera natural contra los cambios a los que se expone el enterramiento, lo que supone una mejor conservación del DNA.

Por otra parte, las condiciones morfológicas dentarias también disminuyen la posibilidad de contaminación por manipulación, aún más en nuestro caso que sólo utilizamos la dentina de las paredes de los conductos radiculares y no la totalidad del diente como lo describen otros autores (Drancourt *et al.* 1998, Gilbert *et al.* 2003a), lo que puede evitar considerablemente amplificaciones de DNA contaminante.

En resumen, las características inherentes a la muestra que hemos señalado, junto a la utilización de protocolos idóneos, las rigurosas medidas de esterilización, la correlación entre los métodos de análisis, entre otros factores, sustentan la fiabilidad de los resultados que se presentan a continuación.

4.2. Análisis intrapoblacional.

Las muestras de la serie Hospital San Juan de Dios y de Santa María Texcala fueron unidas en un solo grupo con fines estadísticos, ya que ambas pertenecen al mismo período histórico (época Colonial) y sólo se han podido registrar resultados de 9 individuos de la serie Santa María Texcala.

Para verificar la relación de ambas series se aplicó la prueba exacta de diferenciación poblacional, cuyos valores indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas (0.78887 ± 0.0012 , $p > 0.05$), asimismo se observa una distancia genética nula entre ambas series. Por otra parte, como lo indica O'Rourke *et al.* (1996), las muestras de aDNA no son poblaciones en el sentido tradicional del término, en muchos casos en un mismo grupo se incluyen

muestras de diferentes áreas geográficas y con distintas dataciones. Sobre la base de estas reflexiones y de la poca información que existe sobre DNA antiguo, hemos consideramos oportuno incluirlas como un solo grupo que representa a la sociedad colonial mexicana, sin desestimar cualquier individualidad que se pueda observar en alguna de las dos series.

4.2.1. Región codificante (RFLPs).

Del total de 102 individuos estudiados, 90 muestras (30 para cada serie precontacto, contacto y post-contacto) han sido caracterizadas a través del análisis de los sitios polimórficos estables en la región codificante del mtDNA, incluyendo los polimorfismos de restricción (RFLPs) para los haplogrupos A, C, D y la delección polimórfica en la región intergénica COII/tRNA^{lys} que define el haplogrupo B, lo que representa un 88.2% de efectividad. De éstos, 87 individuos pertenecen a uno de los cuatro principales linajes descritos para aborígenes americanos y 3 individuos de la serie post-contacto (Hospital San Juan de Dios) resultaron negativos para estos marcadores, inclusive para el quinto y menos frecuente linaje americano, el haplogrupo X. En las tablas 4.2, 4.3 y 4.4 se presentan los resultados para cada una de las series.

Para todas las muestras se analizaron, como mínimo, los 4 haplogrupos mitocondriales fundadores americanos, no encontrando ninguna discordancia entre los resultados obtenidos.

Tablas 4.2. y 4.3.

Resultados del análisis de la región codificante del mtDNA en la serie Precontacto y Contacto.

Muestras	Delección 9pb	Hae III +663	Hinc II -13259	Alu I +13263	Alu I -5176	Haplogrupo
Ent. 1	D	-	+	-	+	B
Ent. 1 (C. 23)	D	-	+	-	+	B
Ent. 1 I.2 (C. 62)	D	-	+	-	+	B
Ent. 1 (C. 68)	D	-	+	-	+	B
Ent. 2	ND	+	+	-	+	A
Ent. 3	ND	-	-	+	+	C
Ent. 4 (C. 46)	D	-	+	-	+	B
Ent. 5	ND	-	+	-	-	D
Ent. 5 (C.47)	ND	+	+	-	+	A
Ent. 6	ND	-	-	+	+	C
Ent. 6 Bis. I1	D	-	+	-	+	B
Ent. 6 Bis. I2	D	-	+	-	+	B
Ent. 6 Bis. I3	D	-	+	-	+	B
Ent. 6 (C. 48)	ND	+	+	-	+	A
Ent. 11	ND	+	+	-	+	A
Ent. 11 (C. 52)	ND	+	+	-	+	A
Ent. 15-I2	ND	+	+	-	+	A
Ent. 15 (C. 32)	ND	-	+	-	-	D
Ent. 17 (C.34)	D	-	+	-	+	B
Ent. 18 (C.33)	ND	+	+	-	+	A
Ent. 21 (C. 39)	ND	-	+	-	-	D
Ent. 20 (C. 36)	ND	+	+	-	+	A
Ent. 25 (C. 4)	ND	+	+	-	+	A
Ent. 25 (C.43)	ND	+	+	-	+	A
Ent. 27 (C.3)	ND	+	+	-	+	A
Cr.7 (C8/n bis)	D	-	+	-	+	B
Cr. Tzompantli (C.78)	ND	+	+	-	+	A
E. varios (C. 7)	ND	+	+	-	+	A
E. varios (C 70)	ND	+	+	-	+	A
E. varios (C. 75)	D	-	+	-	+	B

Muestras	Delección 9pb	Hae III +663	Hinc II -13259	Alu I +13263	Alu I -5176	Haplogrupo
O1 Cap. Ent. 14-B	ND	-	-	+	X	<u>C</u>
O3	D	-	+	-	+	B
O4 W46.5 S3	ND	-	-	+	+	C
O5 E. 34W46 S10	ND	-	+	-	-	D
O8	ND	+	+	-	+	A
O9	ND	+	+	-	+	A
O11 Cap. Fosa 4	ND	+	+	-	+	A
O11 Cap. 41	ND	+	+	-	+	A
O12	ND	+	+	-	+	A
O12 pozo 4	ND	+	+	-	+	A
O14	ND	+	+	-	+	A
O16 EA 12	ND	-	-	+	+	C
O17	ND	+	+	-	X	<u>A</u>
O17 EA4	ND	+	+	-	+	A
O19 EA 5	ND	+	+	-	+	A
O21	ND	+	+	-	+	A
O22	ND	+	+	-	+	A
O23 W46 EC1	ND	+	+	-	+	A
O24	ND	+	+	-	+	A
O36	ND	-	-	+	+	C
Nº02 Ent. 17	ND	+	+	-	+	A
Nº09 Ent. 40	ND	+	+	-	+	A
Nº54 Inv 16 M.16	ND	+	+	-	+	A
Nº58 Inv 10 M. 10	ND	-	-	+	+	C
Nº92 Inv 44 M. 44	ND	+	+	-	+	A
Ent 4	ND	+	+	-	+	A
Ent 12	ND	+	+	-	+	A
Ent 13-I2	ND	+	+	-	+	A
Ent 15-I1	D	-	+	-	+	B
Ent 17	ND	+	+	-	+	A

(+) Presencia de corte. (-) ausencia de corte. (X) sin resultado. (D) delección de 9 pb. (ND) No delección de 9 pb. Subrayado los haplogrupos inferidos con la ausencia de amplificación de uno de los fragmentos.

Tablas 4.4.

Resultados del análisis de la región codificante del mtDNA en la serie Post-contacto.

Muestras	Delección 9pb	Hae III +663	Hinc II -13259	Alu I +13263	Alu I -5176	Acc I +14465	Haplogrupo
SJD Ent. 3	ND	–	–	+	+		C
SJD Ent. 13	D	–	+	–	+		B
SJD Ent. 14-A	ND	+	+	–	+		A
SJD Ent. 14	ND	–	+	–	–		D
SJD Ent. 16 16-A	ND	+	+	–	+		A
SJD Ent. 18	ND	+	+	–	+		A
SJD Ent.21	ND	–	+	–	+	–	OTRO
SJD Ent. 23	ND	+	+	–	+		A
SJD Ent. 23 bis 1	D	–	+	–	+		B
SJD Ent. 46	ND	+	+	–	+		A
SJD Osario 3	ND	–	+	–	+	–	OTRO
SJD Osario 5	ND	+	+	–	+		A
SJD Osario 8	ND	–	–	+	+		C
SJD Osario 10	D	–	+	–	+		B
SJD Osario 11	D	–	+	–	+		B
SJD Osario 13	ND	–	+	–	+	–	OTRO
SJD Osario 17	ND	+	+	–	+		A
SJD Osario 19	ND	+	+	–	+		A
SJD Osario 20	D	–	+	–	+		B
SJD Osario 22	ND	+	+	–	+		A
SJD Osario 24	ND	+	+	–	+		A
SMT Ent. 2	ND	+	+	–	+		A
SMT Ent. 7	ND	+	+	–	+		A
SMT Ent. 14	ND	+	+	–	+		A
SMT Ent. 23	D	–	+	–	+		B
SMT Ent. 38	ND	–	+	–	–		D
SMT Ent. 62	ND	–	–	+	+		C
SMT Ent. 64	ND	–	+	–	–		D
SMT Ent. 70	ND	+	+	–	+		A
SMT Osario CR9V	D	–	+	–	+		B

(+) Presencia de corte. (–) ausencia de corte. (D) delección de 9 pb. (ND) No delección de 9 pb.

Entre los individuos analizados en la serie precontacto, se seleccionaron de forma aleatoria, dos dientes de diferentes individuos a los que se realizaron extracciones independientes en el mismo laboratorio, obteniéndose resultados concordantes entre los dos extractos tanto en el análisis de RFLPs (tabla 4.5), como en las secuencias del HVI mtDNA (tabla 4.6). Como hemos dicho, este procedimiento es considerado como un criterio de autenticidad en aDNA (Montiel *et al.* 2001, Pääbo *et al.* 2004); ya que resultados concordantes demuestran la reproducibilidad del estudio.

Tablas 4.5.

Resultados del análisis de la región codificante del mtDNA en extractos independientes de la serie Precontacto.

Muestras	Delección 9pb	HaeIII +663	HincII -13259	AluI +13263	AluI -5176	Haplogrupo
Ent. 21 (C.39)	ND	–	+	–	–	D
E. varios (C.75)	D	–	+	–	+	B

(+) Presencia de corte. (–) ausencia de corte. (D) delección de 9 pb. (ND) No delección de 9 pb.

Las 3 muestras post-contacto, de la serie Hospital San Juan de Dios, que resultaron negativas para los 4 principales linajes americanos, fueron sometidas además a restricción para la posición +14465 *Acc* I, que corresponde al haplogrupo X, siendo también negativas para este haplogrupo. Sobre la base de los resultados obtenidos, se analizó la posición polimórfica 10871 *Mn*/I, que nos permitió evaluar la posibilidad de que estos tres individuos pertenezcan a algún linaje mitocondrial europeo y en el caso de no presentar el sitio de restricción, pudieran pertenecer a cualquiera de los haplogrupos L1, L2, L3 o M.

Los resultados demuestran que ninguna de las tres muestras sometidas a restricción para la posición 10871 *Mn*/I fueron positivas, no así el control europeo, un individuo de la época de bronce perteneciente al haplogrupo H que fue incluido sólo para esta restricción (figura 4.1). Por lo tanto, si estos individuos no segregaron para ninguno de los 5 haplogrupos principales americanos, ni tampoco pudieran tener un linaje mitocondrial europeo, lo más probable es que se trate de individuos cuyo linaje maternal pertenezca a alguno de los haplogrupos africanos. De hecho, en una de las muestra, el individuo *SJD Osario 13*, se logró la secuencia de un fragmento de 190 pb, que contiene cambios nucleotídicos que corresponde al subhaplogrupo africano L2a, (ver sección 4.2.2). Lamentablemente, no se pudo continuar con la caracterización del mtDNA de estos tres individuos debido a que los extractos se agotaron y no contamos con más muestras para realizar nuevas extracciones.

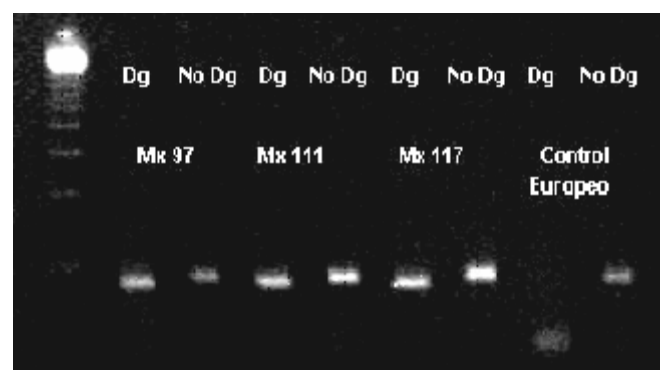


Figura 4.1. Gel de NuSieve al 3% para comprobar los fragmentos de restricción para la posición polimórfica 10871 *Mn*/I.

Dg: Producto de PCR digerido. No Dg: el mismo producto de PCR que no ha sido sometido a digestión enzimática. (Mx 97: SJD Ent.21, Mx 111: SJD Osario 3, Mx 117: SJD Osario 13, muestras analizadas. Control europeo (haplogrupo H).

4.2.1.1. Frecuencias de haplogrupos.

El análisis de los polimorfismos de restricción revela que el haplogrupo A es el linaje mitocondrial dominante entre las tres series estudiadas. En el caso de la serie precontacto, que presenta la mayor frecuencia de los 4 principales linajes maternos americanos, el haplogrupo A alcanza un 0.467, en tanto que el B presenta 0.367, siendo la mayor frecuencia de este haplogrupo en las tres series examinadas. Finalmente los haplogrupos C y D están representados con muy baja frecuencia 0.066 y 0.10 respectivamente.

En la serie contacto, el haplogrupo A también presenta la mayor frecuencia y en este caso es la mayor en los tres grupos analizados (0.70); asimismo, el haplogrupo C exhibe la mayor frecuencia de las tres series, donde se caracterizaron el 0.167 de los individuos analizados. Contrariamente, el haplogrupo B exhibe la más baja frecuencia (0.10). En esta serie, la distribución de los haplogrupos B y C difiere de lo observado en precontacto y post-contacto e incluso en un contexto general si lo confrontamos con datos obtenidos desde la literatura. Finalmente, el haplogrupo D, tiene la menor frecuencia de todos los haplogrupos en las tres series del Valle Central analizadas, con un 0.033.

En relación a la serie post-contacto, tres de los individuos del yacimiento Hospital San Juan de Dios (*SJD Ent.21*, *SJD Osario 3* y *SJD Osario 13*) no pertenecen a ninguno de los 5 linajes fundadores americanos, lo que representa el 0.10, y para efectos de este análisis fueron designados como "otros". Finalmente, la distribución de los haplogrupos principales del mtDNA analizados, es similar a la encontrada en la serie precontacto, A (0.467), B (0.233), C y D (0.10 cada uno). Estos datos están representados en la figura 4.2.

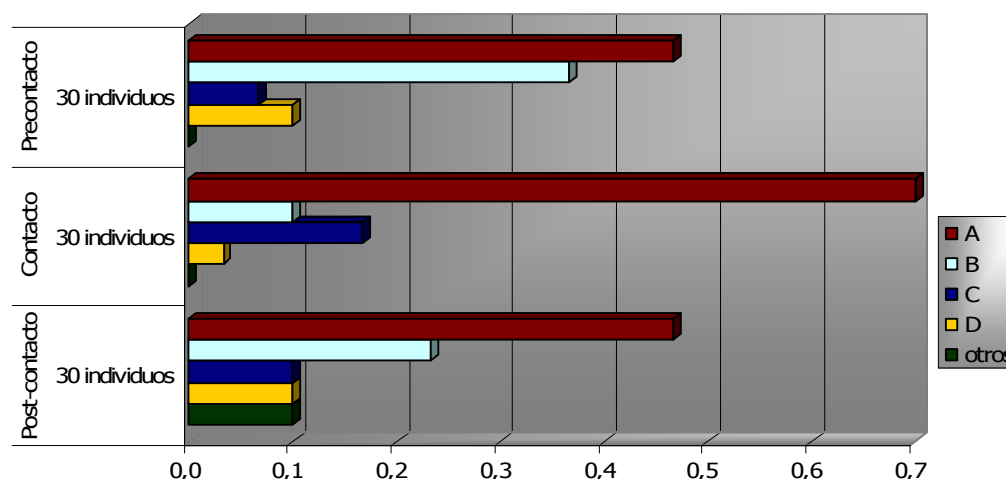


Figura 4.2. Frecuencias relativas de haplogrupos para las series precontacto, contacto y post-contacto.

4.2.2. Región de control (HVI-mtDNA).

Desafortunadamente y como ya hemos señalado en la Introducción (sección 1.3.2), las investigaciones con aDNA presentan dificultades inherentes al daño molecular que algunas veces impide obtener suficiente DNA amplificable, tal es el caso de 11 individuos (3 de precontacto y 4 de cada serie contacto y post-contacto), en los cuales no se consiguió la secuenciación de los fragmentos de la región HVI. No obstante, se lograron obtener 70 secuencias legibles de 190 pb y 9 de 400 pb con un rendimiento del 87.7%.

En las tablas 4.6, 4.7 y 4.8 se presentan los resultados de la secuenciación de la región de control HVI para cada una de las series analizadas (27 precontacto, 26 contacto y 26 post-contacto). Existe una total correspondencia entre RFLPs/delección y las secuencias del HVI, observándose que en cada grupo, de las 25 extracciones realizadas, se han obtenido resultados distintos en cada muestra tanto en el análisis de restricción enzimática (diferentes frecuencias) como en la secuenciación (diferentes secuencias), lo que disminuye la probabilidad de que los resultados provengan de eventos de contaminación entre las muestras o de una contaminación con DNA exógeno. La correspondencia entre los resultados de estas dos metodologías es reconocida como un criterio de autenticidad cuando se analiza el mtDNA proveniente de restos antiguos.

Tabla 4.6.
Resultados de la secuencias del HVI mtDNA en la serie Precontacto.

Códigos	Muestras	Tamaño del fragmento	16000	16092	16111	16189	16209	16217	16223	16240	16241	16249	16257	16261	16264	16274	16270	16278	16289	16290	16298	16311	16319	16325	16327	16344	16356	16362	16400	Haplo grupo.
CRS ^a			G	T	C	T	T	T	C	A	A	T	C	C	C	G	C	C	A	C	T	T	G	T	C	C	T	T	C	
Pr01A	Ent. 2	400 bp	<	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr02A	Ent. 5 (C. 47)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr03A	Ent. 6 (C. 48)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr04A	Ent. 11 (C. 52)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr05A	Ent. 15-I2	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr06A	Ent. 18 (C. 33)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	C	C	>	A
Pr07A	Ent. 25 (C. 4)	400 bp	<	C	T	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	>	A
Pr08A	Ent. 27 (C. 3)	400 bp	<	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr09A	Ent. 11	190 bp					<	.	T	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr10A	E. varios (C. 7)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr11A	Ent. 25 (C. 43)	190 bp					<	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	C	A	.	.	T	.	C	>	A
Pr12A	Cr. Tzompant (C.78)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr13A	Ent. 20 (C. 36)	190 bp					<	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr14A	E. varios (C. 70)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	A	.	.	.	.	C	>	A
Pr15B	Ent. 1	190 bp					<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Pr16B	Ent. 1 (caja 23)	400 bp	<	.	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Pr17B	Ent. 6 Bis. I3	190 bp					<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Pr18B	Ent. 6 Bis. I2	190 bp					<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Pr19B	Cr. 7 (C8/n bis)	190 bp					<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Pr20B	E. varios (C. 75)*	190 bp					<	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	>	B
Pr21B	Ent. 6 Bis. I1	190 bp					<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Pr22B	Ent. 4 (C. 46)	190 bp					<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Pr23C	Ent. 6	400 bp	<	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	T	.	.	.	>	C
Pr24C	Ent. 3	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	T	.	.	.	>	C
Pr25D	Ent. 15 (C. 32)	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	>	D
Pr26D	Ent. 21 (C. 39)*	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	>	D
Pr27D	Ent. 5	190 bp					<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	>	D

a: En relación a *Cambridge reference sequence* (Anderson *et al.* 1981). C: Citosina. T: Timina. A: Adenina. G: Guanina.

<: Inicio del fragmento. >: Final del fragmento.

*: Secuencias idénticas en los dos extractos independientes.

Tabla 4.7.
Resultados de la secuencias del HVI mtDNA en la serie Contacto.

Códigos	Muestras	Tamaño del fragmento	16000	16092	16111	16209	16217	16223	16234	16257	16264	16267	16271	16274	16277	16278	16288	16290	16298	16311	16319	16325	16326	16327	16328	16344	16362	16400	Haplo grupo.
CRS ^a			G	T	C	T	T	C	C	C	C	C	T	G	A	C	T	C	T	T	G	T	A	C	C	C	T	C	
Cn01A	O11 Cap. Fosa 4	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	A	.	G	.	.	.	C	>	A
Cn02A	O17 EA4	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	G	.	.	.	C	>	A
Cn03A	O21	400 bp	<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn04A	O24	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	G	.	.	.	C	>	A
Cn05A	Nº 54 Inv 16 M.16	190 bp				<	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn06A	Nº 92 Inv 44 M. 44	190 bp				<	.	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	C	A	.	.	.	.	T	C	>	A
Cn07A	Nº 09 Ent. 40	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn08A	Nº 02 Ent. 17	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	>	A
Cn09A	O14	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn10A	O19 EA 5	190 bp				<	.	T	T	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn11A	O22	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn12A	O9	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn13A	Ent. 13-I2	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn14A	Ent. 17	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn15A	Ent. 4	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn16A	O12 pozo 4	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn17A	O11 Cap. 41	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	T	.	.	A	.	G	.	T	.	C	>	A
Cn18A	O17 EA4	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn19A	O23 W46 EC1	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	C	>	A
Cn20B	O3	190 bp				<	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	>	B
Cn21B	Ent. 15-I1	190 bp				<	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	B
Cn22C	Nº 58 Inv 10 M. 10	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	C	>	C
Cn23C	O16 EA 12	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	C	.	T	.	.	.	>	C
Cn24C	O36	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	.	.	.	>	C
Cn25C	O4 W46.5 S3	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	T	.	.	.	>	C
Cn26D	O5 E. 34W46 S10	400 bp	<	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	>	D

a: En relación a *Cambridge reference sequence* (Anderson *et al.* 1981). C: Citosina. T: Timina. A: Adenina. G: Guanina.
<: Inicio del fragmento. >: Final del fragmento.

Tabla 4.8.
Resultados de la secuencias del HVI mtDNA en la serie Post-contacto.

Códigos	Muestras	Tamaño del fragmento	16000	16051	16189	16209	16217	16223	16265	16278	16290	16292	16294	16298	16309	16311	16319	16325	16327	16335	16354	16356	16360	16362	16400	Haplo grupo.
	CRS ^a		G	A	T	T	T	C	A	C	C	C	C	T	A	T	G	T	C	A	C	T	C	T	C	
Pt01A	SMT Ent. 7	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt02A	SMT Ent. 2	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt03A	SJD Osario 5	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt04A	SJD Osario 22	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	C	>	<u>A</u>
Pt05A	SJD Osario 17	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt06A	SJD Ent. 16 16A	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	C	>	<u>A</u>
Pt07A	SMT Ent. 70	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt08A	SMT Ent. 14	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt09A	SJD Ent. 46	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt10A	SJD Osario 24	190 bp				<	.	T	G	.	T	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt11A	SJD Ent. 23	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.	>	<u>A</u>
Pt12A	SJD Ent. 18	190 bp				<	.	T	.	T	T	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt13A	SJD Osario 19	190 bp				<	.	T	.	.	T	T	.	.	.	C	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt14A	SJD Ent. 14-A	190 bp				<	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>A</u>
Pt15B	SJD Ent. 13	400 bp	<	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	<u>B</u>
Pt16B	SJD Osario 11	190 bp				<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	<u>B</u>
Pt17B	SJD Ent. 23 Bis	190 bp				<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	<u>B</u>
Pt18B	SJD Osario 20	190 bp				<	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	<u>B</u>
Pt19B	SJD Osario 10	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	<u>B</u>
Pt20B	SMT Ent. 23	190 bp				<	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	>	<u>B</u>
Pt21C	SJD Osario 8	400 bp	<	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	>	<u>C</u>
Pt22C	SJD Ent. 3	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	>	<u>C</u>
Pt23D	SMT Ent. 64	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	>	<u>D</u>
Pt24D	SMT Ent. 38	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	>	<u>D</u>
Pt25D	SJD Ent. 14	190 bp				<	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	>	<u>D</u>
Pt26L2	SJD Osario 13	190 bp				<	.	T	.	T	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	>	<u>L2a</u>

a: En relación a *Cambridge reference sequence* (Anderson *et al.* 1981). C: Citosina. T: Timina. A: Adenina. G: Guanina.
<: Inicio del fragmento. >: Final del fragmento.

4.2.2.1. Diversidad entre secuencias.

Debido al escaso número de secuencias de 400 pb, los análisis entre las secuencias nucleotídicas se realizaron tomando como base un fragmento de 162 pb entre las posiciones 16209-16370. Según lo establecido por Montiel (2001), este fragmento contiene suficiente información para realizar análisis filogenéticos, produciendo resultados similares a los obtenidos en segmentos de mayor tamaño. No obstante, el análisis de Montiel (2001) fue conducido con secuencias europeas y aún queda por determinar si en secuencias americanas se obtendrá el mismo resultado. Asimismo, Gilbert *et al.* 2003a, también señala que esta región, llamada región media del HVI, contiene la mayoría de las variantes filogenéticas.

Se analizaron las 162 posiciones nucleotídicas secuenciadas, 60 sitios son polimórficos, estos incluyen 21 sitios para cada serie precontacto y contacto y 18 sitios para post-contacto. De las posiciones polimórficas, 59 son transiciones siendo mayor el número de transiciones entre pirimidinas que entre purinas (22 T→C, 23 C→T, 9 A→G y 4 G→A) y una tranversión tipo C→G, en la posición 16270 observada en la secuencia Pr22B de la serie precontacto.

Se encontraron 16 haplotipos distintos en la serie precontacto, 17 en la serie contacto y 16 en post-contacto. De éstos, 9 son compartidos: 3 (Pr11A, Pr23C y Pr24C) son compartidos por precontacto y contacto, 4 haplotipos (Pr06A, Pr08A, Pr17B y Pr25D) los comparten precontacto y post-contacto y 2 (Pr01A y Pr15B) son comunes para las 3 series (tabla 4.9). Asimismo, en la comparación de las series analizadas, 29 secuencias son únicas: 7 pertenecen a la serie precontacto, 10 pertenecen a post-contacto y la serie contacto tiene 12 secuencias únicas, siendo la que presenta el mayor número de linajes propios; en cada serie hay dos individuos que comparten una de estas secuencias (tabla 4.10).

Tabla 4.9.
Haplotipos compartidos entre las series antiguas mesoamericanas.

Haplotipos	Posiciones polimórficas ^a (+ 16000)	Pr	Cn	Pt
Pr01A	223T, 290T, 319A, 362C	5	8	6
Pr06A	223T, 290T, 319A, 356C, 362C	1	0	1
Pr08A	223T, 290T, 311C, 319A, 362C	1	0	2
Pr11A	223T, 257T, 290T, 311C, 319A, 344T, 362C	1	1	0
Pr15B	217C	5	1	3
Pr17B	217C, 298C	1	0	1
Pr23C	223T, 298C, 325C, 327T	1	2	0
Pr24C	223T, 298C, 311C, 325C, 327T	1	1	0
Pr25D	223T, 325C, 362C	3	0	2

a: En relación a *Cambridge reference sequence* (Anderson *et al.* 1981).
Pr: Precontacto. Cn: Contacto. Pt: Post-contacto. Las secuencias correspondientes aparecen en las tablas 4.6, 4.7 y 4.8.

Tabla 4.10.
Haplotipos propios para cada una de las series antiguas mesoamericanas.

Haplotipos	Pr	Haplotipos	Cn	Haplotipos	Pt
Pr05A	1	Cn01A	1	Pt04A	1
Pr07A	1	Cn02A*	2	Pt10A	1
Pr09A	1	Cn03A	1	Pt11A	1
Pr10A*	2	Cn05A	1	Pt12A	1
Pr13A	1	Cn08A	1	Pt13A	1
Pr20B	1	Cn10A	1	Pt19B	1
Pr22B	1	Cn14A	1	Pt20B	1
		Cn15A	1	Pt21C*	2
		Cn17A	1	Pt24D	1
		Cn20B	1	Pt26L2a	1
		Cn22C	1		
		Cn26D	1		

*: Secuencias compartidas por dos individuos de la misma serie.
Pr: Precontacto. Cn: Contacto. Pt: Post-contacto. Las secuencias correspondientes aparecen en las tablas 4.6, 4.7 y 4.8.

4.2.2.2. Filogenia entre secuencias.

Con la finalidad de examinar las relaciones filogenéticas entre las secuencias, se calculó la distancia genética basada en el modelo de evolución molecular de Tamura & Nei (1993); este método ha sido desarrollado a partir de datos de la región de control del mtDNA, siendo el de máxima verosimilitud para la región HVI (Weiss & von Haeseler 1998). Asimismo, se utilizó la corrección de la distribución gamma de la tasa de mutación, siendo el parámetro $\alpha = 0.47$ (Wakeley 1993) y el correspondiente árbol

sin raíz fue realizado por el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987). La robustez del árbol se evaluó por remuestreos de *bootstrap* con un total de 1000 replicaciones; para ambos análisis se utilizó el programa MEGA v3.1 (Kumar *et al.* 2001). En la figura 4.3, se puede observar el árbol y los valores de *bootstrap* mayores de 50%.

La mayoría de los haplotipos están dentro de por lo menos 2 grandes grupos (*clusters*) caracterizados por la combinación de sitios polimórficos. El mayor de los *clusters*, se encuentra en la parte superior del árbol y está definido principalmente por cuatro posiciones polimórficas (16223T, 16290T, 16319A, 16362C). Este motivo lo presentan 5 secuencias de la población precontacto, 8 de contacto y 6 de post-contacto. En este cluster encontramos también 21 secuencias que contienen variantes de este motivo representando 27 individuos (8 precontacto, 11 contacto y 8 post-contacto). El haplotipo Cn05A no posee la mutación 16223T; sin embargo, presenta 3 de las mutaciones 16290T, 16319A, 16362C que identifican este *cluster*. En la región codificante, este *cluster* se caracteriza por el sitio polimórfico +663 *Hae* III, que define al haplogrupo A (Torróni *et al.* 1993a).

En la parte inferior del árbol se observa el segundo *cluster*, con dos ramas bien definidas; en la parte basal se observa una única secuencia con los motivos 16223T, 16362C (Pt24D), representando el haplotipo del cual se derivan muchas de las otras secuencias que se encuentran en los dos *subclusters* que conforman este grupo.

En el *subcluster* que ocupa la parte media del árbol, encontramos los motivos específicos del haplogrupo D 16223T, 16325C, 16362C para 3 precontacto (Pr25D, Pr26D y Pr27D) y 2 post-contacto (Pt23D, Pt25D), y en Cn26D se incorpora además la mutación 16271T. Este linaje está definido en la región de control por la posición polimórfica -5176 *Alu* I. Seguidamente, encontramos secuencias con la mutación 16327T, en el haplotipo Cn22C que pertenece al haplogrupo C y las variantes encontradas en 2 secuencias de precontacto (Pr23C y Pr24C); 3 de contacto (Cn23C, Cn24C y Cn25C); y 2 de post-contacto (Pt21C y Pt22C) que tiene en común la ausencia de la mutación 16362C, entre otros cambios puntuales. Todos estos haplotipos están definidos, en la región codificante, por los sitios polimórficos -13259 *Hinc* II y +13262 *Alu* I, que determinan al haplogrupo C.

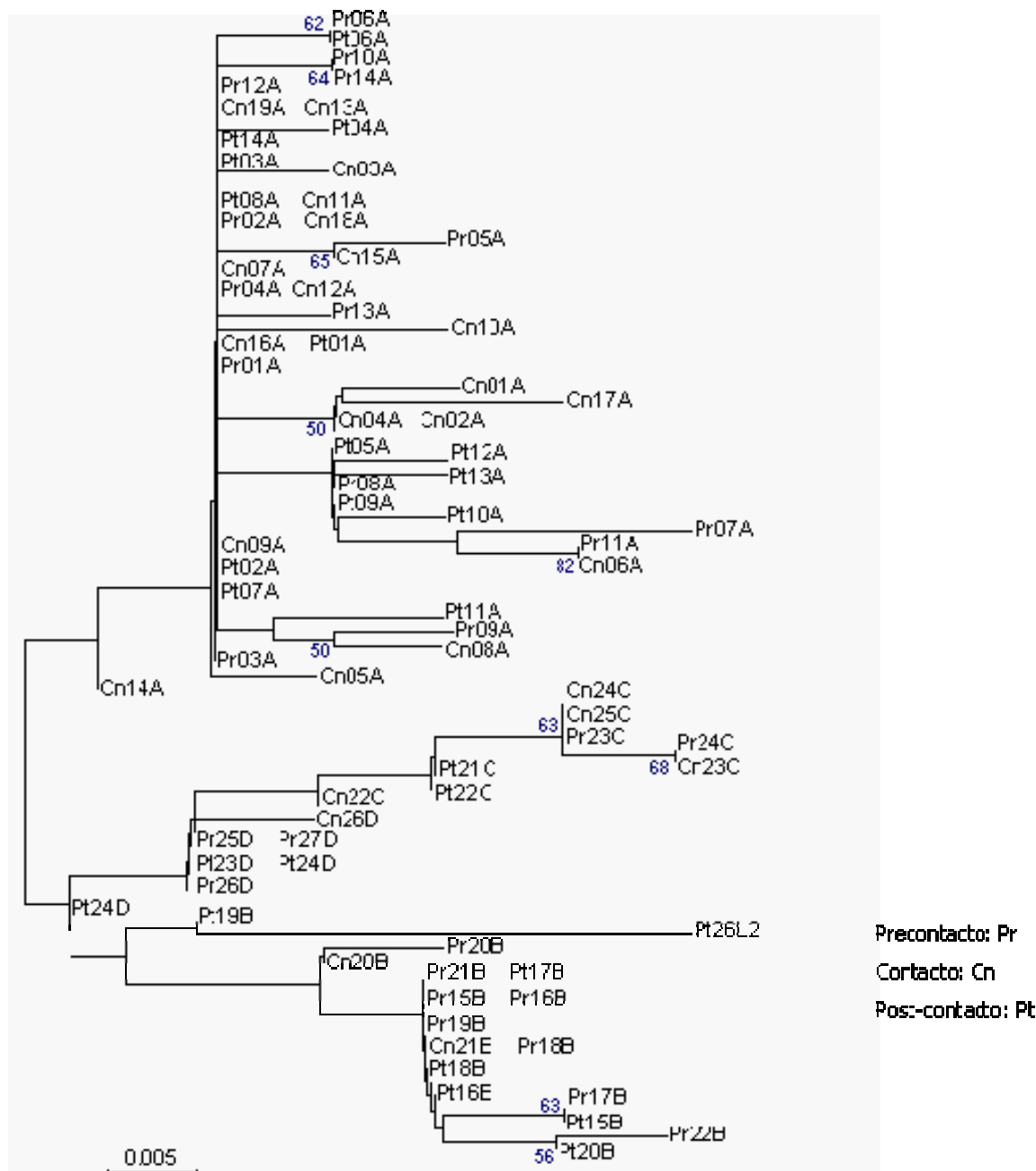


Figura 4.3. Árbol sin raíz realizado por método de *Neighbor-Joining* con las secuencias de precontacto, contacto y post-contacto. La distancia genética fue calculada basada en el modelo Tamura & Nei. En las ramas del árbol se indican los valores *bootstrap* superiores a 50% obtenidos de un total de 1000 réplicas. La correspondencia entre los códigos de las secuencias y las muestras se indican en las tablas 4.6, 4.7 y 4.8.

En el *subcluster* localizado en la parte inferior del árbol, se encuentran las secuencias del haplogrupo B, las cuales están representadas por 5 secuencias precontacto (Pr15B, Pr16B, Pr18B, Pr19B y Pr21B), 3 de post-contacto (Pt16B, Pt17B y

Pt18B) y una de contacto (Cn21B) definidas por la posición 16217C, acompañada por una delección polimórfica de 9 pb entre los genes COII y tRNA^{Lys}. Los haplotipos Pr17B, Pr20B, Cn2B, Pt15B y Pt20B, presentan una mutación adicional además del motivo basal de este haplogrupo, y Pr22B presenta 2 mutaciones más, una de las cuales es la transversión en la posición 16270 (C→G). Pt19B está caracterizado sólo por una mutación en la posición 16223T que es una sustitución basal de B; sin embargo, posee la delección de 9 pb y presumiblemente pertenece al haplogrupo B. En Derenko *et al.* (2000), se definen como B varios individuos que presentan la delección de 9 pb y que únicamente exhiben la transición 16223 T→C en la región HVI, como en nuestro caso.

Finalmente, el haplotipo Pt26L2a de la serie post-contacto, ubicado en el árbol en una posición intermedia entre los *subclusters* de C-D y de B, presenta mutaciones que son propias del subhaplogrupo africano L2a (16223T, 16278T, 16294T y 16309G) (Richards *et al.* 2000; Torroni *et al.* 2001); como hemos indicado en párrafos anteriores, en el análisis de RFLPs éste y otros dos individuos, fueron designados como “otros” debido a que no presentaron las posiciones polimórficas estables para ninguno de los cinco linajes americanos; sin embargo, fueron negativos para la posición polimórfica 10871 *Mnl* I, lo que supone una posible asignación a cualquiera de los haplogrupos L1, L2, L3 o M; lo que sustenta la autenticidad de esta secuencia.

El individuo con el haplotipo Pt26L2a, con posible linaje africano, pertenece al yacimiento Hospital San Juan de Dios de la serie post-contacto de la época colonial mexicana (siglo XIX), caracterizada por el ingreso de un contingente africano que llegó a estas tierras como esclavo. A pesar de que los datos arqueológicos sugieren que el enterramiento es típicamente indígena, no se descarta la posibilidad de encontrar individuos africanos que, de alguna manera, se hayan relacionado más cercanamente con la comunidad indígena de la zona. Por otra parte, no podemos desestimar la posibilidad de que este individuo sea indígena culturalmente pero que descienda de un ancestro femenino africano, ya sea su madre o su abuela.

Es de resaltar que la autora de este trabajo, presenta en su secuencia mitocondrial, mutaciones que corresponden a uno de los linajes africanos, específicamente al subhaplogrupo L1b. No obstante, las secuencias comparten exclusivamente, las mutaciones 16223T y 16278T, que son característicos para ambos

subhaplogrupos; por lo que no es posible que esta secuencia sea producto de una contaminación. Por otra parte, fueron escogidos al azar algunos individuos con la finalidad de repetir las secuencias, desde diferentes productos de PCR e inclusive desde producto de PCR de diferentes extractos para confirmar los resultados. En los casos concretos como Cn05A, Pt19B y Pt26L2a también se generó más de una secuencia obteniendo siempre los mismos resultados.

Así pues, en base a los análisis de RFLPs/delección de 9 pb y de las secuencias de HVI, todos los linajes mitocondriales de las series estudiadas tiene un origen americano, con la excepción de 3 individuos de la serie post-contacto, de los cuales en sólo uno se logró obtener la secuencia de HVI, siendo asignado al subhaplogrupo africano L2a (tablas 4.11, 4.12 y 4.13).

Tabla 4.11.
Resultados obtenidos por secuenciación de la región HVI (Haplotipo) y RFLPs (Haplogrupo) en la serie Precontacto.

Muestra	Haplotipo (+16000)	Haplogrupo
Pr01A*	111T, 223T, 290T, 319A, 362C	A
Pr02A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pr03A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pr04A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pr05A	223T, 261T, 274G, 290T, 319A, 362C	A
Pr06A	223T, 290T, 319A, 356C, 362C	A
Pr07A*	092C, 111T, 223T, 257T, 311C, 290T, 319A	A
Pr08A*	111T, 223T, 311C, 290T, 319A, 362C	A
Pr09A	223T, 249C, 264T, 290T, 319A, 362C	A
Pr10A	223T, 289G, 290T, 319A, 362C	A
Pr11A	223T, 257T, 290T, 311C, 319A, 344T, 362C	A
Pr12A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pr13A	223T, 240G, 290T, 319A, 362C	A
Pr14A	223T, 289G, 290T, 319A, 362C	A
Pr15B	217C	B
Pr16B*	189T, 217C	B
Pr17B	217C, 298C	B
Pr18B	217C	B
Pr19B	217C	B
Pr20B	217C, 241G, 362C	B
Pr21B	217C	B
Pr22B	217C, 270G, 278T	B
Pr23C*	223T, 298C, 325C, 327T	C
Pr24C	223T, 298C, 311C, 325C, 327T	C
Pr25D	223T, 325C, 362C	D
Pr26D	223T, 325C, 362C	D
Pr27D	223T, 325C, 362C	D

*: Secuencias de 400 pb.

Tabla 4.12 y 4.13.

Resultados obtenidos por secuenciación de la región HVI (Haplotipo) y RFLPs (Haplogrupo) en las series Contacto y Postcontacto.

Muestra	Haplotipo (+16000)	Haplogrupo
Cn01A	223T, 277G, 290T, 319A, 326G, 362C	A
Cn02A	223T, 290T, 319A, 326G, 362C	A
Cn03A*	111T, 223T, 288C, 290T, 319A, 362C	A
Cn04A	223T, 290T, 319A, 326G, 362C	A
Cn05A	290T, 319A, 362C	A
Cn06A	223T, 257T, 290T, 311C, 319A, 344T, 362C	A
Cn07A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn08A	223T, 264T, 290T, 319A	A
Cn09A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn10A	223T, 234T, 267T, 290T, 319A, 362C	A
Cn11A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn12A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn13A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn14A	223T, 290T, 362C	A
Cn15A	223T, 274A, 290T, 319A, 362C	A
Cn16A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn17A	223T, 278T, 290T, 319A, 326G, 328T, 362C	A
Cn18A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn19A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Cn20B	217C, 362C	B
Cn21B	217C	B
Cn22C	223T, 325C, 327T, 362C	C
Cn23C	223T, 298C, 311C, 325C, 327T	C
Cn24C	223T, 298C, 325C, 327T	C
Cn25C	223T, 298C, 325C, 327T	C
Cn26D*	223T, 271C, 325C, 362C	D
Muestra	Haplotipo	Haplogrupo
Pt01A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pt02A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pt03A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pt04A	223T, 290T, 319A, 360T, 362C	A
Pt05A	223T, 290T, 311C, 319A, 362C	A
Pt06A	223T, 290T, 319A, 356C, 362C	A
Pt07A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pt08A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pt09A	223T, 290T, 311C, 319A, 362C	A
Pt10A	223T, 265G, 290T, 311C, 319A, 362C	A
Pt11A	223T, 290T, 319A, 335G	A
Pt12A	223T, 278T, 290T, 311C, 319A, 362C	A
Pt13A	223T, 290T, 292T, 311C, 319A, 362C	A
Pt14A	223T, 290T, 319A, 362C	A
Pt15B*	189C, 217C, 298C	B
Pt16B	217C	B
Pt17B	217C	B
Pt18B	217C	B
Pt19B	223T	B
Pt20B	217C, 278T	B
Pt21C*	051G, 223T, 325C, 327T	C
Pt22C	223T, 325C, 327T	C
Pt23D	223T, 325C, 362C	D
Pt24D	223T, 362C	D
Pt25D	223T, 325C, 362C	D
Pt26L2a	223T, 278T, 294T, 309G, 335T	OTRO

*: Secuencias de 400 pb.

4.2.2.3. Posibles relaciones familiares.

En las series precontacto y contacto se han estudiado distintos individuos enterrados en una misma tumba y se podría postular la pertenencia a un grupo familiar (tabla 4.14). De los 8 casos que esto ocurre, en 6 grupos (4 precontacto y 2 contacto) existen coincidencias en cuanto a la asignación de haplogrupos por RFLPs, con lo que la relación entre estos individuos podría ser por línea materna, la única que es posible identificar a partir del mtDNA. Sin embargo, se trata de individuos que pertenecen a los haplogrupos más frecuentes. El haplogrupo A que es el más frecuente en todas las series y el haplogrupo B que presenta la segunda frecuencia más elevada en el yacimiento de Tlatelolco, por lo que las coincidencias también podrían ser debidas a la elevada presencia de estos linajes en la muestra analizada.

En el yacimiento precontacto de Tlatelolco, la comparación de las secuencias de los individuos con una misma numeración de enterramiento, ha dado en general diferencias que indican que no pertenecen al mismo linaje materno. Compartían haplogrupos los individuos de los *Ent. 1*, *Ent. 6bis*, *Ent. 11* y *Ent. 25*. Solamente los individuos del enterramiento *1* y dos del enterramiento *6bis* comparten la misma secuencia: los individuos *Ent-1* y *Ent1 (C-23)* comparten la mutación 16217C, aunque ha sido imposible comprobar la 16189C en el primer individuo, ya que el fragmento amplificado no incluyó esta posición; en cuanto a los individuos *1* y *2* del enterramiento *6bis* comparten la sustitución 16271C en el mismo fragmento amplificado y se diferencian del tercer individuo *Ent 6bis-I3* por la ausencia de la mutación 16298C. Cabe la posibilidad de que esta sustitución (16298C) sea el producto de un daño molecular; no obstante, al compararla con haplotipos de B, publicados en la literatura, es una mutación característica de estos linajes, por lo cual descarta la posibilidad de daño *post-mortem*.

El yacimiento de Los Olmos de la serie contacto, exhibe dos enterramientos compartidos *O11* y *O12*. Los dos individuos del enterramiento *11* comparten las mutaciones basales del haplogrupo A, además de la mutación 326 G→A; no obstante, existen otras sustituciones que no son coincidentes. En el enterramiento *12*, no se ha podido comprobar la posible relación materna a partir de la secuencias del fragmento

HVI analizado, debido a que sólo se ha podido obtener una de las secuencias de los tres individuos.

Tabla 4.14.
Enterramientos compartidos.

Yacimiento	Enterramiento	Individuo	Haplogrupo	HVI-Mutaciones (+16000)a
Tlatelolco	Ent 1		B	<u>217C</u>
Precontacto	Ent 1	C. 23	B	<u>217C</u> , 298C
	Ent 1	I-2 (C.62)	B	Sin Secuencia
	Ent 1	C.68	B	Sin Secuencia
	Ent 5		D	223T, 325C, 362C
	Ent 5	C.47	A	223T, 290T, 319A, 362C
	Ent 6		C	223T, 298C, 325C, 327T
	Ent 6	C.48	A	223T, 290T, 319A, 362C
	Ent 6bis	1	B	<u>217C</u>
	Ent 6bis	2	B	<u>217C</u>
	Ent 6bis	3	B	<u>217C</u> , 298C
	Ent 11		A	<u>223T</u> , 249C, 264C, <u>290T, 319A, 362C</u>
	Ent 11	C.52	A	<u>223T, 290T, 319A, 362C</u>
	Ent 15	I-2	A	<u>223T</u> , 261T, 274A, <u>290T, 319A, 362C</u>
	Ent 15	C.32	D	223T, 325C, 362C
	Ent 25	C.4	A	<u>223T, 257C, 290T, 311C, 319A, 362C</u>
	Ent 25	C.43	A	<u>223T, 257C, 290T, 311C, 319A, 344T, 362C</u>
Los Olmos	O11	Cap. Fosa 4	A	<u>223T</u> , 277G, <u>290T, 319A, 326G, 362C</u>
Contacto	O11	Cap. 41	A	<u>223T</u> , 278T, <u>290T, 319A, 326G</u> , 328T, <u>362C</u>
	O12	pozo 4	A	223T, 290T, 319A, 362C
	O12		A	Sin Secuencia
	Ent. 12		A	Sin Secuencia

Subrayados las mutaciones coincidentes entre los individuos de un mismo enterramiento.

4.3. Análisis interpoblacional.

Con la intención de situar en un contexto poblacional las muestras antiguas analizadas, la distribución de frecuencias de haplogrupos y las secuencias obtenidas de las 3 series del Valle Central de México fueron comparadas con datos provenientes de 29 poblaciones de Nativos americanos y 2 poblaciones asiáticas para un total de 31 poblaciones, distribuidas de la siguiente manera: 13 poblaciones o series antiguas compuestas por más de 15 individuos y 16 poblaciones contemporáneas, distribuidas geográficamente a lo largo de todo el continente americano y tomando en cuenta la clasificación lingüística propuesta por Greenberg y colaboradores en 1986.

Por otra parte, también se incluyeron en el análisis 2 poblaciones asiáticas, una serie antigua localizada al Norte de Mongolia y una población de aborígenes contemporáneos del suroeste de Siberia. Aunque dos poblaciones no representan la variabilidad genética asiática, fueron incluidas en el análisis interpoblacional, ya que estudios recientes (Derenko *et al.* 2000, 2001; Zegura *et al.* 2004), sostienen la hipótesis que la colonización del continente americano se llevó a cabo en una sola migración, que tuvo su origen geográfico en la región del suroeste de Siberia, área donde de derivan estas series. (Para los datos de poblaciones contemporáneas y antiguas de comparación, ver tabla 3.7 y 3.8 en Materiales y Métodos).

Los datos del trabajo publicado por Ribeiro-dos-Santos y colaboradores (1996) sobre una población antigua de indígenas amazónicos de Brasil, tuvieron que ser traducidos a la nomenclatura habitual de haplogrupos americanos. La distribución de haplogrupos había sido asignada siguiendo la numeración I-IV descrita por Horai *et al.* (1993), donde I corresponde al haplogrupo B, II al haplogrupo D, III al haplogrupo A y IV al haplogrupo C; tomando como base esta clasificación y según la correspondencia haplogrupo-secuencia propuesta por Wallace *et al.* (1985), Schurr *et al.* (1990) y Torroni *et al.* (1992), se infirieron los linajes mitocondriales de esta población del Norte de Brasil. Por otra parte, en la misma publicación, 3 individuos fueron clasificados como haplogrupo V y 4 como haplogrupo VI, ya que, según los autores, no presentaron ninguna de las mutaciones que corresponden a los 4 linajes principales

mitocondriales americanos. En el caso de los 3 individuos del haplogrupo V, posteriormente fueron considerados como X (Ribeiro-dos-Santos *et al.* 1997) y los 4 del haplogrupo VI, los designamos como "otros", por que sus secuencias no corresponden a linaje conocido. No obstante, en ningún caso esta clasificación pretende ser definitiva.

Debido a que 11 de las poblaciones seleccionadas para la comparación (5 poblaciones contemporáneas de México y 6 series antiguas) no registran datos de secuencias de la región HVI, los análisis estadísticos fueron calculados por separado para la distribución de frecuencias de haplogrupos y para las secuencias de la región HVI. En ambos casos, estos análisis se han basado fundamentalmente en los 5 haplogrupos fundadores mitocondriales americanos (A, B, C, D y X), e incluyendo los haplogrupos asiáticos (E, F, G y M) encontrados en las poblaciones de Mongolia y Sur de Siberia, debido a la supuesta afinidad entre los grupos asiáticos y americanos. Por otra parte, todos aquellos linajes europeos o africanos presentes en las poblaciones de comparación fueron excluidos, ya que, posiblemente, serían el producto de mezclas recientes y sólo se designan como "otros" aquellos que, por diversas razones, no pudieron ser asignados a ningún linaje mitocondrial.

4.3.1. Distribución de frecuencia de haplogrupos.

En la tabla 4.15, se muestra la distribución de haplogrupos de las 31 poblaciones utilizadas para la comparación y las 3 series antiguas analizadas en este estudio. La vasta mayoría de los mtDNAs de las poblaciones de comparación corresponden al haplogrupo A, de los 2263 individuos incluidos en el análisis, 708 pertenecen a este haplogrupo, presentando la mayor frecuencia la población Na-Dene (ND.2) con un 0.875, seguida de las poblaciones antiguas de México de la cultura Maya (MX2.1 – 0.840) y la población de contacto del Valle Central mexicano (CNMX.1 – 0.700); por otra parte, la población antigua de Estados Unidos de la cultura Fremont (US4.1), las de Republica Dominicana y Argentina (DR.1, AR.1) y la contemporánea de Brasil (BR.2) no presentan ningún individuo caracterizado con este haplogrupo.

Tabla 4.15.
Distribución de frecuencias de haplogrupo de las tres series antiguas y las poblaciones de referencia
descritas en las tablas 3.7 y 3.8.

Poblaciones y series	<i>n</i>	Código ^a	A	B	C	D	X	G F E M ^b	Otros	Referencias
ASIA										
Mongolia (Xiongnu)	41	MG.1	0.195	0.024	0.146	0.463	0.000	0.169	0.000	Keyser-Traqui <i>et al.</i> 2003
South Siberia (Tuvinians & Buryats)	71	SS.2	0.056	0.098	0.296	0.225	0.000	0.323	0.000	Derenko <i>et al.</i> 2000
AMERICA										
<u>Esquimo-aleutianos</u>										
Alaska (Aleutianos)	17	AL.1	0.353	0.000	0.000	0.647	0.000	0.000	0.000	Hayes 1998, O'Rourke <i>et al.</i> 2000
Alaska (Aleutianos)	163	AL.2	0.344	0.000	0.000	0.656	0.000	0.000	0.000	Rubicz <i>et al.</i> 2003
<u>Na-Denes</u>										
Canada (Na-Denes)	40	ND.2	0.875	0.000	0.075	0.05	0.000	0.000	0.000	Ward <i>et al.</i> 1993
<u>Amerindios</u>										
Canadá (Aborígenes Amerindios)	102	CA.2	0.520	0.0392	0.147	0.225	0.068	0.000	0.000	Ward <i>et al.</i> 1991, 1993 Kaestle 1997 citado por O'Rourke <i>et al.</i> 2000
Estados Unidos (Northern Pauite)	41	US1.1	0.0732	0.341	0.000	0.537	0.000	0.000	0.048	
Estados Unidos (Wishram)	60	US2.1	0.200	0.450	0.066	0.250	0.033	0.000	0.000	Malhi <i>et al.</i> 2004
Estados Unidos (Oneota)	52	US3.1	0.315	0.120	0.426	0.083	0.018	0.000	0.037	Stone & Stoneking 1998 Parr <i>et al.</i> 1996,
Estados Unidos (Fremont)	34	US4.1	0.000	0.735	0.118	0.058	0.000	0.000	0.088	O'Rourke <i>et al.</i> 2000
Estados Unidos (Anasazis)	22	US5.1	0.227	0.591	0.090	0.000	0.000	0.000	0.090	Carlyle <i>et al.</i> 2000, O'Rourke <i>et al.</i> 2000
México (Precontacto-Valle Central)	30	PRMX.1	0.467	0.367	0.066	0.100	0.000	0.000	0.000	Este Estudio
México (Contacto-Valle Central)	30	CNMX.1	0.700	0.100	0.167	0.033	0.000	0.000	0.000	Este Estudio
México (Post-contacto-Valle Central)	30	PTMX.1	0.467	0.233	0.100	0.100	0.000	0.000	0.100	Este estudio
México (Azteca)	23	MX1.1	0.652	0.130	0.043	0.174	0.000	0.000	0.000	Kemp <i>et al.</i> 2005

a: En los códigos se identifica con 1 poblaciones antiguas, y con 2 poblaciones contemporáneas.

b: Haplogrupos asiáticos.

CP: Comunicación personal.

Continuación tabla 4.15.

Población y series	<i>n</i>	Código ^a	A	B	C	D	X	G F E M ^b	Otros	Referencia
México (Maya)	25	MX2.1	0.840	0.040	0.080	0.000	0.000	0.000	0.040	González-Oliver <i>et al.</i> 2001
México (Mestizos)	199	MX1.2	0.377	0.296	0.261	0.065	0.000	0.000	0.000	Green <i>et al.</i> 2000 Moreno 2005
México (Nazahuas)	73	Mx2.2	0.603	0.356	0.041	0.000	0.000	0.000	0.000	González-Martín (CP) Hernández 2005
México (Huastecos)	97	MX3.2	0.670	0.216	0.041	0.061	0.000	0.000	0.010	González-Martín (CP) Vergara 2005
México (Pachucas)	99	MX4.2	0.505	0.283	0.162	0.030	0.000	0.000	0.020	González-Martín (CP) Schurr <i>et al.</i> 1990,
México (Mayas)	27	MX5.2	0.519	0.222	0.148	0.074	0.000	0.000	0.037	Torroni <i>et al.</i> 1992
México (Mixtecos-Zapotecas)	44	MX6.2	0.659	0.182	0.159	0.000	0.000	0.000	0.000	Torroni <i>et al.</i> 1994
Cuba (Siboneyes)	15	CB.1	0.066	0.000	0.600	0.333	0.000	0.000	0.000	Lalueza-Fox <i>et al.</i> 2003
República Dominicana (Taino)	24	DR.1	0.000	0.000	0.750	0.250	0.000	0.000	0.000	Lalueza-Fox <i>et al.</i> 2001
Costa Rica (Huetar)	30	CR.2	0.667	0.066	0.000	0.267	0.000	0.000	0.000	Santos M, <i>et al.</i> 1994
Panamá (Emberá-Wounnans)	75	PN.2	0.253	0.387	0.347	0.013	0.000	0.000	0.000	Kolman & Birmingham 1997
Venezuela (Guahibos)	59	VZ.2	0.475	0.0339	0.492	0.000	0.000	0.000	0.000	Vona <i>et al.</i> 2005 Ribeiro-dos-Santos <i>et al.</i> 1996
Brasil (Indígenas Amazona)	18	BR.1	0.000	0.561	0.316	0.123	0.000	0.000	0.000	Williams <i>et al.</i> 2002
Brasil (Yanomamös)	155	BR.2	0.000	0.561	0.316	0.123	0.000	0.000	0.000	Williams <i>et al.</i> 2002
Ecuador (Cayapas)	94	EC.2	0.292	0.4	0.091	0.000	0.000	0.000	0.217	Rickards <i>et al.</i> 1999
Perú (Ancash)	33	PR.2	0.090	0.515	0.182	0.212	0.000	0.000	0.000	Lewis <i>et al.</i> 2005
Chile (Varios del Valles Desérticos)	61	CH.1	0.262	0.344	0.148	0.032	0.000	0.000	0.213	Moraga <i>et al.</i> 2005
Chile (Mapuches, Pehuenches & Yaghan)	237	CH.2	0.012	0.080	0.43	0.477	0.000	0.000	0.000	Moraga <i>et al.</i> 2000 Lalueza <i>et al.</i> 1997,
Argentina (Fueguinos & Patagones)	60	AR.1	0.000	0.000	0.383	0.600	0.000	0.000	0.016	García-Bour <i>et al.</i> 2004

a: En los códigos se identifica con 1 poblaciones antiguas, y con 2 poblaciones contemporáneas.

b: Haplogrupos asiáticos.

CP: Comunicación personal.

Entre todos los individuos analizados, 503 fueron caracterizados con el haplogrupo B. Con respecto a este haplogrupo B, las poblaciones antiguas de las culturas Fremont y Anasazi de Estados Unidos (US4.1 y US5.1) y las actuales suramericanas de Brasil y Perú (BR.2, y PR.2) presentan la más altas proporciones de éste linaje (0.735, 0.591, 0.561 y 0.515 respectivamente), por el contrario las poblaciones del Sur del Ártico (AL.1, AL.2, ND.2) las poblaciones antiguas de las islas de Cuba (CB.1) y República Dominicana (DR.1) y la antigua sureña de Argentina (AR.1) no tienen representación de este haplogrupo.

Con respecto al haplogrupo C, las series antiguas Caribeñas (Cuba CB.1 - 0.600 y Republica Dominicana DR.1 - 0.750) y la contemporánea de Venezuela (VZ.2 - 0.492) son las que exhiben la mayor frecuencia. La similitud en la distribución del linaje mitocondrial C en estas poblaciones, podría reflejar la posible colonización de las Islas del Caribe desde el norte de Suramérica (Lalueza-Fox *et al.* 2003). Por otra parte, este linaje representado en casi todas las poblaciones de comparación aunque con una frecuencia relativamente baja, con la excepción de los Esquimo-alutianos (AL.1 y AL.2), la población antigua norteamericana del oeste de Nevada (US1.1) y de Costa Rica (CR.2) donde no hay individuos caracterizados con este haplogrupo. Contrariamente, C es el haplogrupo de mayor frecuencia en la población del Sur de Siberia con un 0.296.

El linaje mitocondrial D es el menos representado a lo largo de toda América: 18 de las 34 poblaciones analizadas presentan una frecuencia inferior a 0.1, incluidas las tres series de México, Valle Central. Las poblaciones con mayor frecuencia son los Esquimo-alutianos (AL.1 - 0.647 y AL.2 - 0.656) y en el sur del continente la población antigua de Argentina (AR.2) con un 0.600. Además, en la población asiática de Mongolia (MG.2) este haplogrupo exhibe la mayor frecuencia (0.463).

Como se ha indicado en el capítulo 1 (Introducción), en las Américas el haplogrupo X tiene una proporción muy baja (aproximadamente 3%) y está restringido casi exclusivamente a Amerindios del Norte, tal es el caso de las comunidades indígenas de Nuu-Chah-Nult y Bella Coola en Canadá (CA.2) con un 0.068 y las poblaciones antiguas del noroeste de Estados Unidos (US2.1 - 0.033) y de la cultura Oneota (US3.1 - 0.018). La presencia de X en estas series antiguas confirma el supuesto que el haplogrupo X, probablemente, estaba presente aunque con muy baja

frecuencia entre los colonizadores asiáticos (Brown *et al.* 1998; Malhi & Smith 2002). A pesar de esto, tres individuos antiguos de Brasil pueden ser potencialmente clasificados como X, por presentar en sus secuencias las transiciones C→T en las posiciones 16223 y 16278 (Ribeiro-dos-Santos *et al.* 1996, 1997); sin embargo, estas muestras no han sido corroboradas con el análisis de restricción en las posiciones polimórficas -1715 *Dde* I y/o +14465 *Acc* I. Hasta la fecha en Suramérica el haplogrupo X sólo se ha observado en esta serie antigua brasileña, lo que podría dar nuevos indicios de la evolución histórica americana; sin embargo, es necesario sopesar la posibilidad de que estas secuencias sean el producto de problemas metodológicos inherentes al aDNA.

En cuanto a la filogeografía de los 4 principales haplogrupos fundadores americanos, los datos muestran que el haplogrupo A se encuentra presente tanto en las regiones del Sur de Asia y Mongolia, como en toda América; obviamente estamos hablando de análisis realizados con frecuencias de haplogrupos, que no expresan los distintos tipos mitocondriales de este haplogrupo en el continente asiático. Los grupos Na-Denes y Amerindios del Norte de *British Columbia* en Canadá representados en este trabajo por las tribus indígenas de Haida y Nuu-Chah-Nult y Bella Coola respectivamente, exhiben una alta frecuencia del haplogrupo A; sin embargo, en las poblaciones de Estados Unidos esta frecuencia disminuye de forma significativa y posteriormente aumenta en las poblaciones mexicanas (incluidas las antiguas y contemporáneas). En Centro y Suramérica el haplogrupo A decrece su frecuencia de norte a sur (figura 4.6 – gráfico Haplogrupo A).

La distribución del haplogrupo B es muy baja en las poblaciones asiática y virtualmente ausente en el Sur del Ártico. Incrementa su frecuencia en las poblaciones de Estados Unidos y disminuye en México con una frecuencia promedio que no supera el 0.4. En el sur de América se observa un incremento de este linaje en las poblaciones de la Costa del Pacífico incluyendo, en nuestro caso, las poblaciones indígenas centroamericanas de Emberá-Wounnan de Panamá que pertenecen a la familia lingüística Chocó, la cual se extiende desde Panamá hasta Ecuador a lo largo del Pacífico (figura 4.6 – gráfico Haplogrupo B).

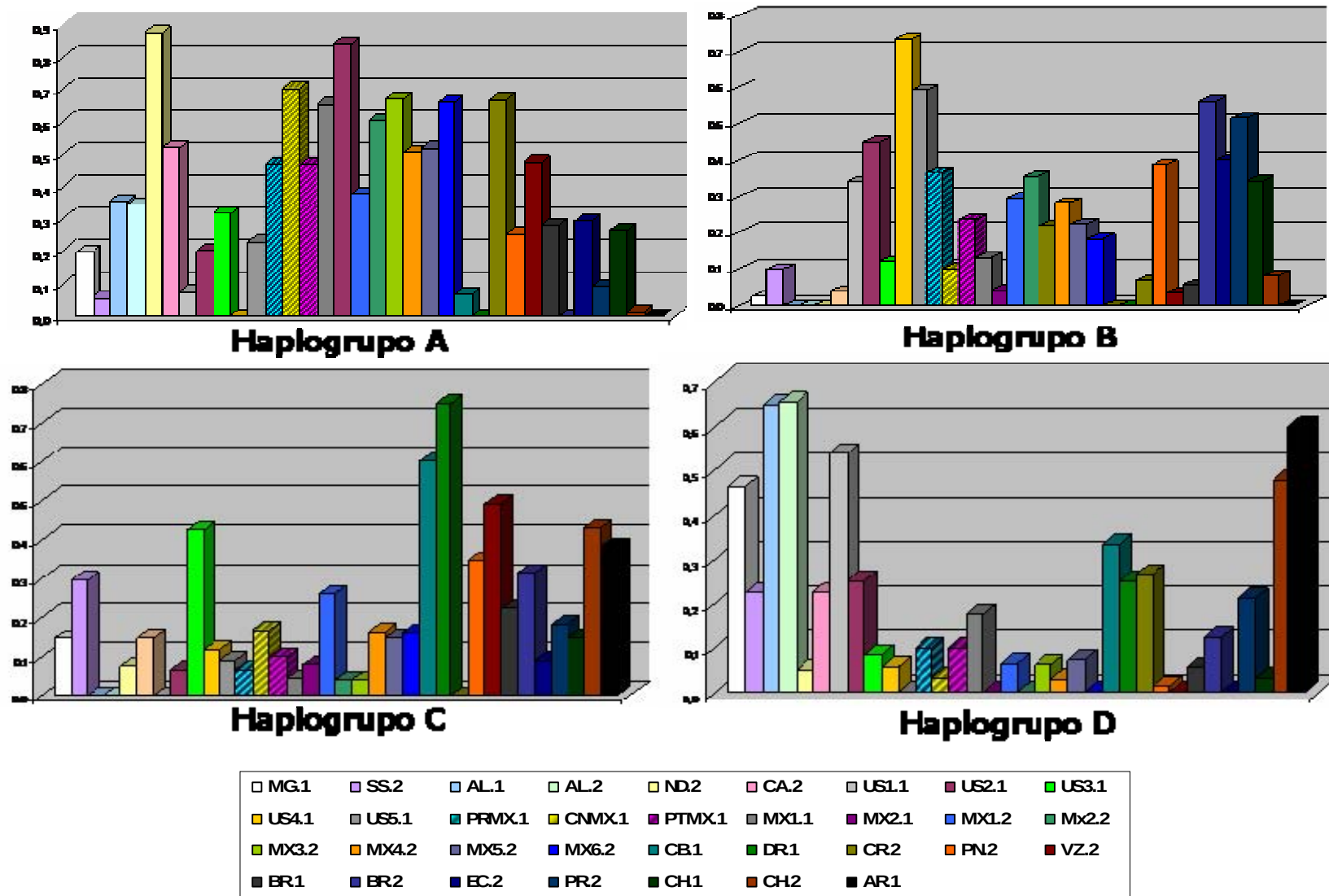


Figura 4.6. Gráficos de distribución de frecuencias de los 4 principales haplogrupos mitocondriales americanos. Las poblaciones están ordenadas de Norte a Sur. Los códigos aparecen en la tabla 4.15.

Finalmente, los haplogrupos C y D tienen una distribución geográfica más restringida. En la región del Sur del Ártico el haplogrupo C está virtualmente ausente y en el resto del continente su frecuencia se incrementa de norte a sur, pero sin superar, en ninguna población el 0.5, con la excepción de las series antiguas de las islas caribeñas de Cuba y de República Dominicana.

El haplogrupo D exhibe una alta frecuencia en los extremos del continente; extrañamente, vemos incrementado sus valores porcentuales en las series antiguas de las islas del Caribe y en la población Huetar de Costa Rica. En las poblaciones asiáticas analizadas se observa una alta frecuencia de estos 2 linajes, no obstante como hemos indicado, en este análisis no se reflejan los distintos subgrupos mitocondriales (figura 4.6 – gráficos Haplogrupos C y D).

De la comparación de los gráficos se desprende que el haplogrupo A es el sustrato común para prácticamente todas las poblaciones, con algunas excepciones como las poblaciones de Argentina y Chile, No obstante, los otros tres haplogrupos tienen sus máximos en los extremos del continente (formando gráficos en forma de U), siendo que el gráfico de la distribución de frecuencias del haplogrupo C, en relación a las poblaciones del norte, tiene forma de L.

4.3.1.1. Diversidad genética.

El índice de diversidad genética (Nei 1987) en relación a las frecuencias de haplogrupos se define como la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar presenten diferentes haplogrupos mitocondriales. Los valores de diversidad genética ($\hat{H}$) estimados para las poblaciones de comparación, se encuentran descritos en la tabla 4.16.

Las poblaciones antiguas del Valle Central mexicano (PRMX.1, CNMX.1 y PTMX.1) presentan valores que nos permiten dividir al conjunto de las poblaciones en tres grandes grupos. El grupo con mayor diversidad genética donde se encuentra la serie post-contacto; el grupo con menor diversidad donde se posiciona la serie contacto y el grupo de poblaciones con diversidad genética intermedia, donde se

localiza la serie precontacto. No obstante, los valores que presentan las tres series analizadas en este estudio están dentro del rango de las poblaciones contemporáneas de comparación e igualmente están dentro del rango del subconjunto de las poblaciones mexicanas.

Tabla 4.16.
Índices de Diversidad genética de las poblaciones de Referencia.

Poblaciones y series	Código	$\hat{H} \pm de$
Brasil (Indígenas del Amazona)	BR.1	0.8366 $\pm$ 0.0445
Sur de Siberia (Tuvinians & Buryats)	SS.2	0.8217 $\pm$ 0.0218
Chile (Varios de Valles Desérticos)	CH.1	0.7568 $\pm$ 0.0228
Mongolia (Xiongnu)	MG.1	0.7305 $\pm$ 0.0545
México (Post-contacto)	PTMX.1	0.7218 $\pm$ 0.0619
Ecuador (Cayapas)	EC.2	0.7055 $\pm$ 0.0185
Estados Unidos (Oneota)	US3.1	0.7028 $\pm$ 0.0268
Estados Unidos (Wishram)	US2.1	0.7011 $\pm$ 0.0366
México (Mestizos)	MX1.2	0.7010 $\pm$ 0.0116
México (Mayas)	MX5.2	0.6781 $\pm$ 0.0737
Panamá (Emberá-Wounnan)	PN.2	0.6750 $\pm$ 0.0173
Perú (Ancash)	PR.2	0.6686 $\pm$ 0.0623
Canadá (Aborígenes Amerindios)	CA.2	0.6577 $\pm$ 0.0368
México (Precontacto)	PRMX.1	0.6552 $\pm$ 0.0531
México (Pachucas)	MX4.2	0.6440 $\pm$ 0.0319
Estados Unidos (Anasazis)	US5.1	0.6104 $\pm$ 0.0944
Estados Unidos (Northern Paiute)	US1.1	0.6024 $\pm$ 0.0516
Chile (Mapuches, Pehuenches & Yaghan)	CH.2	0.5833 $\pm$ 0.0150
Brasil (Yanomamös)	BR.2	0.5737 $\pm$ 0.0259
Cuba (Siboneyes)	CB.1	0.5619 $\pm$ 0.0954
México (Azteca)	MX1.1	0.5494 $\pm$ 0.1045
Venezuela (Guahibos)	VZ.2	0.5412 $\pm$ 0.0243
México (Mixtecos-Zapotecas)	MX6.2	0.5190 $\pm$ 0.0708
México (Mazahuas)	Mx2.2	0.5152 $\pm$ 0.0361
México (Huastecos)	MX3.2	0.5037 $\pm$ 0.0499
Argentina (Fueguinos & Patagones)	AR.1	0.5011 $\pm$ 0.0336
Costa Rica (Huetar)	CR.2	0.4966 $\pm$ 0.0799
México (Contacto)	CNMX.1	0.4874 $\pm$ 0.0972
Alaska (Aleutianos)	AL.1	0.4853 $\pm$ 0.0786
Alaska (Aleutianos)	AL.2	0.4538 $\pm$ 0.0236
Estados Unidos (Fremont)	US4.1	0.4474 $\pm$ 0.0978
República Dominicana (Taino)	DR.1	0.3913 $\pm$ 0.0912
México (Maya)	MX2.1	0.2967 $\pm$ 0.1150
Canadá (Na-Denes)	ND.2	0.2321 $\pm$ 0.0850

a: $\hat{H} \pm de$: diversidad genética $\pm$ desviación estándar.

Se destacan las series antiguas del Valle Central de México.

La serie post-contacto (PTMX.1) exhibe el mayor valor de diversidad entre todas las poblaciones mexicanas de comparación debido, posiblemente, a los individuos caracterizados como "otros", que no corresponden a ninguno de los 5 principales linajes americanos y que posiblemente se trate de individuos africanos. En general, estos datos nos indican que las series antiguas mexicanas muestran niveles de variabilidad similares a los grupos contemporáneos.

En la figura 4.7 se presenta un gráfico con los rangos de diversidad para el conjunto de las poblaciones analizadas y para distintos subconjuntos organizados de la siguiente manera:

1. Todas las poblaciones (34 poblaciones de comparación).
2. Este Estudio (3 series: precontacto, contacto y post-contacto).
3. Antiguos (17 series antiguas de comparación incluidas las 3 series del Valle Central de México).
4. Contemporáneos (17 poblaciones contemporáneas de comparación).
5. Asia (1 serie antigua y 1 población contemporáneas).
6. Esquimo-A. (1 serie antigua y 1 población contemporáneas).
7. Na-Dene (1 población Na-Dene)

Poblaciones Amerindias antiguas y contemporáneas:

8. Norte América (6 poblaciones)
9. México (11 poblaciones, incluidas las 3 series del Valle Central).
10. Centro América (4 poblaciones)
11. Sur América (8 poblaciones)

Los valores medios entre Amerindios de Norte América, México y Centro América son similares; no obstante, las poblaciones sureñas presentan los valores de $\hat{H}$ más altos entre todos los amerindios. Cuando evaluamos el conjunto de las poblaciones, el mayor valor lo exhibe la población antigua de Brasil (BR.1 - 0.8366 ± 0.0445) y el menor, lo presenta la población Na-Dene (ND.2 - 0.2321 ± 0.0850), con un promedio de 0.5884. Es interesante destacar que las poblaciones antiguas presentan un rango de diversidad que se superpone a la diversidad actual.

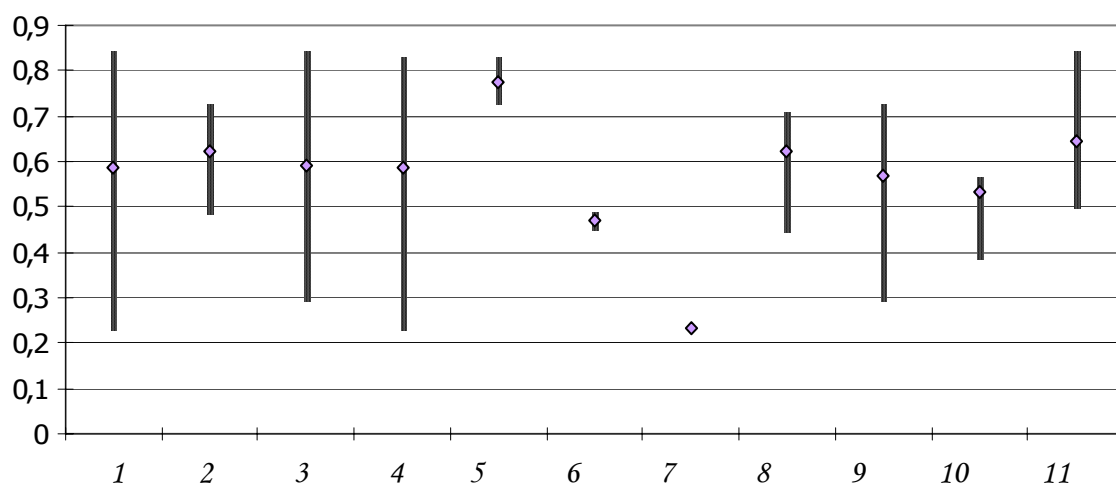


Figura 4.7. Gráfico de diversidad genética ($\hat{H}$) estimada por regiones geográficas. Las poblaciones que representan los números aparecen en el texto página 123.

4.3.1.2. Análisis de componentes principales.

Las series antiguas del Valle Central de México (precontacto, contacto y post-contacto), presentan una distribución de haplogrupos similar a la que caracteriza a la mayoría de las poblaciones mexicanas de referencia e inclusive a poblaciones de otras regiones de América. Esto implica una posible afinidad temporal y geográfica en los patrones de variación mitocondrial de estos grupos; no obstante, en la prueba de diferencias por pareja (ver más adelante), se observan diferencias significativas entre algunos grupos, diferencias que posiblemente estén relacionados con factores como la deriva genética y el efecto fundador que determinan divergencias genéticas entre las diferentes regiones, o bien con situaciones específicas de los yacimientos, lo que será discutido más adelante. Con la finalidad de examinar las relaciones entre las poblaciones de comparación, las frecuencias de haplogrupos de la tabla 4.15, se utilizaron para realizar un análisis de componentes principales (figura 4.8).

Los primeros dos componentes explican el 77.1% de la variabilidad. El componente principal 1 (PC1), determinado por la distribución del haplogrupo A, explica el 46.8% de la variabilidad, mientras que el componente principal 2 (PC2) determinado por la distribución del haplogrupo B explica el 30.3%.

La mayor uniformidad entre los distintos grupos es observada en todas las poblaciones mexicanas (incluidas las 3 series del Valle Central). Este grupo se localiza en la parte media entre los cuadrantes superior e inferior izquierdo y se caracteriza fundamentalmente por la distribución de frecuencia del haplogrupo A. Por otra parte, el PC2 localiza en el cuadrante inferior derecho, al grupo formado por dos subgrupos geográficamente distante: El primer grupo formado por las poblaciones de la Costa del Pacífico de Suramérica (PR.2, EC.2 y CH.1) incluidas Panamá (PN.2) y Brasil contemporáneo (BR.2), y el segundo grupo formado por las poblaciones del noroeste de Estados Unidos (US.2.1) y de las culturas Fremont (US4.1) y Anasazi (US5.1), la proximidad entre estos subgrupos se debe, principalmente, a la distribución del haplogrupo B.

Otras agrupaciones, localizada en el cuadrante superior derecho del gráfico, las conforman: el grupo de las series antiguas y contemporáneas Esquimo-aleutianas (AL.1, AL.2) y la serie antigua de Mongolia (MG.1) y el grupo formado por las series antiguas de Argentina (AR.1), Cuba (CB.1), República Dominicana (DR.1), Chile contemporáneo (CH.2), Sur de Siberia (SS.2) y la serie antigua de oeste de Nevada (US3.1). Este último grupo, curiosamente, no presenta ninguna afinidad geográfica entre ellas; no obstante, se caracterizan, genéticamente, por una mayor frecuencia del haplogrupo D.

Si consideramos exclusivamente al subconjunto de las poblaciones antiguas, los dos primeros componentes principales explican el 44.0% y el 31.4% de la variabilidad respectivamente (figura 4.9). Podemos observar que se mantiene la relativa uniformidad entre las series mexicanas localizadas en el cuadrante superior izquierdo del gráfico, donde la serie de la cultura Maya (MX2.1) es la más alejada, la serie de contacto (CNMX.1) y la Azteca (MX1.1) son las más relacionadas a pesar de que la serie Azteca pertenece al mismo yacimiento precontacto de este análisis (PRMX.1); estando ésta más alejada del grupo y quedando incluso dentro del cuadrante inferior, pero igualmente próxima a la serie post-contacto (PTMX.1); sin embargo, si se considera sólo el CP2, las series Aztecas de Tlatelolco (PRMX.1 y MX1.1) están muy relacionadas entre ellas y con las series CNMX.1 y PTMX.1. Por otra parte, las series de Brasil (BR.1) y Estados Unidos (US3.1) están más cerca de precontacto y post-contacto que de la serie contacto.

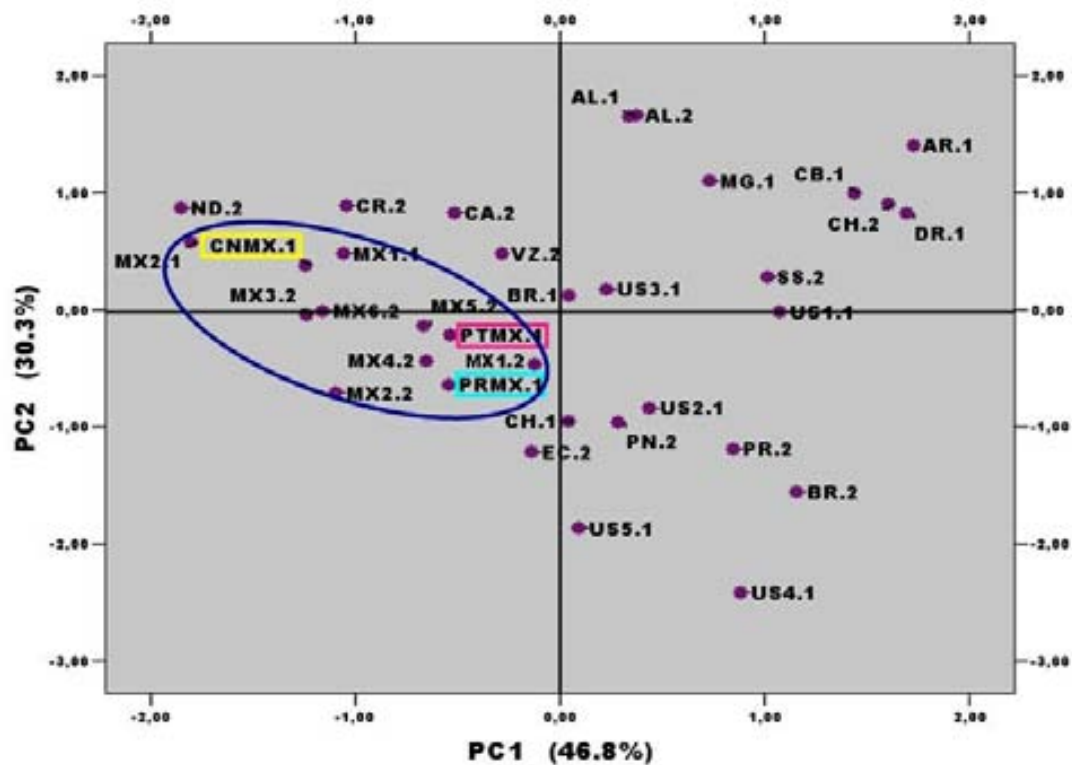


Figura 4.8. Gráfico de componentes principales de las frecuencias de haplogrupos mitocondriales para poblaciones antiguas y contemporáneas de comparación (tablas 3.7 y 3.8). El círculo azul delimita al subconjunto de las poblaciones mexicanas. Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.15.

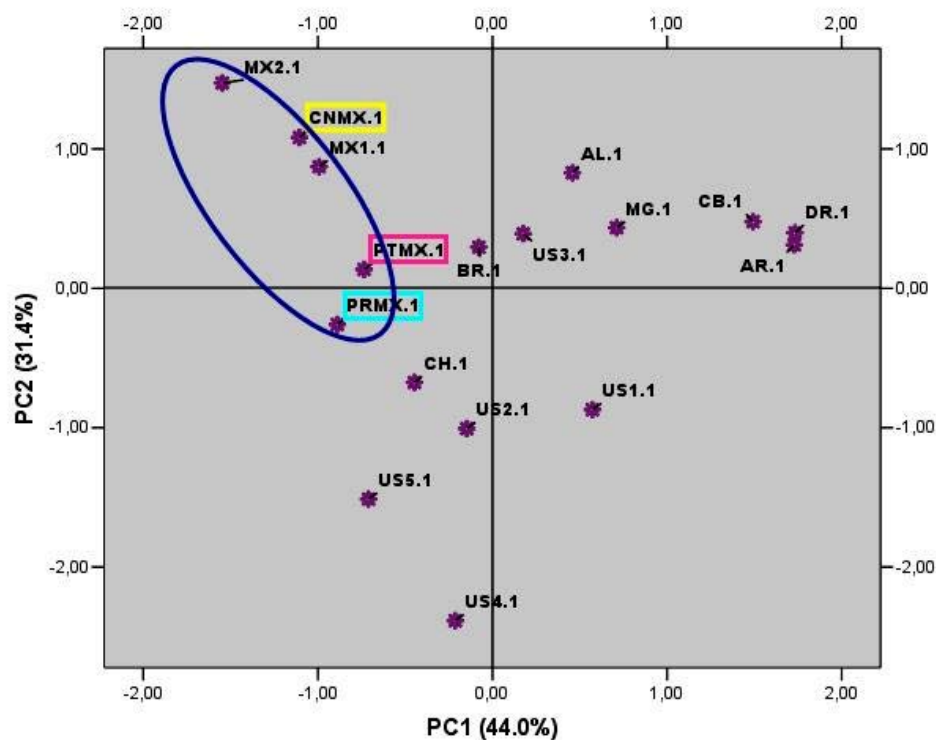


Figura 4.9. Gráfico de componentes principales (PC) de las frecuencias de haplogrupos mitocondriales para poblaciones antiguas de comparación (tabla 3.7). El círculo azul delimita al subconjunto de las poblaciones mexicanas. Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.15.

4.3.1.3. Prueba exacta de diferenciación poblacional.

Otro de los estadísticos utilizados para verificar si las poblaciones presentan una distribución de haplogrupos similar es la prueba exacta de diferenciación poblacional para los distintos pares de poblaciones, en nuestro caso, entre las tres series antiguas analizadas y las poblaciones de referencia, calculado según Rousset & Raymond (1995) y Goudet *et al.* (1996), que incorpora el procedimiento de cadena de Markov (tabla 4.17).

Entre las tres series antiguas, la distribución de frecuencias de haplogrupos de la serie contacto (CNMX.1) presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a la serie precontacto (PRMX.1), no así con post-contacto (PTMX.1). Mientras que, entre las series precontacto (PRMX.1) y post-contacto (PTMX.1) no existen diferencias estadísticamente significativas.

En lo que respecta a la serie precontacto (PRMX.1) con el resto de las poblaciones de comparación, la distribución de haplogrupos mitocondriales es similar a 5 de las poblaciones mexicanas, incluidas la serie Azteca antigua (MX1.1), localizada en el mismo yacimiento arqueológico de Tlatelolco de donde proviene también nuestra serie y de las contemporáneas del área centro-norte mexicano (MX1.2), de la indígena de la cultura Huasteca en el estado de Hidalgo (MX3.2), de Pachuca también del estado de Hidalgo (MX4.2) y de la contemporánea de la cultura Maya (MX5.2); por otra parte, también parece tener características en común con las series antiguas del noroeste de Norteamérica (US2.1) y de la cultura Anasazi (US5.1) que, contrariamente, están alejadas de la serie precontacto en el análisis de componentes principales.

Las poblaciones, anteriormente señaladas, presentan altas frecuencias de los haplogrupos A y B, que son los que determinan los dos primeros componentes principales en el análisis descrito en la sección (4.3.1.2); sin embargo, es de destacar que las series antiguas del noroeste de Norteamérica US2.1 y de la cultura Anasazi US5.1 tienen una mayor representación del haplogrupo B que el resto de las poblaciones mexicanas que no presentan diferencias estadísticamente significativas con la serie precontacto (PRMX.1).

Tabla 4.17.

Prueba exacta de diferenciación poblacional para la comparación de cada una de las series antiguas analizadas con las poblaciones descritas en las tablas 3.7 y 3.8.

	PRMX.1	CNMX.1	PTMX.1
PRMX.1	*		
CNMX.1	0.03835±0.0007	*	
PTMX.1	0.45212±0.0019	0.11620±0.0012	*
MG.1	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00001±0.0000
SS.2	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000
AL.1	0.00013±0.0000	0.00000±0.0000	0.00058±0.0001
AL.2	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000
ND.2	0.00002±0.0000	0.09884±0.0008	0.00014±0.0000
CA.2	0.00010±0.0000	0.02648±0.0006	0.00043±0.0001
US1.1	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00002±0.0000
US2.1	0.07781±0.0011	0.00000±0.0000	0.00353±0.0002
US3.1	0.00045±0.0001	0.00963±0.0004	0.00753±0.0005
US4.1	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000
US5.1	0.06240±0.0009	0.00006±0.0000	0.07022±0.0011
MX1.1	0.23306±0.0014	0.23788±0.0014	0.34801±0.0016
MX2.1	0.00183±0.0001	0.46132±0.0021	0.03550±0.0007
MX1.2	0.07602±0.0012	0.01005±0.0004	0.00213±0.0002
Mx2.2	0.04186±0.0007	0.00360±0.0003	0.00186±0.0002
MX3.2	0.23824±0.0021	0.12253±0.0016	0.04417±0.0010
MX4.2	0.28645±0.0022	0.21797±0.0021	0.13484±0.0016
MX5.2	0.58082±0.0019	0.50345±0.0018	0.90701±0.0007
MX6.2	0.02267±0.0005	0.55765±0.0018	0.03083±0.0006
CB.1	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00005±0.0000
DR.1	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000
CR.2	0.00557±0.0002	0.00756±0.0002	0.01230±0.0004
PN.2	0.00204±0.0002	0.00003±0.0000	0.00026±0.0000
VZ.2	0.00000±0.0000	0.00551±0.0003	0.00000±0.0000
BR.1	0.00055±0.0001	0.00170±0.0001	0.05748±0.0008
BR.2	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000
EC.2	0.00030±0.0001	0.00000±0.0000	0.00449±0.0002
PR.2	0.00688±0.0003	0.00000±0.0000	0.00146±0.0001
CH.1	0.00891±0.0003	0.00011±0.0000	0.14935±0.0017
CH.2	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000
AR.1	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000	0.00000±0.0000

p±de: resultados de la prueba exacta de diferenciación poblacional ± desviación estándar.
Se destacan los casos en que p> 0.05.

Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.15.

Los resultados de esta prueba entre las parejas formadas por la serie contacto (CNMX.1) y las demás poblaciones del análisis, demuestran que la distribución de haplogrupos mitocondriales de la serie antigua se diferencia de la mayoría de las poblaciones de comparación, con la excepción de 6 de las 8 poblaciones mexicanas, entre ellas: los mayas contemporáneos (MX5.2), los Mixteco-Zapotecas (MX6.2) y la serie antigua Azteca (MX1.1). Además, la población indígena de la comunidad de Huautla de la cultura Huasteca (MX3.2), localizados en la región del estado de Hidalgo y la población del municipio Pachuca, capital del mismo estado de Hidalgo (MX4.2), que fue habitado por varias civilizaciones indígenas, especialmente la Azteca. Estas dos últimas poblaciones están localizadas en la región geográfica de donde proviene la muestra de Los Olmos, sitio arqueológico de nuestra serie contacto.

Finalmente, podemos observar que la distribución de haplogrupos de la serie post-contacto (PTMX.1) tiene semejanzas con sus similares de la serie antigua Azteca (MX1.1), y las contemporáneas mexicanas de las poblaciones indígenas de la cultura huasteca (MX4.2) y Maya (MX5.2). También, parece tener cierta afinidad con las series antiguas de la cultura Anasazi en Estado Unidos (US5.1), y las del sur del continente: la amazónica de Brasil (BR.1) y la chilena del Valle de Azapa (CH.1).

En definitiva, la distribución de frecuencias de haplogrupos de las 3 series antiguas del Valle Central de México, presentan semejanzas con todas las poblaciones mexicanas, con la excepción del grupo contemporáneo Mazahua (MX2.2). No obstante, en el análisis de componentes principales, esta muestra se localiza próxima al resto de las poblaciones mexicanas.

La muestra contemporánea de Mazahua (MX2.2) pertenece a varias comunidades del municipio Ixtapan del Oro, ubicado geográficamente al suroeste del estado de México, junto al estado de Michoacán (comunicación personal, González-Martín). Según datos históricos, es un pueblo de origen poco claro, parte de sus raíces proviene de antiguos asentamientos Tolteca-Chichimecas que después de la decadencia de Tula, fueron conquistados por los chichimecas de Xolotl (siglo XII), con quienes se fusionaron, conservando la denominación de Mazahua, por lo tanto cabe la posibilidad de que no hayan existido relaciones culturales entre estos grupos y los aztecas del Valle Central, lo que se refleja en diferencias a nivel mitocondrial.

4.3.1.4. Distancia genética.

En la tabla 4.18, se muestra la matriz diagonal con los valores de las distancias genéticas de Reynolds (Reynolds *et al.* 1983), calculadas en base en las frecuencias de haplogrupos de las 3 series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación descritas en las tabla 3.7 y 3.8. En general y en concordancia con los resultados del análisis de componentes principales y de la prueba exacta de diferenciación poblacional, las poblaciones mexicanas presentan entre sí, distancias genéticas menores e inclusive distancias nulas, como se observa ente las series precontacto y post-contacto, y entre ambas con los grupos contemporáneos de Pachuca (estado de Hidalgo) (MX4.2) y de la cultura Maya (MX5.2). Una situación similar se presenta entre la serie del contacto con la serie antigua Azteca (MX1.1) y con la muestra proveniente de las culturas Mixteco-Zapotecas (MX6.2).

Entre las tres series analizadas y el resto de las poblaciones podemos apreciar que tanto precontacto como post-contacto exhiben distancias menores con poblaciones del sur del continente: la contemporánea de Ecuador (EC.2) y la antigua chilena (CH.1). De la misma manera, la serie contacto, además de sus relaciones con las poblaciones del subconjunto mexicano, presenta menores distancias con las poblaciones más al norte del continente americano, con la población Na-Denes (ND.2) y con las tribus indígenas de Canadá (CA.2).

Con la finalidad de mostrar las distancias genéticas, determinadas con el método de Reynolds entre las poblaciones de comparación (tabla 4.18) en una representación bidimensional, se utilizó el algoritmo de Escalamiento Multidimensional (MSD) graficado en la figura 4.10. En este gráfico se observa al subconjunto de las poblaciones mexicanas, como un grupo homogéneo, ubicado entre los cuadrantes superior e inferior derecho, y definido principalmente por la dimensión 1; sin embargo, dentro de este grupo homogéneo se destaca, que la serie antigua contacto está alejada de las series precontacto y post-contacto; y más próxima a la serie antigua Azteca (MX1.1). Muy cercano al subconjunto mexicano encontramos, en el cuadrante superior, a Costa Rica (CR.2), y en el inferior a la serie de Chile antiguo (CH.1).

Tabla 4.18.

Matriz diagonal de las distancias genéticas de Reynolds, construida a partir de las frecuencias de haplogrupos entre las series antiguas analizadas y las poblaciones descritas en las tablas 3.7 y 3.8.

	PRMX.1	CNMX.1	PTMX.1	MG.1	SS.2	AL.1	AL.2	ND.2	CA.2	US1.1	US2.1	US3.1	US4.1	US5.1	MX1.1	MX2.1	MX1.2	MX2.2	MX3.2	MX4.2	MX5.2
PRMX.1	0.0000																				
CNMX.1	0.0855	0.0000																			
PTMX.1	0.0000	0.0412	0.0000																		
MG.1	0.1953	0.2897	0.1482	0.0000																	
SS.2	0.1830	0.2823	0.1474	0.0589	0.0000																
AL.1	0.2875	0.4078	0.2288	0.0285	0.2055	0.0000															
AL.2	0.3777	0.4592	0.3249	0.0741	0.2984	0.0000	0.0000														
ND.2	0.2919	0.0422	0.2123	0.4993	0.4909	0.6912	0.5781	0.0000													
CA.2	0.0794	0.0407	0.0323	0.1089	0.1687	0.1395	0.2004	0.1301	0.0000												
US1.1	0.2261	0.4911	0.2267	0.0893	0.1592	0.1332	0.1809	0.7757	0.2677	0.0000											
US2.1	0.0479	0.2749	0.0796	0.1419	0.1303	0.2305	0.3129	0.5061	0.1773	0.0664	0.0000										
US3.1	0.1255	0.1366	0.0792	0.1540	0.0815	0.2994	0.3845	0.3195	0.0961	0.2996	0.1711	0.0000									
US4.1	0.2658	0.6621	0.3209	0.4558	0.2963	0.7319	0.7552	1.0859	0.4928	0.3021	0.1096	0.3568	0.0000								
US5.1	0.0582	0.3404	0.1001	0.3161	0.2121	0.5111	0.6058	0.7102	0.2806	0.2486	0.0370	0.2056	0.0369	0.0000							
MX1.1	0.0397	0.0000	0.0107	0.1919	0.2436	0.2366	0.2987	0.0821	0.0078	0.3420	0.1888	0.1597	0.5884	0.2849	0.0000						
MX2.1	0.2029	0.0050	0.1341	0.4315	0.4201	0.6124	0.5705	0.0000	0.1086	0.6758	0.4201	0.2631	0.9255	0.5461	0.0488	0.0000					
MX1.2	0.0181	0.0902	0.0157	0.1753	0.1240	0.2849	0.3535	0.2487	0.0837	0.2374	0.0773	0.0378	0.2278	0.0802	0.0901	0.1990	0.0000				
MX2.2	0.0028	0.0650	0.0258	0.3475	0.3190	0.4458	0.5025	0.2044	0.1255	0.4088	0.1666	0.2020	0.4115	0.1511	0.0501	0.1364	0.0705	0.0000			
MX3.2	0.0388	0.0093	0.0271	0.3184	0.3337	0.3758	0.4255	0.0848	0.0705	0.4359	0.2285	0.2024	0.5460	0.2669	0.0000	0.0454	0.0981	0.0154	0.0000		
MX4.2	0.0000	0.0367	0.0000	0.2267	0.1972	0.3190	0.3995	0.1791	0.0669	0.3054	0.1149	0.0871	0.3171	0.1094	0.0363	0.1227	0.0130	0.0141	0.0304	0.0000	
MX5.2	0.0000	0.0091	0.0000	0.1715	0.1611	0.2673	0.3610	0.1763	0.0235	0.2807	0.1066	0.0673	0.3749	0.1294	0.0000	0.1041	0.0075	0.0134	0.0089	0.0000	0.0000
MX6.2	0.0489	0.0000	0.0243	0.3022	0.2777	0.4180	0.4795	0.0887	0.0594	0.4627	0.2347	0.1306	0.5575	0.2623	0.0106	0.0370	0.0644	0.0274	0.0023	0.0126	0.0000
CB.1	0.3763	0.4844	0.2963	0.1294	0.0561	0.3756	0.4374	0.9303	0.2571	0.3322	0.2915	0.0828	0.6130	0.4583	0.4523	0.7851	0.2087	0.5659	0.5546	0.3370	0.3082
DR.1	0.5562	0.6728	0.4664	0.2979	0.1422	0.6587	0.6545	1.1419	0.4059	0.5299	0.4378	0.1536	0.7537	0.6259	0.6771	1.0072	0.3020	0.7225	0.7161	0.4615	0.4802
CR.2	0.1021	0.0512	0.0597	0.1872	0.2787	0.1867	0.2339	0.1101	0.0188	0.3520	0.2369	0.2146	0.6857	0.3859	0.0000	0.0941	0.1508	0.1258	0.0432	0.1003	0.0548
PN.2	0.0724	0.2065	0.0804	0.2326	0.1184	0.4022	0.5014	0.4486	0.1822	0.2722	0.0850	0.0507	0.1686	0.0569	0.2123	0.3609	0.0148	0.1554	0.2201	0.0688	0.0767
VZ.2	0.2110	0.1218	0.1415	0.2796	0.1868	0.4707	0.5381	0.3248	0.1221	0.5157	0.3216	0.0222	0.6058	0.3726	0.1988	0.2591	0.0872	0.2557	0.2272	0.1216	0.1061
BR.1	0.1123	0.1547	0.0379	0.1283	0.0835	0.2677	0.3880	0.4131	0.0758	0.2653	0.1507	0.0390	0.3862	0.1811	0.1396	0.2905	0.0702	0.2097	0.2027	0.0937	0.0558
BR.2	0.2243	0.4914	0.2627	0.3248	0.1779	0.5234	0.5834	0.7504	0.3886	0.2367	0.0924	0.2140	0.0545	0.0802	0.4560	0.6706	0.1515	0.3624	0.4596	0.2591	0.2862
EC.2	0.0425	0.1934	0.0364	0.2500	0.1868	0.3617	0.4522	0.3719	0.1835	0.2312	0.0716	0.1437	0.1389	0.0138	0.1665	0.2914	0.0611	0.1007	0.1606	0.0651	0.0638
PR.2	0.1052	0.3800	0.1382	0.1876	0.1171	0.3459	0.4407	0.7143	0.2587	0.1027	0.0000	0.1693	0.0516	0.0282	0.3024	0.5842	0.0911	0.2554	0.3424	0.1649	0.1672
CH.1	0.0425	0.1799	0.0242	0.1941	0.1311	0.3153	0.4261	0.3884	0.1522	0.2013	0.0607	0.0961	0.1499	0.0253	0.1530	0.2935	0.0409	0.1169	0.1680	0.0579	0.0493
CH.2	0.3763	0.4863	0.3302	0.0889	0.0831	0.2311	0.2693	0.6818	0.2843	0.1908	0.2496	0.1775	0.4758	0.4297	0.4309	0.6470	0.2559	0.5300	0.5211	0.3749	0.3488
AR.1	0.4773	0.6148	0.4095	0.0823	0.1246	0.2131	0.2440	0.8983	0.3225	0.2088	0.3159	0.2551	0.6526	0.5726	0.5242	0.8258	0.3325	0.6604	0.6335	0.4618	0.4440

Se destacan las poblaciones con menores distancias genéticas con respecto a las tres series antiguas del Valle Central de México.

Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.15.

Continuación tabla 4.18.

	MX6.2	CB.1	DR.1	CR.2	PN.2	VZ.2	BR.1	BR.2	EC.2	PR.2	CH.1	CH.2	AR.1
PRMX.1													
CNMX.1													
PTMX.1													
MG.1													
SS.2													
AL.1													
AL.2													
ND.2													
CA.2													
US1.1													
US2.1													
US3.1													
US4.1													
US5.1													
MX1.1													
MX2.1													
MX1.2													
MX2.2													
MX3.2													
MX4.2													
MX5.2													
MX6.2	*												
CB.1	0.4740	*											
DR.1	0.6388	0.0000	*										
CR.2	0.0766	0.5031	0.7355	*									
PN.2	0.1637	0.2046	0.2839	0.2948	*								
VZ.2	0.1281	0.2026	0.2832	0.2685	0.1334	*							
BR.1	0.1506	0.1662	0.3071	0.1945	0.1050	0.1147	*						
BR.2	0.4289	0.3012	0.3704	0.5314	0.0758	0.3883	0.2791	*					
EC.2	0.1509	0.3483	0.4554	0.2341	0.0688	0.2426	0.0803	0.1567	*				
PR.2	0.3256	0.2697	0.4088	0.3735	0.0579	0.3503	0.1802	0.0124	0.0869	*			
CH.1	0.1447	0.2653	0.3793	0.2190	0.0455	0.1977	0.0391	0.1370	0.0000	0.0688	*		
CH.2	0.4839	0.0149	0.1120	0.4408	0.2623	0.3205	0.2448	0.2731	0.3713	0.2298	0.3054	*	
AR.1	0.6116	0.0752	0.2186	0.5204	0.3736	0.4430	0.3178	0.3942	0.4447	0.3305	0.3799	0.0109	*

Se destacan las poblaciones con menores distancias genéticas con respecto a las tres series antiguas del Valle Central de México. Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.15.

Asimismo, se observan dos agrupaciones dentro del cuadrante superior izquierdo: un grupo formado por las muestras antiguas y contemporáneas Esquimo-aleutianas (AL.1 y AL.2) y las asiáticas (MG.1 y SS.2) definido por la dimensión 1, e inclusive las poblaciones contemporáneas de Brasil (BR.2) y Perú (PR.2) y la serie antigua de la cultura Fremont (US4.1); sin embargo, al evaluar la dimensión 2 todas estas poblaciones se encuentran significativamente más alejadas. El otro grupo está formado por las series antiguas de Cuba (CB.1), República Dominicana (DR.1) y Argentina (AR.1) y la contemporánea de Chile (CH.2) definido por ambas dimensiones; no obstante, se encuentran más cercanas entre sí en la dimensión 2.

Las poblaciones más divergentes, en relación al resto de las poblaciones de referencia, son los Tainos de República Dominicana (DR.1) y los Na-Denes contemporáneos (ND.2) en la dimensión 1 y la serie antigua de la cultura Fremont, Estados Unidos (US4.1) y contemporánea Esquimo-aleutiana (AL.2) en la dimensión 2, estas cuatro poblaciones representan los extremos de los gradientes definidos por las dos dimensiones representadas.

Con la intención de valorar las relaciones filogenéticas en el subconjunto de las series antiguas analizadas, se utilizó una matriz de distancia genética de Reynolds (no mostrada) para construir un árbol filogenético con el algoritmo Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), este método se caracteriza por la construcción de árboles mediante sucesivos agrupamientos de alineaciones, tomando en cuenta las longitudes de las ramas. Las dos principales características de este método son que los resultados dan un árbol sin raíz y que no supone un reloj evolutivo (figura 4.11).

Las series mexicanas se agrupan en una misma rama cuyo extremo más distante lo conforma la serie del Clásico/Post-Clásico Maya (MX2.1), las series antiguas del Valle Central mantienen el mismo comportamiento que en otros análisis, las dos series precontacto y post-contacto muy cerca y la serie contacto que se aleja, en este caso, hacia el extremo de la rama; no obstante, queda claro, que todas las series mexicanas están agrupadas en una misma rama, y que esta rama se distancia del resto de las series consideradas en el análisis.

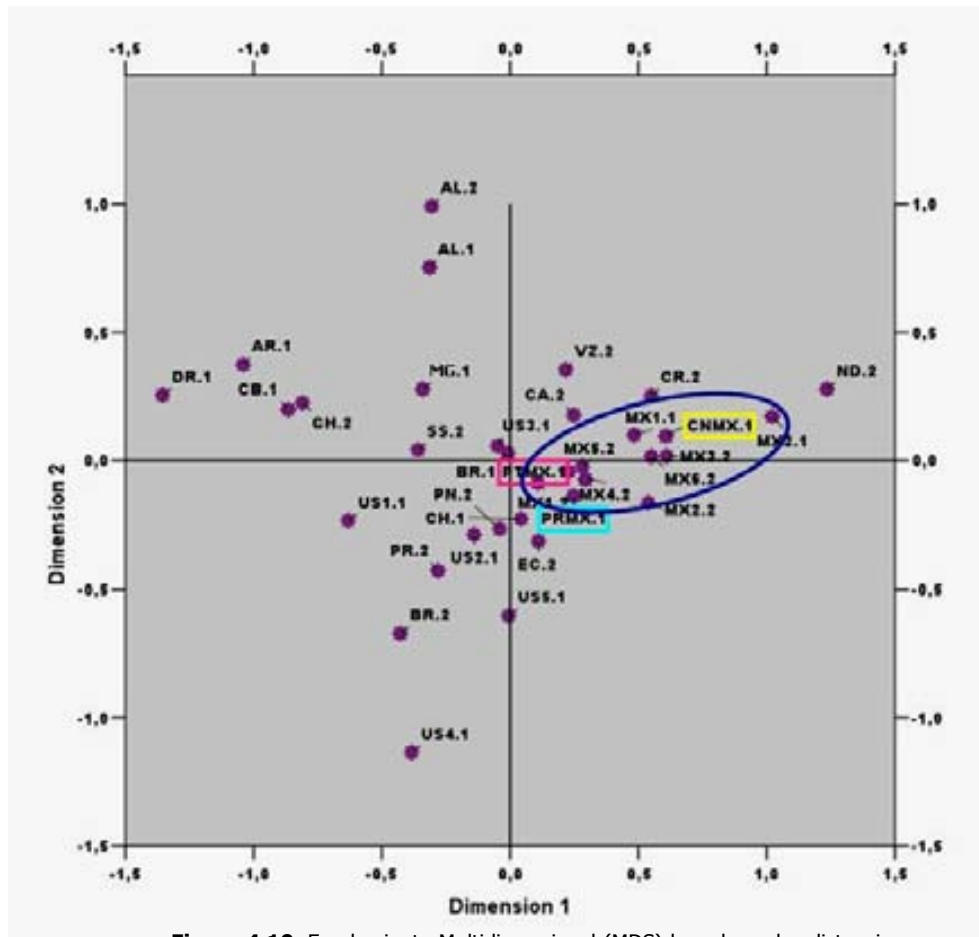


Figura 4.10. Escalamiento Multidimensional (MDS) basado en las distancias genéticas de Reynolds para las poblaciones comparación (tabla 4.18). El círculo azul delimita al subconjunto de las poblaciones mexicanas. Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.15.

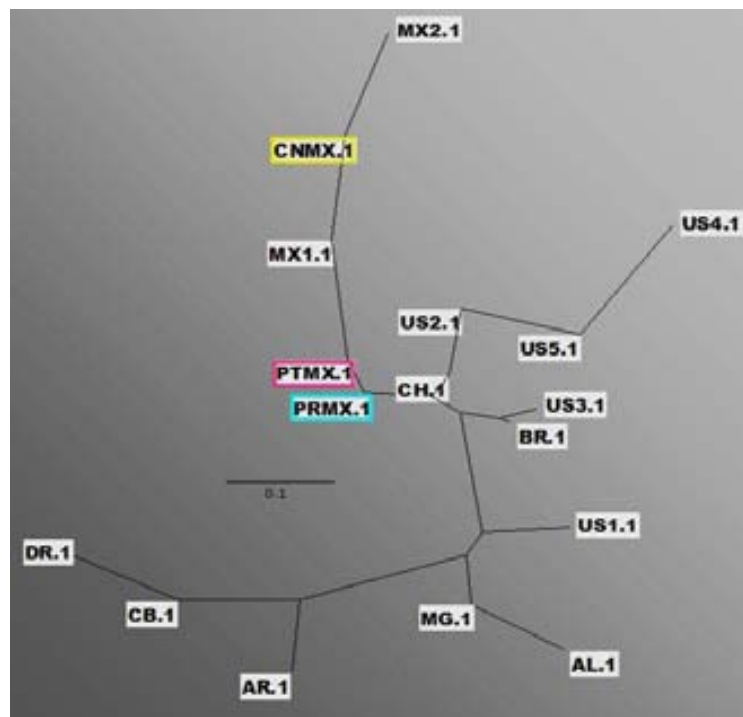


Figura 4.11. Árbol filogenético construido a partir de las distancias genéticas de Reynolds, estimadas sobre las frecuencias de haplogrupos, utilizando el método Neighbor-Joining entre las series antiguas de comparación. Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.15.

La porción inferior del árbol se divide en dos grandes ramas que agrupan por un lado a las series: aleutiana (AL.1), del oeste de Nevada, Estados Unidos (US1.1) y la asiática de Mongolia (MG.1) y por el otro a las series Antillanas (CB.1 y DR.1) y Argentina (AR.1). Finalmente, en la parte central se extiende una rama con las series de Norteamérica (US2.1, US5.1, US4.1) unida al árbol por Chile (CH.1) y otra rama con Brasil (BR.1) y la serie de la cultura Oneota (US3.1).

Los resultados de los estadísticos, utilizando la distribución de frecuencias de haplogrupos, nos indican que entre las series antiguas analizadas en este estudio existen dos grupos, uno formado por precontacto/post-contacto y otro formado por la serie contacto. Es posible, que este modelo sea el reflejo de diversos procesos que alteren la composición genética de una población, como pudiera ser en el caso de la serie contacto.

Son pocas las referencias históricas sobre el poblado de Tetetzontlilco (hoy Comunidad de Los Olmos) y los únicos datos indican que fue un asentamiento colonial de muy pocos habitantes, que desapareció, aproximadamente en el año 1600 debido posiblemente, a la muerte de la mayoría de sus habitantes, durante una de las pandemias que asolaron la población indígena de la época. Estas características sugieren un alto grado de endogamia y de consanguinidad que se reflejan en los análisis con frecuencias de haplogrupo; no obstante, los análisis con secuencias de la región HVI nos aportan resultados más precisos, que serán descritos en la sección 4.3.2.

4.3.2. Secuencias de la Región HVI.

Los análisis de las secuencias nucleotídicas de las 3 series antiguas mesoamericanas (precontacto, contacto y post-contacto) y las 20 poblaciones de comparación (12 contemporáneas y 8 antiguas) se han realizado sobre un fragmento de 162 pb de la región HVI del mtDNA, entre las posiciones 16209-16370. La mayoría de las mutaciones diagnósticas para los haplogrupos fundadores americanos, se encuentran dentro del fragmento que hemos analizado; a pesar de esto, nuestro

análisis puede presentar limitaciones debido a la ausencia de sitios relevantes, situación que debe ser considerada en la interpretación y discusión de los resultados.

4.3.2.1. Índices de Diversidad.

Para obtener información sobre la diversidad dentro de cada una de las poblaciones de referencia, se tomaron como base las secuencias de la región HVI, se calcularon los siguientes estimadores: 1. Número de haplotipos diferentes (K); 2. Número de sitios polimórficos (S); 3. Número de sitios con transiciones (trs) y con transversiones (trv); 4. Número medio de diferencias por parejas ($\theta\pi$); 5. Diversidad genética o haplotípica ($\hat{H}$) y 6. Diversidad nucleotídica (π) con sus respectivas desviaciones estándares. Todos los valores aparecen expuestos en la tabla 4.19. En la serie antigua del noroeste de Estados Unidos (US2.1) sólo se utilizaron 147 nucleótidos ya que en el trabajo original los autores secuenciaron hasta la posición 16356 (Malhi *et al.* 2004).

La diversidad del número de haplotipos (secuencias) diferentes (K) está determinada, fundamentalmente, por el tamaño de la muestra (n) por lo que a mayor número de individuos analizados mayor diversidad; en este sentido, esta medida no es muy explicativa cuando se comparan poblaciones con n s diversas. Sin embargo, en este análisis se observa que las poblaciones contemporáneas de Brasil y Ecuador tienen un tamaño muestral elevado pero un bajo número de haplotipos diferentes (BR.2 tiene 6 haplotipos diferentes para una muestra de 155 individuos y EC.2 tiene 7 haplotipos diferentes para una muestra de 94 individuos); en casos como éstos, el parámetro K podría ser un indicativo de endogamia.

Tabla 4.19.
Índices de diversidad para las series antiguas analizadas y las poblaciones de referencia.

Poblaciones y series	Código	n^a	K^b (K/n)	S^c	trs/trv ^d	$H^e \pm de$	$\pi\theta^f \pm de$	$\pi_n^g \pm de$
Chile (Varios de Valles desérticos)	CH.1	26	24 (92.3)	25	23/3	0.9938±0.0126	5.7027±2.8232	0.0352±0.0194
Estados Unidos (Wishram)	US2.1	30	21 (70.0)	22	21/1	0.9701±0.0171	4.7428± 2.3861	0.0322± 0.0180
Perú (Ancash)	PR.2	33	22 (66.7)	26	26/0	0.9659±0.0178	5.0789±2.5283	0.0313±0.0173
Sur de Siberia (Tuvinians & Buryats)	SS.2	71	38 (53.5)	35	33/4	0.9610±0.0122	4.4206±2.2070	0.0272±0.0151
Mongolia (Xiongnus)	MG.1	41	20 (48.8)	22	21/2	0.9500±0.0158	4.1899±2.1247	0.0258±0.0145
México (Post-contacto)	PTMX.1	26	16 (61.5)	18	18/0	0.9354±0.0335	4.4404±2.2621	0.0274±0.0155
México (Precontacto)	PRMX.1	27	16 (59.3)	21	20/1	0.9316±0.0301	5.1241±2.5631	0.0316±0.0176
Brasil (Indígenas del Amazona)	BR.1	18	11 (61.1)	15	15/0	0.9281±0.0401	3.8435±2.0260	0.0237±0.0139
Cuba (Siboneyes)	CB.1	15	9 (60.0)	8	8/0	0.9238±0.0440	3.0546±1.6835	0.0188±0.0116
México (Contacto)	CNMX.1	26	17 (65.3)	21	21/0	0.9077±0.0501	4.2387±2.1723	0.0261±0.0149
República Dominicana (Taino)	DR.1	19	10 (52.6)	10	9/1	0.9064±0.0405	2.7559±1.5266	0.0170± 0.0105
Canadá (Aborígenes Amerindios)	CA.2	102	25 (25.5)	23	23/0	0.8996±0.0196	4.3547±2.1705	0.0268± 0.0148
México (Mestizos)	MX1.2	70	30 (42.9)	33	33/1	0.8977±0.0274	5.4354±2.6492	0.0337±0.0182
Chile (Mapuches, Pehuenches & Yaghan)	CH.2	73	20 (27.4)	21	21/0	0.8881±0.0259	5.0143±2.4648	0.0309±0.0168
Estados Unidos (Oneota)	US3.1	51	16 (32.0)	18	17/1	0.8745±0.0274	4.2948±2.1621	0.0265±0.0148
Argentina (Fueguinos & Patagones)	AR.1	19	10 (52.6)	12	12/0	0.8596±0.0696	3.1968±1.7275	0.0197±0.0119
Panamá (Emberá-Wounnan)	PN.2	75	19 (25.3)	20	9/1	0.8512±0.0257	5.2088±2.5486	0.0321±0.0174
Venezuela (Guahibos)	VZ.2	59	11 (18.6)	9	9/0	0.8422±0.0215	4.5139±2.2531	0.0278±0.0154
Costa Rica (Huetar)	CR.2	30	8 (26.7)	8	8/0	0.7034±0.0721	2.6533±1.4554	0.0163±0.0099
Ecuador (Cayapas)	EC.2	94	7 (7.4)	12	12/0	0.6655±0.0387	4.1367±2.0771	0.0255±0.0142
Brasil (Yanomamös)	BR.2	155	6 (3.8)	12	12/0	0.6566±0.0257	3.8814±1.9591	0.0239±0.0133
Alaska (Aleutianos)	AL.2	163	16 (9.82)	13	12/1	0.6486±0.0368	2.4423±1.3297	0.0150±0.0090
Canadá (Na-Denes)	ND.2	40	5 (12.5)	9	9/0	0.6000±0.0643	2.0301±1.1653	0.0125±0.0079

a: Tamaño de la muestra

b: Número de haplotipos diferentes, (porcentaje del tamaño de la muestra).

c: Número de sitios polimórficos.

d: Transiciones/Tranversiones.

e: Diversidad genética ± desviación estándar.

f: Número medio de diferencias por parejas ± desviación estándar.

g: Diversidad nucleotídica ± desviación estándar.

Se destacan las series antiguas del Valle Central de México.

En cuanto a la diversidad del número de sitios polimórficos (S), este parámetro lo determina además del tamaño de la muestra, la longitud y localización del fragmento analizado, en nuestro caso es un fragmento de 162 pb entre las posiciones 16209-16370 que en términos generales, puede ser suficientemente informativo para determinar variabilidad entre secuencias muy cercanas. La serie que presenta el mayor número de sitios polimórficos pertenece a la población contemporánea del Sur de Siberia (SS.2) con 35 sitios polimórficos, y el menor valor lo comparten la serie antigua de Cuba y la contemporánea de Costa Rica (CB.1 y CR.2) con 8 sitios polimórficos cada una.

Para la diversidad genética o haplotípica ($\hat{H}$), en este caso definida como la probabilidad de que dos haplotipos de una muestra elegidos al azar sean diferentes, se observa un rango que va desde 0.6000 ± 0.0643 en la población Na-Dene (ND.2) a 0.9938 ± 0.0126 en la serie antigua de Chile (CH.1). En relación a los valores de diversidad haplotípica de las tres series antiguas analizadas en este trabajo, éstos se hallan entre los más altos, como la mayoría de las series antiguas de referencia, siendo la serie contacto la que exhibe las medidas más bajas de las tres series (CNMX.1- 0.9077 ± 0.0501); por otra parte, precontacto y post-contacto muestran valores muy similares (PRMX.1- 0.9316 ± 0.0301 y PTMX.01- 0.9354 ± 0.0335).

Finalmente, en la tabla 4.19 se presentan los valores del número medio de diferencias por parejas de secuencias ($\theta\pi$), estimados con el método de Tamura-Nei (parámetro $\alpha = 0.47$) y del índice de diversidad nucleotídica (π) que mide la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos en un grupo de secuencias sean diferentes; asimismo, el valor del número medio de diferencias por parejas es proporcional a la diversidad nucleotídica. En las series antiguas del Valle Central de México, la serie contacto presenta los menores valores (π : 4.2387 ± 2.1723 y $\theta\pi$: 0.0261 ± 0.0149), seguida de la serie post-contacto (π : 4.4404 ± 2.2621 y $\theta\pi$: 0.0274 ± 0.0155) y los valores más altos los presenta la serie precontacto (π : 5.1241 ± 2.5631 y $\theta\pi$: 0.0316 ± 0.0176). En el conjunto de las poblaciones de referencia, la población Na-Dene exhibe los valores más bajos (π : 2.0301 ± 1.1653 y $\theta\pi$: 0.0125 ± 0.0079) y la serie antigua de Chile los más altos (π : 5.7027 ± 2.8232 y $\theta\pi$: 0.0352 ± 0.0194).

4.3.2.2. Linajes propios.

Los linajes propios determinan la posibilidad de que una secuencia se encuentre exclusivamente en una sola población, aunque esta condición depende en gran medida del número de poblaciones muestreadas y del tamaño muestral de cada una de ellas. En el análisis entre las secuencias obtenidas en las tres series antiguas del Valle Central mexicano (sección 4.2.3), se observaron 29 secuencias únicas, 7 que pertenecen a la serie precontacto, 12 a contacto y 10 a la serie post-contacto. No obstante, cuando se compararon las secuencias antiguas mexicanas con las secuencias de las poblaciones de referencia, 6 de los linajes que eran únicos para la serie contacto están descritos en algunas de las poblaciones de referencia (Cn03A, Cn05A, Cn14A, Cn15A, Cn20B y Cn22C); y de igual manera, 5 linajes únicos para la serie post-contacto (Pt04A, Pt11A, Pt19B, Pt20B y Pt24D) se encuentran representados dentro del resto de las poblaciones de comparación.

En cuanto a los 7 haplotipos únicos observados en la serie precontacto, contrariamente a lo sucedido en las otras dos series, no se han encontrado en ninguna de las poblaciones de comparación y posiblemente se trate de secuencias antiguas que han desaparecido a través del tiempo, ya que esta serie data de la época prehispánica.

En la tabla 4.20, se observa que la serie antigua chilena (CH.1) presenta un excesivo número de linajes propios (0.73) si lo comparamos con el resto de las poblaciones, esto posiblemente se deba a que la muestra pertenece a una población prehistórica localizada en un área geográficamente limitada, cuyos linajes pudieron perderse en el tiempo, o sencillamente se trate de un artefacto debido al daño molecular inherente a la antigüedad de los restos esqueléticos (aproximadamente 4000 años ante del presente); no obstante, también es importante destacar que la mayoría de las series antiguas exhiben los mayores niveles de linajes únicos. Por otra parte, las poblaciones que presentan los valores más bajos son: el grupo lingüístico Na-Dene (ND.2) y las poblaciones de Suramérica de Brasil (BR.2) y Ecuador (EC.2) con un 0.03 cada una.

Las series antiguas del Valle Central de México se posicionan en los lugares intermedios; la serie precontacto exhibe los valores más altos con 0.27, seguida de contacto con 0.23 y post-contacto con 0.15. El valor promedio entre todas las poblaciones es de 0.22, por lo que las series mexicanas están entre las series antiguas con menos linajes propios, lo que supone un mínimo de posibilidad de mutaciones espontáneas producidas por daño molecular.

Tabla 4.20
Haplotipos propios.

Poblaciones y series	Código	<i>n</i>	Haplotipos propios	Porcentaje
Mongolia (Xiongnus)	MG.1	41	6	0.15
Sur de Siberia (Tuvinians & Buryats)	SS.2	71	24	0.34
Alaska (Aleutianos)	AL.2	163	11	0.07
Canadá (Na-Denes)	ND.2	40	1	0.03
Canadá (Aborígenes Amerindios)	CA.2	102	11	0.11
Estados Unidos (Wishram)	US2.1	30	13	0.43
Estados Unidos (Oneota)	US3.1	52	7	0.13
México (Precontacto)	PRMX.1	27	7	0.26
México (Contacto)	CNMX.1	26	6	0.23
México (Post-contacto)	PTMX.1	26	4	0.15
México (Mestizos)	MX2.1	70	24	0.34
Cuba (Siboneyes)	CB.1	15	2	0.13
República Dominicana (Taino)	DR.1	19	5	0.26
Costa Rica (Huetar)	CR.2	30	2	0.07
Panamá (Emberá-Wounnan)	PN.2	75	12	0.16
Venezuela (Guahibos)	VZ.2	59	4	0.07
Brasil (Indígenas del Amazona)	BR.1	18	7	0.39
Brasil (Yanomamös)	BR.2	155	4	0.03
Ecuador (Cayapas)	EC.2	94	3	0.03
Perú (Ancash)	PR.2	33	15	0.45
Chile (Varios del Valles Desérticos)	CH.1	26	19	0.73
Chile (Mapuche, Pehuenche & Yaghan)	CH.2	73	10	0.14
Argentina (Fueguinos & Patagones)	AR.1	19	5	0.26

Se destacan los valores de linajes propios más altos y más bajos.

4.3.3. Reconstrucciones filogenéticas.

4.3.3.1. Distancias genéticas.

En la tabla 4.21, se muestra la matriz diagonal con los valores de las distancias genéticas basadas en la transformación de Reynolds del estadístico F_{ST} (Reynolds *et al.* 1983), calculados por parejas de poblaciones a partir de las secuencias de un fragmento de 162 pb de la región HVI, para las 3 series antiguas analizadas y las poblaciones de comparación descritas en las tabla 3.7 y 3.8.

El patrón de distancias entre las tres series antiguas del Valle Central de México es similar al presentado utilizando frecuencias de haplogrupos. Las series precontacto/post-contacto exhiben distancia nula, y entre precontacto y contacto se observa mayor distancia (0.296), quedando la distancia genética entre contacto y post-contacto en una posición intermedia, con un valor estimado de 0.0148. En un contexto general, la población Amerindia de Canadá es la que presenta menor distancia con las tres series antiguas mexicanas, y la serie antigua del noroeste de Estados Unidos exhibe distancias nulas respecto a las series precontacto y post-contacto. Por el contrario, la serie antigua de República Dominicana es la más distante en relación a las series antiguas mexicanas ($PRMX.1/DR1 = 0.4944$, $CNMX.1/DR.1 = 0.6299$ y $PTMX/DR.1 = 0.5625$).

En el análisis de distancias genéticas, utilizando frecuencias de haplogrupos, la población contemporánea del norte de México presentó distancias con valores menores en relación a las series precontacto y post-contacto, siendo ligeramente mayor con la serie contacto. Sin embargo, en éste análisis utilizando secuencias de un fragmento de la región HVI, la población de México actual (MX1.2) exhibe medidas de distancias mayores con respecto a las tres series antiguas, principalmente con la serie contacto.

Tabla 4.21.

Matriz diagonal de las distancias genéticas de Reynolds construida a partir de las secuencias de un fragmento de 162 pb del HVI entre las series antiguas analizadas y las poblaciones descritas en las tablas 3.7 y 3.8.

	PRMX.1	CNMX.1	PTMX.1	MG.1	SS.2	AL.2	ND.2	CA.2	US2.1	US3.1	MX1.2	CB.1	DR.1	CR.2	PN.2	VZ.2	BR.1	BR.2	EC.2	PR.2	CH.1	CH.2	AR.1
PRMX.1	*																						
CNMX.1	0.0296	*																					
PTMX.1	0.0000	0.0148	*																				
MG.1	0.0610	0.1419	0.0618	*																			
SS.2	0.1218	0.2420	0.1336	0.0323	*																		
AL.2	0.2986	0.2975	0.2876	0.2669	0.3635	*																	
ND.2	0.1913	0.0553	0.1648	0.3415	0.4451	0.4314	*																
CA.2	0.0289	0.0323	0.0214	0.0936	0.1501	0.2578	0.1317	*															
US2.1	0.0000	0.0959	0.0000	0.0565	0.0680	0.3346	0.2890	0.0147	*														
US3.1	0.1586	0.2552	0.1874	0.1524	0.0913	0.5335	0.4906	0.1367	0.0973	*													
MX1.2	0.0737	0.2189	0.1100	0.1350	0.1070	0.4622	0.4053	0.1601	0.0000	0.1056	*												
CB.1	0.3187	0.4344	0.3658	0.2794	0.2030	0.7535	0.8533	0.2608	0.2245	0.0355	0.2263	*											
DR.1	0.4944	0.6299	0.5625	0.4676	0.3684	0.9591	1.0715	0.4175	0.3877	0.1471	0.3486	0.0056	*										
CR.2	0.1276	0.0850	0.1035	0.2346	0.3374	0.3586	0.1959	0.1103	0.0000	0.3941	0.2715	0.6728	0.8846	*									
PN.2	0.0757	0.2013	0.1119	0.1185	0.0834	0.4530	0.3964	0.1209	0.0284	0.0295	0.0166	0.1297	0.2409	0.3039	*								
VZ.2	0.1573	0.1378	0.1640	0.1853	0.2119	0.4429	0.2780	0.0787	0.1521	0.0940	0.2427	0.1405	0.2653	0.2578	0.1588	*							
BR.1	0.0341	0.1504	0.0369	0.0305	0.0101	0.3761	0.4269	0.0724	0.0065	0.1042	0.0559	0.3185	0.5285	0.2919	0.0544	0.1950	*						
BR.2	0.2857	0.5067	0.3499	0.3182	0.2118	0.6868	0.7362	0.3520	0.1679	0.1728	0.0637	0.2920	0.3800	0.6025	0.0716	0.4192	0.2172	*					
EC.2	0.0466	0.1977	0.0856	0.1482	0.1373	0.3985	0.3836	0.1424	0.0194	0.1771	0.0197	0.3827	0.5424	0.2954	0.0511	0.2830	0.0628	0.1515	*				
PR.2	0.1091	0.2898	0.1653	0.1652	0.1262	0.5346	0.5641	0.1851	0.0254	0.1275	0.0062	0.2620	0.3852	0.3968	0.0205	0.2809	0.0973	0.0370	0.0464	*			
CH.1	0.0724	0.2339	0.1039	0.1189	0.0993	0.5044	0.4976	0.1669	0.0288	0.1535	0.0175	0.3026	0.4478	0.3505	0.0519	0.2921	0.0238	0.1031	0.0399	0.0283	*		
CH.2	0.1572	0.2825	0.1924	0.1381	0.0899	0.4781	0.4931	0.1582	0.0725	0.0345	0.0914	0.0608	0.1614	0.3667	0.0422	0.1660	0.1046	0.1185	0.1662	0.0646	0.1214	*	
AR.1	0.3808	0.5200	0.4340	0.3568	0.2468	0.8316	0.9263	0.3101	0.2510	0.0781	0.2487	0.0039	0.0701	0.7291	0.1640	0.2311	0.3446	0.2782	0.4111	0.2620	0.3237	0.0640	*

Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.19.

Se destacan las menores distancias genéticas con respecto a las tres series antiguas.

Para apreciar gráficamente la matriz de distancias genéticas estimadas a partir de secuencias para cada par de las poblaciones de comparación, se utilizó el algoritmo de Escalamiento Multidimensional (MSD), (figura 4.12). La mayoría de las poblaciones, incluidas las tres series antiguas del Valle Central de México (PRMX.1, CNMX.1, PTMX.1), se agrupan con una relativa homogeneidad en la parte media del gráfico. Las series antiguas de precontacto y post-contacto están muy cerca tanto en la dimensión 1 como en la dimensión 2, e igualmente cercana se sitúa la serie antigua del noroeste de Estados Unidos (US2.1). Por otra parte, la serie contacto exhibe una mayor distancia con respecto a las dos series antiguas mexicanas y con la mayoría de las poblaciones de referencia. A pesar de que México contemporáneo (MX1.2) se encuentra en este mismo grupo, al compararla con las series antiguas del Valle Central se observa una distancia considerable entre ellas, sobre todo, como lo hemos indicado en análisis anteriores, con la serie contacto.

Las poblaciones más destacadas, por su separación en el gráfico, son las Esquimo-aleutiana (AL.2) y Na-Dene (ND.2), localizadas en los extremos, superior e inferior derecho respectivamente, estas poblaciones presentan los valores de diversidad nucleotídica más bajos, lo que pudiera influir en esta separación. De la misma manera se despunta, en el cuadrante inferior izquierdo, la serie antigua de República Dominicana (DR.1) y los grupos antiguos de Cuba (CB.1) y Argentina (AR.1), distancias menores presentan las muestras contemporáneas de Venezuela (VZ.2) y de Brasil (BR.2).

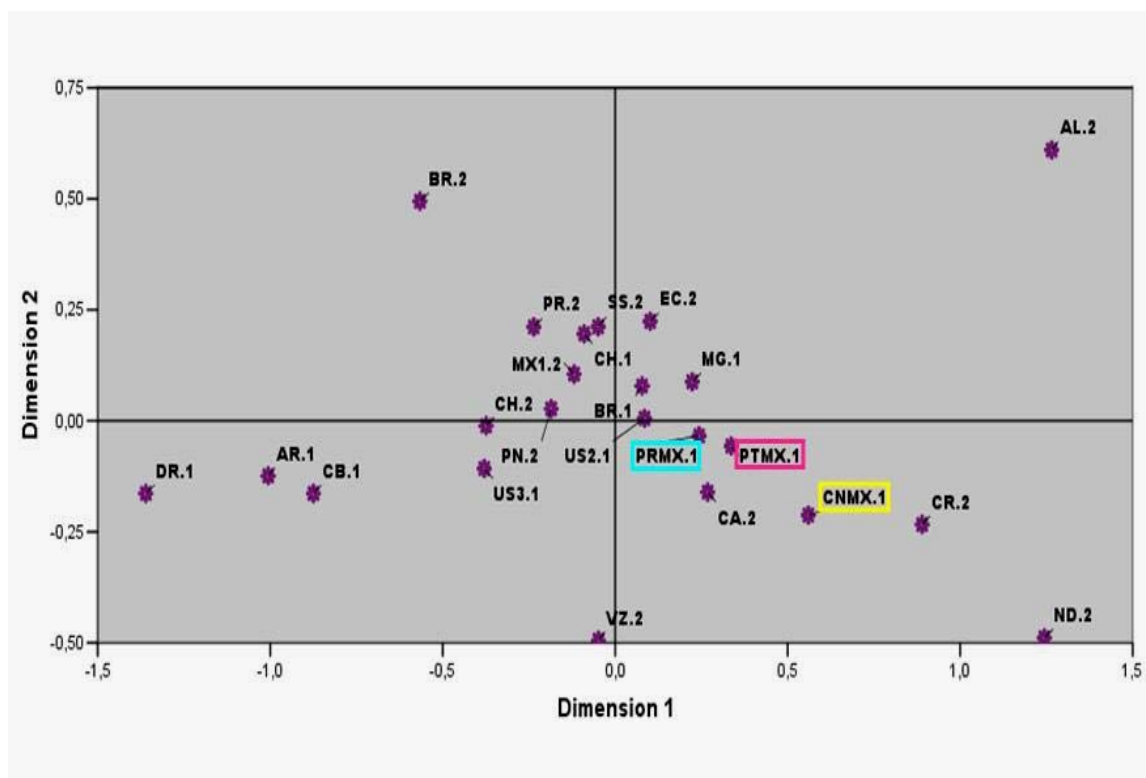


Figura 4.12. Escalamiento Multidimensional (MDS) de las distancias genéticas de Reynolds basados en las secuencias de un fragmento de 162 pb para las poblaciones de comparación (tabla 4.21). Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.19.

4.3.3.2. Median Joining Network.

Las secuencias obtenidas de las poblaciones de comparación fueron separadas conforme al haplogrupo que pertenecen, de acuerdo a la información descrita en las publicaciones originales; asimismo, como se indicó en la sección 4.2, en la serie antigua de indígenas amazónicos de Brasil (BR.1) los haplogrupos fueron inferidos según la correspondencia secuencia-haplogrupo. Para la construcción de los *Median Joining Networks*, se utilizaron las mismas 162 posiciones nucleotídicas de la región HVI que se han evaluado en los distintos análisis estadísticos.

Se construyeron 4 redes filogenéticas mediante el algoritmo *Median Joining Network*, una para cada uno de los principales haplogrupos fundadores americanos (A, B, C y D), (figuras 4.13, 4.14, 4.15 y 4.16), para un total de 1263 secuencias con 248 haplotipos diferentes, procedentes de 23 poblaciones. No obstante, para la mejor

interpretación de los *Median Joining Networks*, se utilizaron todos los haplotipos de las tres series antiguas del Valle Central de México y de las series antiguas de referencia y en el caso de las poblaciones contemporáneas se utilizaron los haplotipos con frecuencias ≥ 2 , asumiendo el supuesto de que la frecuencia de un alelo en una muestra es directamente proporcional a su edad (Donnelly & Tavaré 1986; Crandall & Templeton 1993), por tanto los haplotipos más frecuentes suelen ser los más antiguos. Por otra parte, la serie antigua del noroeste de Estados Unidos (US3.1) fue excluida, debido a que sólo presenta 147 nucleótidos legibles de los 162 analizados en el resto de las poblaciones.

Los *Median Joining Networks*, nos permiten evaluar las relaciones entre las variantes encontradas en las secuencias antiguas del Valle Central de México y las variantes de las series antiguas y contemporáneas de referencia; además, también nos permiten evaluar que el linaje asignado a cada haplotipo sea el correcto. La topología presentada en los 4 *networks*, es básicamente radial y se corresponde con la observada en estudios de poblaciones americanas (Malhi *et al.* 2002, Rubicz *et al.* 2003).

A los haplotipos compartidos por dos o más poblaciones, se les asignó un código específico con un número que representa la frecuencia absoluta en el total de las poblaciones, otro número que representa al haplotipo y la letra que corresponde al haplogrupo (A, B, C, D). Así tenemos 17 haplotipos compartidos para el haplogrupo A, 13 haplotipos para C y 8 para cada haplogrupo B y D, (descritos en la tabla 4.22 de la sección 4.3.3.3).

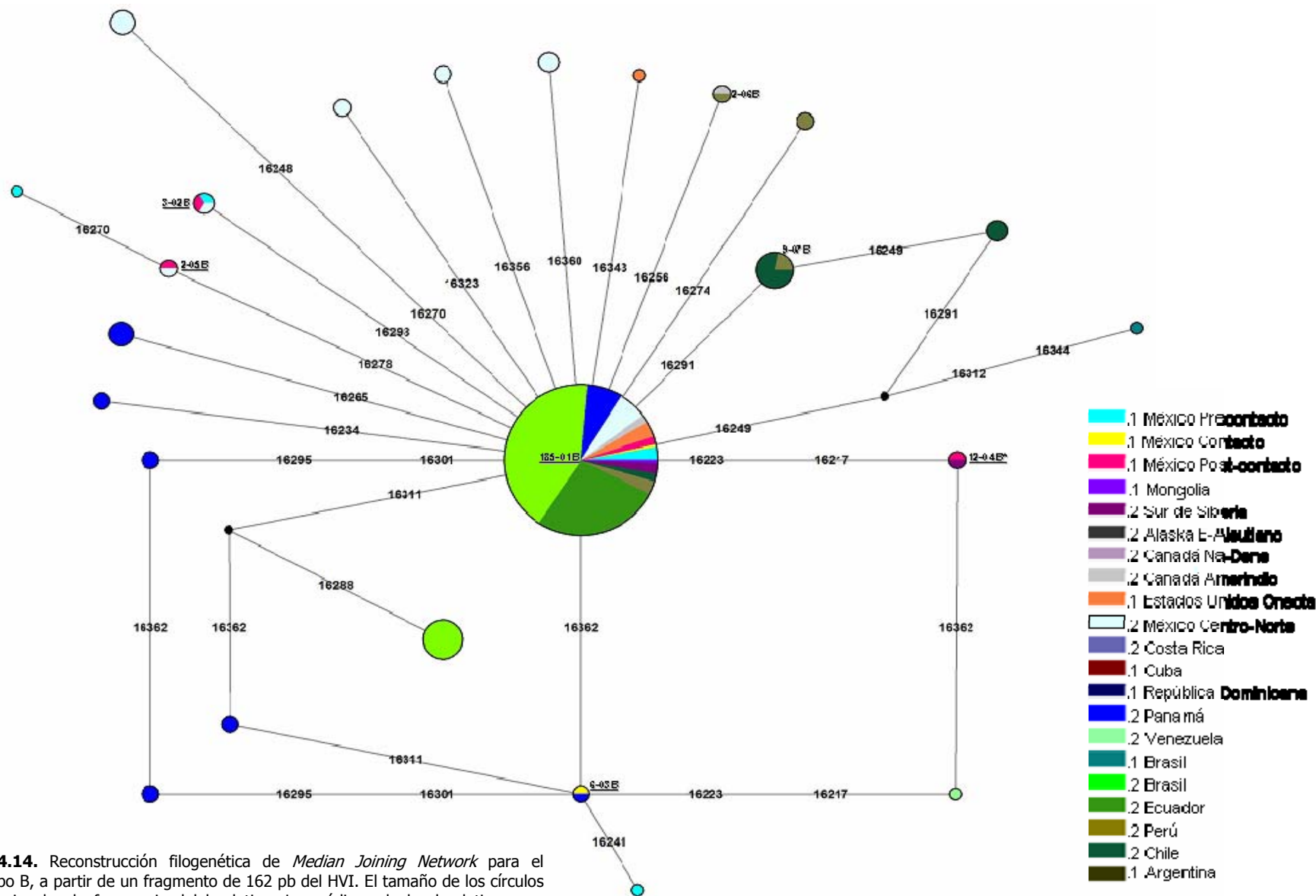


Figura 4.14. Reconstrucción filogenética de *Median Joining Network* para el haplogrupo B, a partir de un fragmento de 162 pb del HVI. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los códigos de los haplotipos que están subrayados indican que presentan secuencias de cualquiera de las series antiguas del Valle Central de México.

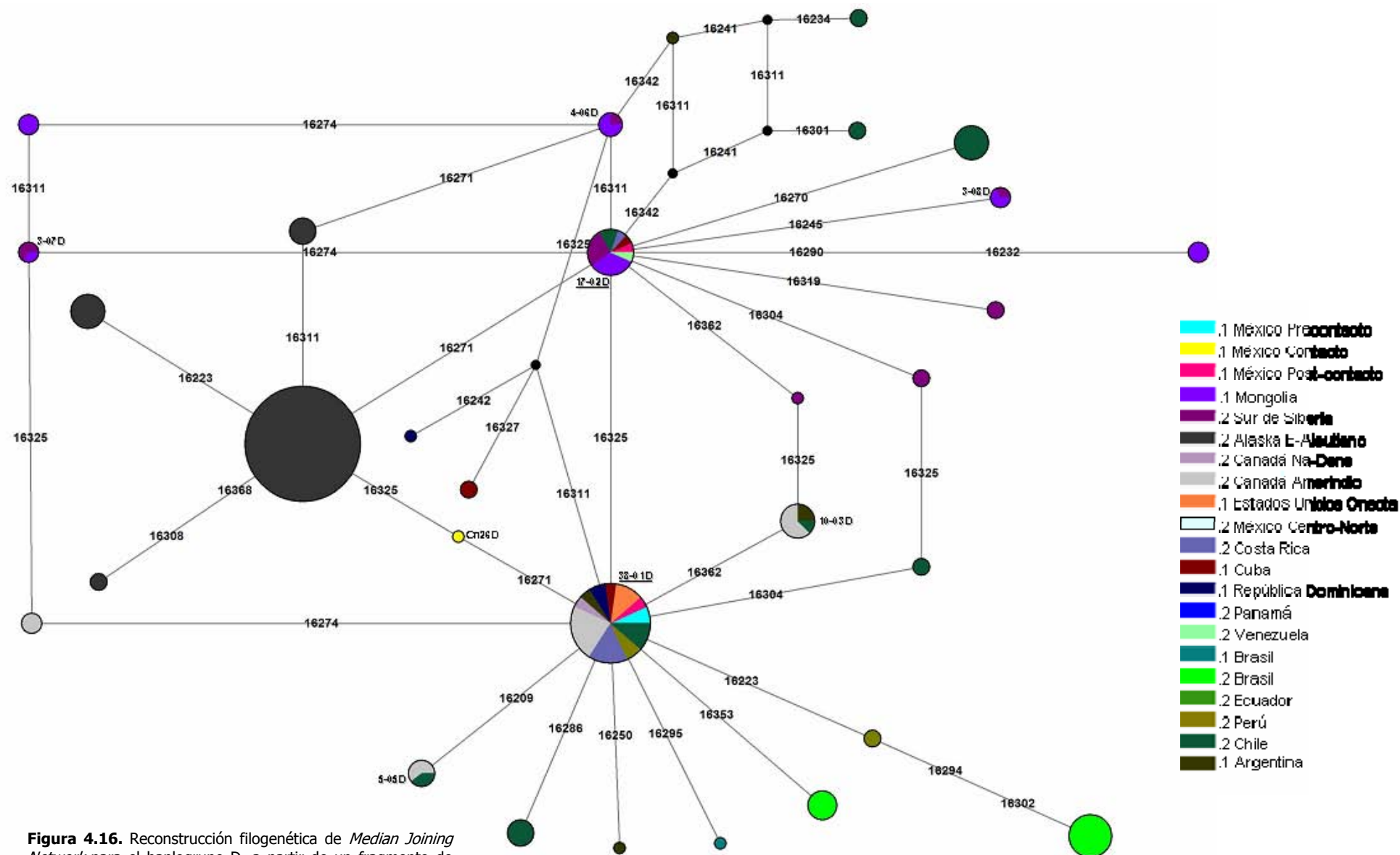


Figura 4.16. Reconstrucción filogenética de *Median Joining Network* para el haplogrupo D, a partir de un fragmento de 162 pb del HVI. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Los códigos de los haplotipos que están subrayados indican que presentan secuencias de cualquiera de las series antiguas del Valle Central de México.

Los *networks* de los haplogrupos A y B presentan un nodo principal basal para cada uno; en el caso del haplogrupo A con el motivo 16223T, 16290T, 16319A, 16362C representado por el haplotipo 161-01A y para el haplogrupo B con el motivo 16217C que está representado por el haplotipo 185-01B, de los cuales derivan el resto de los otros haplotipos. En el haplogrupo A, las secuencias que contienen, además, las mutaciones 16212G y 16234T, representan sublinajes específicos del grupo lingüístico Aleutiano (Rubicz *et al.* 2003); no obstante, podemos observar que de la rama que contiene la mutación 16234T deriva una secuencia única de la serie contacto. El fragmento amplificado no permite evaluar la posición 16111 C→T, que es característica de la mayoría de Nativos americanos y de asiáticos de la región de Beringia, pero no de otros haplotipos de Siberia y del resto de Asia (Schurr *et al.* 1999) por lo cual, las secuencias de las series asiáticas de referencia que pertenecen a este haplogrupo, se encuentran incluidas dentro del nodo principal del haplogrupo A. En el haplogrupo B, todas las secuencias derivan de un único nodo basal (16217C); sin embargo, es importante destacar, que en el fragmento analizado no es posible detectar las posiciones 16189 C→T que representa otra sustitución basal de B.

Los *networks* de los haplogrupos C y D, presentan cada uno 2 nodos principales unidos entre sí en cada haplogrupo, por la mutación 16325C y de los cuales divergen el resto de las ramas. El haplotipo nodal identificado como 18-07C, se caracteriza por la ausencia de la mutación 16325C, típico del linaje C asiático (Derenko *et al.* 2000); sin embargo, además de las secuencias de la serie antigua de Mongolia y la contemporánea del Sur de Siberia, también se encuentran secuencias que pertenecen a las series antiguas Amerindias de Estados Unidos y de Cuba. Por otra parte, del nodo 152-01C derivan todos los haplotipos americanos; en publicaciones que incluyen análisis de poblaciones asiáticas, este haplotipo es designado como C1 (Bandelt *et al.* 2003) y es específico de Nativos americanos.

De los dos nodos principales del haplogrupo D, el nodo ancestral identificado como 17-02D, exhibe las mutaciones 16223T y 16362C, y es típicamente asiático; no obstante se observan representados algunos haplotipos Amerindios de Centro y Sur América y además un haplotipo de la serie antigua post-contacto. A partir de este haplotipo se incorpora la mutación 16271C, sublinaje del grupo lingüístico Aleutiano y que define al subhaplogrupo D2 (Forster *et al.* 1996).

Del nodo 38-01D, caracterizado por las mutaciones 16223T, 16325C y 16362C, derivan todos los haplotipos de las series y poblaciones americanas de referencia. Según Torroni *et al.* 1993b y Malhi *et al.* 2003 este haplotipo define al subhaplogrupo D1 específico del continente americano. Es de resaltar que un haplotipo de la serie contacto presenta las mutaciones específicas americanas 16223T, 16325C, 16362C (subhaplogrupo D1) y además la mutación 16271C que define el sublinaje típicamente aleutiano (Rubicz *et al.* 2003).

4.3.3.3. Haplotipos compartidos.

Como indicamos en la sección anterior, para facilitar la designación de aquellos haplotipos compartidos por dos o más poblaciones, a cada uno se les asignó un código, que están descritos en la tabla 4.22. Las 79 secuencias antiguas obtenidas en este estudio fueron comparadas con las secuencias de las poblaciones de referencia, resultando que 20 de los linajes de las series del Valle Central mexicano han sido previamente descritos en la literatura en poblaciones americanas y/o asiáticas. De estos linajes, 2 son compartidos entre las 3 series (161-01A, 185-01B), 2 son compartidos entre precontacto y contacto (152-01C, 11-02C), 4 son compartidos entre precontacto y post-contacto (4-02A, 8-03A, 3-02B, 38-01D). Asimismo, los 12 haplotipos restantes, 6 del contacto (2-05A, 12-06A, 3-07A, 9-08A, 6-03B, 2-03C) y 6 del post-contacto (16-09A, 2-10A, 12-04B, 2-05B, 6-04C, 17-02D), son compartidos individualmente con el resto de las poblaciones.

De las secuencias compartidas para el haplogrupo A, el linaje designado como 161-01A, que presenta las mutaciones 16223T, 16290T, 16319A, 16362C, es el más frecuente. Se encuentra en 19 de las 23 poblaciones de comparación, incluidas las 3 series antiguas mexicanas y representa el nodo principal en el *network* de este haplogrupo (figura 4.13). La serie precontacto exhibe 5 secuencias con este motivo, contacto presenta 8 secuencias y post-contacto 6 secuencias; además la población de México contemporánea presenta 7 secuencias con estos mismos cambios nucleotídicos. Por otra parte, las series antiguas del noroeste de Estados Unidos (US2.1), República Dominicana (DR.1), Argentina (AR.1) y Brasil contemporánea (BR.2), son las poblaciones que no están representadas en este haplotipo.

El haplotipo 9-07A, con las mutaciones 16223T, 16274A, 16290T, 16319A, 16362C es compartido por 1 individuo de la serie contacto (CNMX.1), 1 de la serie antigua de Oneota en Estados Unidos (US3.1) y 6 individuos de México contemporáneo (MX1.2). Asimismo, el haplotipo 9-08A que presenta los motivos 16223T, 16290T, 16319A, 16335G, es compartido entre 1 individuo post-contacto (PTMX.1) y 1 individuo de México contemporáneo (MX1.2).

El linaje más ubicuo es el designado como 185-01B, que corresponde al haplogrupo B y exhibe el motivo 16217C, está presente en 15 de las poblaciones utilizadas para la comparación, siendo las excepciones los grupos del sur del Ártico (AL.2 y ND.2), las series antillanas (CB.1 y DR.1) y en el sur del continente (AR.1); tampoco es observado ni en la población contemporánea de Venezuela (VZ.2), ni en la serie antigua de Brasil (BR.1). Cinco secuencias de precontacto (PRMX.1), 1 de contacto (CNMX.1) y 3 de post-contacto (PTMX.1) presentan este mismo haplotipo; además, de 11 individuos de México contemporáneo (MX1.2) que también presentan esta secuencia, entre otras poblaciones. En general, la población contemporánea de Brasil (BR.2) exhibe el mayor número de individuos con este haplotipo; sin embargo, contrariamente a lo esperado, la serie antigua brasileña (BR.1) no presenta ninguna secuencia con este motivo (ver figura 4.14).

El haplotipo 3-02B, con el motivo 16217C, 16298C, es compartido por 1 individuo de precontacto (PRMX.1), 1 individuo de post-contacto (PTMX.1) y un individuo de México contemporáneo (MX1.2), lo que refleja una continuidad genética a través del tiempo y se podría definir como un sublinaje exclusivo de México, a pesar de que somos conscientes de las limitaciones que conlleva tanto el tamaño del fragmento analizado, como del bajo número de individuos Nativos americanos, que en general, han sido analizados en poblaciones antiguas y contemporáneas. Asimismo, el haplotipo 2-05B con el motivo 16217C, 16278T es compartido por un individuo post-contacto (PTMX.1) y uno de México contemporáneo (MX1.2).

Tabla 4.22.
Haplotipos compartidos entre las tres series antiguas analizadas y las poblaciones de referencia.

Código	PRMX.1	CNMX.1	PTMX.1	MG.1	SS.2	AL.2	ND.2	CA.2	US2.1	US3.1	MX1.2	CB.1	DR.1	CR.2	PN.2	VZ.2	BR.1	BR.2	EC.2	PR.2	CH.1	CH.2	AR.1
161-01A	5	8	6	5	2	6	23	27		6	7	1		3	14	15	4		24	1	1	3	
4-02A	1		1																2				
8-03A	1		2			1			2						2								
2-04A		1						1															
12-05A		1						9	2														
3-06A		1																			2		
9-07A		1		1						1	6												
16-08A			1											15									
2-09A			1								1												
32-10A						31			1														
7-11A					2	3		2															
3-12A						2			1														
2-13A						1				1													
17-14A							11	6									2						
3-15A										1													
2-16A														1			1						
Código	PRMX.1	CNMX.1	PTMX.1	MG.1	SS.2	AL.2	ND.2	CA.2	US2.1	US3.1	MX1.2	CB.1	DR.1	CR.2	PN.2	VZ.2	BR.1	BR.2	EC.2	PR.2	CH.1	CH.2	AR.1
185-01B	5	1	3	1	4			3	4	6	11			1	13			75	48	5	2	3	
3-02B	1		1								1												
6-03B		1							4						1								
12-04B			1	1	7												3						
2-05B			1								1												
2-06B								1												1			
9-07B																				2		7	
2-08B				1																		1	

Se destacan los haplotipos más comunes.
 Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.19.

Continuación tabla 4.22.

Código	PRMX.1	CNMX.1	PTMX.1	MG.1	SS.2	AL.2	ND.2	CA.2	US2.1	US3.1	MX1.2	CB.1	DR.1	CR.2	PN.2	VZ.2	BR.1	BR.2	EC.2	PR.2	CH.1	CH.2	AR.1
152-01C	1	2						7	1	14	6	3	4		22	12		49	1	2		21	7
11-02C	1	1								1	2	1	4									1	
2-03C		1									1												
6-04C			2									1			1	1							1
6-05C							3	3															
15-06C									1	1			2			9				2			
18-07C				3	4					8		3											
2-08C									1		1												
2-09C									1		1												
3-10C													1			2							
4-11C															1						2	1	
2-12C				1	1																		
2-13C				1	1																		
Código	PRMX.1	CNMX.1	PTMX.1	MG.1	SS.2	AL.2	ND.2	CA.2	US2.1	US3.1	MX1.2	CB.1	DR.1	CR.2	PN.2	VZ.2	BR.1	BR.2	EC.2	PR.2	CH.1	CH.2	AR.1
38-01D	3		2		1		2	1	2	5		2	3	7						3		5	2
17-02D			1	6	5							1		1		1						2	
10-03D								5	2												1	2	
4-04D								3	1														
5-05D								3														2	
4-06D				3	1																		
3-07D				2	1																		
3-08D				2	1																		

Se destacan los haplotipos más comunes.

Los códigos de las poblaciones aparecen en la tabla 4.19.

El haplotipo 152-01C, con el motivo 16223T, 16298C, 16325C, 16327T, típico de poblaciones amerindias y el más común del haplogrupo C es compartido por 1 secuencia de la serie precontacto (PRMX.1) y 2 secuencias de la serie contacto (CNMX.1) con algunas poblaciones de referencia exceptuando, obviamente, las series asiáticas (MG.1, SS.2). También las comparten con muestras americanas del sur del Ártico (AL.2 y ND.2), Costa Rica (CR.2) y las antiguas suramericanas de Brasil y Chile (BR.1, CH.1). La población de Brasil contemporáneo (BR.2) exhibe la mayor frecuencia de este haplotipo; no obstante, en este caso, la serie antigua de Brasil (BR.1) tampoco tiene ningún individuo caracterizado con este haplotipo. Finalmente, la población de México contemporáneo presenta 6 secuencias con este motivo.

El haplotipo 11-02C presenta los cambios polimórficos 16223T, 16298C, 16311C, 16325C, 16327T y es compartido por 1 secuencia de precontacto (PRMX.1), 1 de post-contacto (PTMX.1), 2 de México contemporáneo (MX1.2) y con las series antiguas de Oneota, Estados Unidos (US3.1), Cuba (CB.1) y R. Dominicana (DR.1). Además el haplotipo 2-03C que excluye la posición polimórfica 16298C es compartido exclusivamente por 1 secuencia de contacto (CNMX.1) y 1 secuencia de México contemporáneo (MX1.2) (ver figura 4.15).

Las series precontacto y post-contacto comparten el haplotipo designado como 38-01D, con el motivo 16223T, 16325C, 16362C (subhaplogrupo D1). Se trata de la secuencia más representativa para el haplogrupo D, se observa en las muestras Na-Denes y Amerindias de Canadá (ND.2 y CA.2), en Estados Unidos (US2.1 y US3.1), en Centroamérica (CB.1, DR.1 y CR.2) y en el Sur en las poblaciones de Perú (PR.2), Chile (CH.2) y Argentina (AR.1). De igual manera, éste haplotipo es compartido con un individuo del Sur de Siberia (SS.2) que fue asignado al macrohaplogrupo M (Derenko *et al.* 2000).

El linaje 17-02D, que presenta el motivo 16223T, 16362C, es la segunda secuencia más frecuente del haplogrupo D; está presente en la serie post-contacto (PTMX.1) y es compartida con Cuba (CB.1), Costa Rica (CR.2) y Chile (CH.2). Por otra parte, un individuo de la muestra venezolana (VZ.2) exhibe esta misma variación nucleotídica y además la delección polimórfica de 9 pb en la región intergénica COII/tRNA^{lys}, razón por la cual, los autores lo asignaron al haplogrupo B (Vona *et al.*

2005). De igual manera, este linaje, lo exhiben 6 individuos de la serie antigua de Mongolia (MG.1) y 5 del Sur de Siberia (SS.2) siendo uno de ellos asignado al haplogrupo E.

Como hemos podido observar, las tres series antiguas mexicanas comparten el mayor número de linajes con la población contemporánea del norte mexicano (MX1.2). Además de las secuencias, que podrían representar secuencias basales para el fragmento que analizamos (161-01A, 185-01B y 152-01C), la muestra de México actual comparte 2 haplotipos con la serie precontacto (3-02B, 11-02C), 2 con la serie contacto (9-08A, 2-03C) y 2 con la serie post-contacto (2-10A, 2-05B). Por el contrario, las poblaciones que menos linajes comparten con las series antiguas mesoamericanas son las series de Brasil (BR.1 y BR.2) y las poblaciones que representan a los grupos lingüísticos Esquimo-aleutiano (AL.2) y Na-Dene (ND.2), compartiendo, en todos los casos, exclusivamente las secuencias más comunes, con la excepción del linaje Pr08A que comparte precontacto con el grupo esquimo-aleutiano (AL.2) y Pt19B que comparte post-contacto con la serie antigua brasileña (BR.1).

El linaje 12-04B, caracterizado únicamente por la sustitución 16223T, se observa en un individuo de la serie post-contacto que, además, presenta la delección polimórfica de 9 pb en la región intergénica COII/tRNA^{lys} que define al haplogrupo B. La transición C→T en la posición 16223 es una posición con una alta tasa de mutación que está presente en linajes americanos, asiáticos y africanos, pero que no es una mutación basal de B, por lo que esta situación no es especialmente coherente; por otra parte, está designada como *hot-spot* de daño molecular por Gilbert *et al.* (2003b). No obstante, en las poblaciones de referencia este haplotipo se observa en 11 individuos de la población contemporánea del Sur de Siberia (SS.2), que según su asignación por RFLPs se distribuyen de la siguiente manera: 5 que pertenecen al haplogrupo C, 3 al macrohaplogrupo M, 1 pertenece a D, 1 pertenece a E y 1 individuo que presenta la delección de 9 pb fue asignado al haplogrupo B (Derenko *et al.* 2000). Como el motivo 16223T por sí solo, no corresponde a ningún haplogrupo específico, los autores clasificaron a estos individuos sólo por análisis de restricción enzimática. Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, se ha clasificado al individuo del post-contacto que presenta esta sustitución y la delección polimórfica de 9 pb como perteneciente al haplogrupo B.

Este mismo haplotipo, el 12-04B es, además, compartido por un individuo de la serie antigua de Mongolia (MG.2) asignado al macrohaplogrupo M y con 3 individuos de la serie antigua de Brasil (BR.1) los cuales fueron asignados originalmente al haplogrupo VI, que no se corresponde con ninguno de los haplogrupos fundadores americanos y que para este análisis los incluimos como "otros"; no obstante, en las series de Mongolia y de Brasil la caracterización genética se basó sólo en las secuencias de HVI y no se puede determinar si a nivel de la región de codificante se corresponde con esta asignación. En el *network* del haplogrupo B (figura 4.14), el círculo que representa este haplotipo, no se corresponde con el tamaño de su frecuencia, ya que sólo fueron incluidas las secuencias que tienen la delección de 9 pb en la región intergénica COII/tRNA^{lys}.

4.4. Análisis de DNA nuclear – (STRs autosómicos).

En genética de poblaciones, los STRs de los cromosomas autosómicos permiten la identificación de cada alelo por locus, la obtención de datos poblacionales, y el cálculo de las frecuencias alélicas. De esta manera, se pueden estimar las distancias genéticas entre poblaciones o entre individuos (Ponsuksili *et al.* 1999); así como también realizar análisis filogenéticos y de la estructura de una población.

No obstante, el análisis de DNA nuclear en restos antiguos es una tarea muy difícil de realizar, ya que los genes nucleares son, generalmente, entre 5000 a 10000 veces menos abundantes que los genes de origen mitocondrial, lo que podría ser la razón más plausible para explicar las mayores dificultades que se presentan al amplificar nDNA que mtDNA en un mismo extracto de aDNA (Poinar *et al.* 2003).

A pesar de las posibles dificultades que supone amplificar nDNA a partir de material genético antiguo, nos propusimos intentar analizar marcadores microsatélites de cromosomas autosómicos, utilizando un kit comercial que permite la amplificación simultánea de 9 STRs y del gen de la amelogenina para la identificación del sexo (descrito en la sección 3.2.2.3 de Materiales y Métodos). Para ello, se seleccionaron 15 de las muestras en las cuales se habían obtenido los mejores resultados a nivel de los

marcadores mitocondriales y de la secuenciación de la región HVI, encontrando que en ninguno de los casos se logró suficiente DNA nuclear amplificable ni para los marcadores STRs, ni para el gen de la amelogenina. Sólo en el individuo *O9* de la serie contacto, se pudo identificar un pico que posiblemente corresponda a un alelo del vWA; no obstante, queda claro que esto no representa -en ningún caso-, un resultado destacable.

Por otra parte, es importante resaltar que no se pudo complementar la optimización de la técnica, sobre la base de múltiples repeticiones modificando algunas condiciones, tales como: temperatura de *annealing*, número de ciclos de amplificación, volumen de la muestra, entre otros ya que no contábamos con suficientes extractos de DNA, ni con material esquelético o dentario para la replicación de los extractos.



Castas mexicanas
Ignacio María Barreda 1777

5. Discusión

5.1. Consideraciones sobre la metodología.

El éxito en la obtención de DNA amplificable en muestras antiguas depende, en gran medida, de la preservación del material a estudiar. Los procesos hidrolíticos y oxidativos que suceden después de la muerte, están condicionados por los factores ambientales a los que se ha estado expuesto el enterramiento. Asimismo, algunos estudios, como los de Lindahl (1993a) y Burger *et al.* (1999), sugieren que el DNA no sobrevive más de 100 mil años; a pesar de esto, parece que no existe una correlación directa entre la edad de la muestra y las características bioquímicas del DNA (Pääbo 1989).

En general, las bajas temperaturas, favorecen la preservación del material genético; más aún en *permafrost*, que ha sido considerado el ambiente ideal en la preservación de biomoléculas por largos períodos, debido a que se mantienen constantes las bajas temperaturas, con un pH neutro y condiciones anaerobias (Lydolph *et al.* 2005), además el porcentaje total de agua en estado de descongelamiento no supera el 10% (Willerslev *et al.* 2003; 2004).

Los ambientes secos también contribuyen a la mejor conservación de los ácidos nucleicos, debido a que la humedad acelera la depurinización del DNA y por ende la fragmentación de las cadenas (Smith CI, *et al.* 2003). Otras variables ambientales que influyen en la cantidad y calidad de ácidos nucleicos en material arqueológico son: las propiedades geoquímicas del suelo y la cantidad de sustancias orgánicas. Por tanto, en medios ambientes con altas temperaturas la supervivencia del DNA es muy corta; en este sentido, Marota y colaboradores (2002) estimaron que el período de vida de DNA auténtico en sitios arqueológicos egipcios, no podrían superar los 25 años.

En consecuencia, es de suponer que los yacimientos arqueológicos hallados en ambientes fríos y secos conservarán en mejores condiciones el material genético que en aquellos húmedos y con altas temperaturas. Este supuesto lo confirman Burger *et al.* (1999) y se fortalece con trabajos como el publicado por Leonard *et al.* (2000), que analizan mtDNA en restos de osos marrones recuperados en depósitos de *permafrost* en Alaska y Canadá, datados entre 14000-42000 años de antigüedad;

y también por el trabajo de Lydolph *et al.* (2005), que amplifican DNA de hasta 510 pb de diversos hongos, plantas e invertebrados en tundras siberianas de tres depósitos prehistóricos de *permafrost*, datados en 10000, 20000 y 300000-400000 años cada uno aproximadamente. No obstante, estudios recientes (Hansen *et al.* 2006), sugieren que el factor que limita la vida media del DNA amplificable, en muestras que han estado bajo condiciones extremas de congelamiento, son los *crosslinks* (puentes cruzados) intermoleculares, en lugar de la ruptura o fragmentación de las cadenas sencillas; y cuestionan los modelos que suponen que la depurinización es el principal daño que determina la supervivencia del DNA en *permafrost*.

Es indiscutible que en condiciones menos óptimas también es posible obtener suficiente DNA amplificable, como lo demuestran los trabajos publicados en restos humanos y de animales en diferentes áreas geográficas, y en distintos continentes, muchos de los cuales han sido referidos en capítulos anteriores. En nuestro caso, analizamos DNA obtenido de restos humanos de cuatro yacimientos localizados en el área del Valle Central mexicano, con condiciones ambientales que se caracterizaban, básicamente, por un ciclo anual de días soleados y humedad escasa, lluvias en verano que renovaban los lagos y noches frías en invierno. En general, el material arqueológico presenta una buena preservación esquelética y contrariamente a lo esperado, el yacimiento más antiguo (Tlatelolco - estado de México), exhibía la mejor conservación lográndose una mayor eficiencia en la recuperación del DNA; de hecho, las 4 secuencias de 400 pb obtenidas a partir de un sólo fragmento, se lograron en muestras de individuos de este yacimiento (*Ent. 2, Ent. 25-C. 43, Ent. 27-C. 38 y Ent. 6*).

Por otra parte, el yacimiento de Santa María Texcala de la época Colonial (siglos XVII-XVIII), mostró la menor eficiencia en la recuperación del material genético, de 14 muestras analizadas, sólo 9 pudieron ser caracterizadas, lo que representa el 64%; no obstante, en los otros tres yacimientos la eficiencia para cada uno supera el 85%. Probablemente las condiciones ambientales y/o las formas de enterramiento en los distintos yacimientos sean los que determinen estas diferencias y no la antigüedad de los mismos. No obstante, desconocemos los datos arqueológicos de este yacimiento de época Colonial.

En el caso de la serie antigua de la cultura Maya analizada por González-Oliver y colaboradores (2001), que data de diferentes épocas entre el Clásico y post-Clásico en el estado de Xacaret, Quintana Roo, se caracterizaron por RFLPs 24 de 28 individuos y en la serie de Tlatelolco analizada por Kemps y colaboradores (2005) lograron caracterizar de igual manera, por análisis enzimático, 23 de 27 individuos. Parece ser que las condiciones ambientales del área mesoamericana pudieran ser suficientemente adecuadas para la preservación de material genético a través del tiempo, por lo menos durante los últimos 1000 años. Estos datos y de otras series antiguas americanas apoyan este supuesto, contrariamente, en poblaciones mediterráneas españolas, como son las series que se estudian en nuestro laboratorio, presentan una menor eficiencia del DNA recuperado, posiblemente por las condiciones ambientales de extrema humedad a los cuales han sido sometidos esos restos arqueológicos por largo tiempo.

Las condiciones inherentes a cada individuo, posiblemente también influyen en la preservación del material genético. En nuestros resultados podemos observar que 12 individuos: 6 de los 36 individuos del yacimiento de Los Olmos del período de contacto (*Nº 66 Inv. 18 M. 18, Nº 85 Inv. 37 M. 37, Nº 06 Cap. 10B-240, Nº 07 Cap. 9, Nº 18 Cap. 14B y Nº 15 Caja 21*), 5 de los 14 individuos del yacimiento de Santa María Texcala (*SMT Ent. 40, SMT Ent. 24, SMT Ent. 6, SMT Ent. 61 y SMT Ent. 39*) y 1 de los 22 individuos del yacimiento del Hospital San Juan de Dios (*HSD Osario 15*) estos últimos pertenecientes al período de post-contacto, no se logró obtener DNA amplificable o era de muy baja calidad. Es de esperar que las características de conservación de las muestras que se encuentran en un mismo yacimiento sean iguales o muy similares, como parece suceder en este caso, ya que el yacimiento de Santa María Texcala presentó una menor eficiencia; no obstante, ciertas individualidades como la edad de la muerte, la constitución física, la localización dentro del yacimiento y hasta la época del año en que sucede la muerte, podrían influir en la efectividad del DNA. En las muestras analizadas en este estudio, los únicos datos que podemos relacionar con estos parámetros, son las características dentarias que indican que se trata de individuos adultos.

La literatura también relaciona el tipo de tejido con la calidad del material genético recuperado, es un hecho que el DNA se conserva mejor en los tejidos duros (huesos y dientes), siendo, además, el registro fósil más abundante. En especial, los

dientes, han proporcionado mejores y más fiables resultados en las investigaciones con aDNA (Hänni *et al.* 1990; Drancourt *et al.* 1998; Gilbert *et al.* 2003a, entre otros). No obstante en el trabajo de Hofreiter y colaboradores (2001a), en huesos y dientes de 11 osos de cueva (*the Cave Bear, Ursus spelaeus*) con una antigüedad de entre 25000-50000 años BP aproximadamente, el DNA obtenido de ambos tejidos mostraron el mismo patrón de daño molecular; por lo cual, estos resultados contradicen la propuesta de que el DNA en dientes se preserva mejor que en huesos.

La estructura histológica de los dientes es bastante peculiar, están constituidos por tejidos altamente mineralizados. El esmalte, que rodea a la corona dental, es el tejido más duro del cuerpo humano, su contenido inorgánico supera el 95% y no contiene elementos celulares. El cemento radicular presenta una proporción inorgánica del 50%, muy similar a la del hueso, y la dentina que recubre al tejido pulpar tanto a nivel de la corona como de la raíz, está formada por pequeños conductos por donde pasan las prolongaciones de los odontoblastos¹⁰ y contiene aproximadamente 60% de sustancia inorgánica.

El esmalte, el cemento y la dentina rodean la cámara pulpar y conductos radiculares y se convierten en una barrera externa y natural contra factores ambientales adversos como altas temperaturas, extrema humedad y acidez, además de evitar la infiltración de compuestos del suelo y de microorganismo al interior del diente, razón por la cual, el DNA recuperado de los dientes parece ser de mejor calidad que aquel que procede de otros tejidos (Degusta *et al.* 1994; Drancourt *et al.* 1998; Meyer E, *et al.* 2000; Di Benedetto *et al.* 2000; Gilbert *et al.* 2003a), a pesar de los resultados de Hofreiter *et al.* (2001a) referidos en el párrafo anterior.

Como hemos indicado en la Introducción, una de las hipótesis que intenta explicar la mejor preservación del material genético en dientes, podría deberse a la supuesta afinidad del DNA por la hidroxiapatita (Lindahl 1993a; Nielsen *et al.* 1994) y a la menor posibilidad de contacto con sustancias inhibitoras de PCRs (tales como los componentes del suelo); también es de destacar la relativa reducción de

¹⁰ Células formadoras de dentina, localizadas en la periferia pulpar.

contaminación con DNA exógeno debido a la extrema dureza y arquitectura de los tejidos que lo protege.

Los dientes utilizados en este estudio, fueron seleccionados siguiendo un estricto rigor, ya que cualquier patología, raíces incompletas o forámenes abiertos, podrían representar una puerta de entrada de DNA contaminante. Por otra parte, no se observaron diferencias en la eficiencia del material genético amplificable, en cuanto al tipo de diente seleccionado para la toma de la muestra; generalmente, fueron usados molares, por la simple razón de que era el tipo dentario más abundante en el conjunto analizado, no obstante, en algunos casos la toma de la muestra fue realizada a partir de incisivos, caninos o premolares sin que esto determinara ninguna diferencia en los resultados, lo que contrasta con lo obtenido por Montiel (2001) que indica una mejor eficiencia a partir de caninos, incisivos y premolares.

El diseño experimental que se ha seguido en el presente trabajo, fue desarrollado por Montiel (2001) y progresivamente se han ido introduciendo modificaciones con la finalidad de minimizar aún más los riesgos de contaminación, de incrementar la eficiencia del material genético recuperado y con ello, lograr el mayor número de individuos caracterizados. La adecuación de un laboratorio dedicado exclusivamente al trabajo de aDNA, con todo el equipamiento necesario para realizar los procedimientos básicos de Pre-PCR y provisto de aire ultrafiltrado con presión positiva, ha sido uno de los grandes logros del equipo de investigación.

Desde los primeros estudios con aDNA, el esfuerzo de la mayoría de los investigadores se ha encaminado a demostrar que los resultados obtenidos a partir de restos antiguos o muy antiguos, utilizando la tecnología de la biología molecular, son realmente auténticos y no el producto de contaminación con DNA exógeno. Es por ello, que se han propuesto un número de procedimientos, cada vez más amplio en función de la aparición de nuevos aspectos sobre contaminación y daños moleculares en aDNA, los cuales en conjunto se han denominado "Criterios de Autenticidad". Estos criterios tienen como principal objetivo tanto minimizar los riesgos de contaminación como descartar el DNA contaminante cuando se analiza material genético muy degradado. En el desarrollo de este trabajo se ha intentado

cumplir con algunos de los procedimientos clásicos descritos en la literatura y con otros que creemos pudieran tener el mismo objetivo.

La técnica que hemos utilizado para la obtención de la muestra, reduce significativamente los problemas de contaminación externa y además ha incrementado la calidad del material recuperado. Este procedimiento consiste en obtener tejido dentario desde el interior de los conductos radiculares. El uso de instrumental odontológico especializado, ha facilitado la manipulación de los dientes, con el menor contacto por parte del operador. Además, se utilizó instrumental rotatorio diamantado que permite cortes limpios y la obtención de polvo de dentina muy fino, lo que facilita la remoción de iones inorgánicos al incorporar un agente quelante (EDTA) al tampón de extracción. De esta manera, se induce la liberación de las moléculas de DNA, especialmente si es cierta la suposición que el aDNA es preservado debido a su unión a los cristales de hidroxiapatita de los tejidos duros, en nuestro caso, a la hidroxiapatita de la dentina radicular. No obstante, si la conservación de las biomoléculas de DNA en restos antiguos correspondiera a otros mecanismos, de igual manera esta técnica ha sido bastante acertada, ya que también incorpora Proteinasa K y SDS que tienen la capacidad de digerir compuestos proteicos.

La detección de DNA contaminante es difícil cuando se trabaja con aDNA en poblaciones humanas, sobre todo si se trata de poblaciones que tengan el mismo origen geográfico que los investigadores. Las muestras que hemos analizado provienen del continente americano y como se ha indicado en párrafos anteriores, en los laboratorios de la Unidad de Antropología Biológica de la UAB, nunca se había procesado material genético de este continente. Asimismo, el mtDNA de la autora del trabajo, corresponde al subhaplogrupo africano L1b, por lo tanto una contaminación con DNA europeo o africano es fácilmente detectable.

La diversidad genética en las poblaciones americanas contemporáneas y antiguas está bien estudiada, lo que se demuestra en la gran cantidad de trabajos publicados dentro del contexto geográfico del continente y con distintas cronologías. La variabilidad del DNA mitocondrial presentada en las 3 series antiguas del Valle Central de México, se corresponde con el modelo observado, no sólo para el conjunto de las poblaciones americanas, sino en especial dentro del grupo de

poblaciones contemporáneas y series antiguas mexicanas, por lo cual podemos afirmar que las muestras analizadas cumplen con el principio de “sentido filogenético”, propuesto como uno de los criterios de autenticidad (Montiel *et al.* 2001; Pääbo *et al.* 2004).

En todos los procedimientos pre-PCR y post-PCR se siguieron estrictas medidas de esterilización, las cuales están ampliamente descritas en el capítulo de Materiales y Métodos; si bien es cierto que estas medidas no garantizan la eliminación absoluta de DNA exógeno, no es menos cierto que disminuyen, significativamente, los riesgos de contaminaciones externas y de contaminaciones cruzadas. En nuestro laboratorio, con la excepción de esta investigación, se trabaja de manera exclusiva con muestras europeas, específicamente de la península ibérica, razón de más para ratificar que es muy improbable la presencia de DNA contaminante de anteriores reacciones de PCR, ya que serían fácilmente detectables; por otra parte, la variabilidad encontrada dentro de las tres series analizadas, no es compatible con una alta proporción de contaminaciones entre las muestras analizadas.

La amplificación en paralelo de los controles de extracción (KE) y de amplificación (K-) con las muestras antiguas, tiene la finalidad de detectar contaminaciones introducidas por los reactivos y/o soluciones utilizadas durante cualquiera de los procedimientos (Pääbo *et al.* 2004) y también pueden reflejar el porcentaje de contaminaciones puntuales (Montiel 2001), introducidas directamente del ambiente de trabajo al tubo. En nuestro estudio, no se llegaron a observar contaminaciones en los controles de extracción; y en los casos en los que hubo algún indicio de contaminación en los controles de amplificación, los productos de PCR obtenidos, junto con esos controles, fueron descartados, ya que asumimos que la contaminación, durante la reacción de amplificación, pudo suceder para todos los productos de PCR por igual. No obstante, también está claro que en estudios con aDNA, la no detección de DNA en los controles negativos no implica una garantía absoluta de autenticidad (ver revisión de Pääbo *et al.* 2004).

Por otra parte, la ubicación del termociclador lejos de todo procedimiento pre-PCR e inclusive de los procedimientos post-PCR, es otra de las medidas implementadas para disminuir la posibilidad de contaminación por los productos

amplificados (amplicones) que se generan durante la reacción. La reacción de PCR, debido a su naturaleza exponencial produce un gran número de amplicones concentrados en pequeños volúmenes, que pueden ser fácilmente expandidos en el medio ambiente y contaminar las muestras antiguas, es por ello que los tubos con productos de PCR nunca entran en el laboratorio de extracción de aDNA.

En la revisión publicada por Pääbo y colaboradores (2004), se describen muchos de los criterios clásicos de autenticidad, entre ellos realizar múltiples amplificaciones desde el mismo extracto o desde extractos diferentes de un mismo individuo, en este sentido, algunas muestras, escogidas al azar, fueron amplificadas más de una vez, tanto para los segmentos de la región codificante como para los segmentos de la región de control, en cada caso además, se realizó el análisis correspondiente con enzimas de restricción y secuenciación, obteniéndose resultados concordantes.

Asimismo, en algunos casos puntuales, también se replicaron los análisis de restricción y de secuencia con la finalidad de verificar los resultados obtenidos, tales como los individuos: *SJD Ent.21*, *SJD Osario 3* y *SJD Osario 13* del yacimiento Hospital San Juan de Dios de la serie post-contacto, que resultaron negativos en el análisis de RFLPs para los 5 haplogrupos fundadores americanos, y de los cuales sólo se logró la secuenciación del fragmento HVI en el individuo *SJD Osario 13*, siendo asignado al subhaplogrupo africano L2a. En ninguna de las tres muestras se detectaron diferencias entre los primeros y segundos análisis.

Otros casos fueron los individuos: *Nº 54 Inv 16 M.16*, del yacimiento de la población de Los Olmos del período contacto y *SJD Osario 10* de la serie Hospital San Juan de Dios de post-contacto, el primero fue asignado por RFLPs al haplogrupo A y su secuencia se corresponde con 3 de las sustituciones diagnósticas para este haplogrupo (16290T, 16319A, 16362C); no obstante, se distingue la ausencia de la mutación 16223T, y el segundo individuo presenta la delección polimórfica de 9 pb en la región intergencia COII/tRNA^{lys}, siendo asignado al linaje mitocondrial B, sin embargo, en su secuencia se observa exclusivamente el cambio nucleotídico 16223T, que no es basal para este haplogrupo. En ambos casos se replicaron los análisis y los resultados fueron concordantes con los primeros.

En nuestros resultados existe una total correspondencia entre los polimorfismos de la región codificante, detectados mediante RFLPs para los principales haplogrupos mitocondriales americanos, y la combinación de las sustituciones en la región de control, con la excepción del individuo *SJD Osario 10*, que como indicamos en el párrafo anterior, presenta la delección polimórfica de 9 pb que define al haplogrupo B, pero un único cambio C→T en la posición 16223 de la secuencia nucleotídica, que no es típica para este linaje. Esta situación no es única, ya que Derenko *et al.* 2000, refieren un caso similar en una población aborigen del Sur de Siberia (serie que fue utilizadas en este trabajo como población de comparación) que fue designado al haplogrupo B, pero además sugieren que posiblemente este haplotipo represente un linaje mitocondrial diferente a este haplogrupo. No obstante, nosotros igualmente lo consideramos perteneciente al haplogrupo B, basándonos en la presencia de la delección polimórfica.

Por otra parte, en los trabajos de Gilbert *et al.* 2003a se establece que la posición 16223 tiene una alta tasa de daño molecular *post-mortem*, por lo cual no podemos rechazar el supuesto de que la secuencia del individuo *SJD Osario 10*, represente un daño molecular posterior a la muerte. Finalmente, también existe la posibilidad de homoplasia con cualquier otro haplogrupo, ya que este sitio presenta una tasa de mutación bastante elevada *in vivo* (Excoffier & Yang 1999; Meyer S, *et al.* 1999).

Al margen de este caso, la correlación entre los análisis de restricción y las secuencias de la región HVI que hemos encontrado en las muestras mexicanas antiguas, puede ser utilizada como una estrategia de autenticidad para los estudios con aDNA, como lo definen Montiel *et al.* (2001) y Montiel (2001), enunciado que, además, ha sido ratificado por Bandelt (2005).

El material esquelético del que provienen los dientes analizados en esta investigación, se encuentran depositados en el Instituto de Antropología e Historia de Ciudad de México. En general, sólo disponíamos de un diente de cada individuo, con la excepción de un número muy reducido de muestras, del yacimiento de Tlaletoloco (serie precontacto), de los cuales había al menos dos por cada individuo.

En el conjunto de las muestras con más de un diente, al final de la etapa experimental, fueron seleccionados de forma aleatoria dos muestras, que pertenecen a los individuos *Ent. 21 (C.39)* y *E. varios (C.75)*. A estas muestras se les realizó una segunda extracción y se replicaron todos los análisis, observándose una total concordancia entre los dos extractos de un mismo individuo. Es de destacar, que el individuo *E. varios (C.75)*, asignado al haplogrupo B, presenta una secuencia única, entre los individuos de las tres series analizadas, con el motivo 16217C, 16241G, 16362C. Por otra parte, el individuo *Ent. 21 (C.39)* fue asignado al haplogrupo D, siendo éste, el linaje menos frecuente en las tres series antiguas del Valle Central mexicano. Estos datos nos sugieren que existe una mínima posibilidad de contaminación anterior a la extracción y de contaminaciones cruzadas entre muestras.

Aunque dos réplicas concordantes no pueden ser determinantes a la hora de autenticar resultados, la suma de los procedimientos aplicados en esta investigación nos permite deducir que existe una alta probabilidad de que el DNA amplificado y analizado en las muestras antiguas mexicanas, sea efectivamente DNA endógeno.

5.2. Análisis filogenéticos y poblacionales.

Todos los nativos americanos pertenecen a uno de los 5 linajes fundadores mitocondriales, definidos por la combinación de sitios polimórficos en la región codificante y en la región de control del mtDNA y que han sido ampliamente descritos en este trabajo. Los análisis de la distribución de frecuencias de haplogrupos permiten identificar los movimientos poblacionales prehistóricos que han dado origen a las poblaciones contemporáneas. Asimismo, las variantes en el segmento HVI, que definen linajes únicos dentro de cada haplogrupo, son generalmente específicos de cada pueblo o grupo lingüístico y permiten definir procesos evolutivos internos (Schurr & Sherry 2004). Hasta el año 1993, cuando Ann Stone y Mark Stoneking, publican sus investigaciones utilizando aDNA en restos humanos en una serie de la cultura Oneota, Estados Unidos, no existían pruebas genéticas directas en material arqueológico, que permitieran evaluar interpretaciones relacionadas al origen y modelos de variación genética en las

poblaciones contemporáneas americanas. Desde entonces, han surgido nuevos estudios en distintas poblaciones antiguas en todo el continente americano.

A la luz de estos trabajos, hemos analizado tres series antiguas cronológicamente distintas dentro del contexto geográfico y cultural de Mesoamérica, específicamente del Valle Central de México. Este Valle era una unidad hidrológica cerrada, constituida por los lagos de Zumpango y Xaltocan al norte, Texcoco en el centro y Chalco y Xochimilco al sur, que incluye los actuales estados de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla, el sur de Hidalgo y el Distrito Federal.

Las series comprenden tres períodos históricos bien definidos: el período post-clásico del precontacto, que abarca desde el 900 d.C., hasta la llegada de los españoles; el período contacto que corresponde a las primeras etapas de la época de la conquista y la evangelización indígena, y el post-contacto que define el período colonial propiamente dicho, cuando se establece el Virreinato de la Nueva España.

La comparación de la variabilidad mitocondrial entre las series antiguas analizadas, en cuanto a las frecuencias de haplogrupos y la diversidad entre secuencias de un fragmento de 162 pb de la región HVI, sugiere ciertas divergencias entre la serie contacto y las series precontacto y post-contacto. La serie contacto exhibe una distribución de haplogrupos distinta, valores de diversidad genética más bajos y un mayor número de secuencias únicas. No obstante, al comparar los resultados obtenidos en este estudio, con el resto de las poblaciones antiguas y contemporáneas de referencia, en especial con las poblaciones mexicanas, se observa una mayor homogeneidad, por lo que esta variabilidad no significa que se trate de un grupo diferente, pero si probablemente sujeto a algún proceso poblacional especial, como consanguinidad o deriva genética.

5.2.1. Serie precontacto.

La serie más antigua analizada en este estudio, está representada por muestras esqueléticas provenientes de la ciudad de Tlatelolco, ubicada en el lago de Texcoco, en lo que hoy es el estado de México. La distribución de frecuencias de haplogrupos es comparable con la mayoría de las muestras mexicanas de

referencias, tanto antiguas como contemporáneas, lo que nos permite suponer que el modelo de distribución de frecuencias de haplogrupos observados en nativos mexicanos contemporáneos, probablemente sea un modelo que se ha mantenido a lo largo de su historia. Es interesante destacar que Tlatelolco desde sus orígenes se dedicó fundamentalmente al comercio. En esta ciudad existió uno de los mercados indígenas más notables de su tiempo y el más importante de Mesoamérica, estos datos históricos nos permiten suponer una gran movilidad demográfica en esta zona.

La serie precontacto registra distancia genética nula con la serie post-contacto, asimismo, presenta una diversidad genética similar y comparte un mayor número de secuencias con esta serie. Esto no implica que no se detecten niveles de similitud entre precontacto y contacto, sólo que se hace más evidente la continuidad genética de las series precontacto y post-contacto, posiblemente debido a circunstancias históricas inherentes a la serie contacto que intentaremos exponer más adelante.

Kemp y colaboradores (2005), analizaron 23 muestras provenientes del mismo yacimiento precontacto de Tlatelolco, en las que se puede observar una diversidad genética intermedia entre las series antiguas de precontacto y post-contacto; asimismo, no se observan diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las tres series antiguas analizadas en este estudio. En relación a la distancia genética entre precontacto y la serie Azteca de Tlatelolco (MX1.1) es de 0.0397 y entre esta serie antigua (MX1.1) y la serie contacto es nula.

Todos los datos estadísticos anteriormente expuestos, sugieren que existe una relación genética bastante cercana entre las series del Valle Central y las muestras analizadas por Kemp *et al.* (2005); no obstante, en estas muestras, se detectó la presencia de dos individuos con la delección de 9 pares de bases en la región intergénica COII/tRNA^{lys}, que define al haplogrupo B y que además resultaron positivos en el análisis de restricción, para el haplogrupo A. En esta misma investigación, sólo estos dos individuos fueron sometidos a la secuenciación de un fragmento de 125 pb de la región HVI, entre las posiciones 16250-16385, encontrando cambios polimórficos en los sitios 16290, 16319 y 16362, tres de las mutaciones típicas del linaje mitocondrial A, que se pueden detectar en el fragmento que han secuenciado. Es de destacar, que en ninguna de las muestras de la serie

precontacto, ni en las otras dos series, se ha detectado esta particular situación; sin embargo, autores como (Green *et al.* 2000) han referido esta doble asignación en algunos nativos americanos contemporáneos.

El individuo *Ent. 4 (C.46)*, de esta serie precontacto, presenta una transversión C→G, en la posición 16270. Como hemos indicado anteriormente, una transversión en esta posición nucleotídica no es especialmente común; sin embargo, según Excoffier & Yang (1999), este sitio tiene una alta tasa mutacional *in vivo*. Es posible que esta transversión sea simplemente producto de un daño molecular *post-mortem* o de la inserción de bases erróneas durante el proceso de amplificación, aunque la secuencia fue replicada a partir de dos productos de PCR independientes y se observaron los mismos resultados.

5.2.2. Serie contacto.

Los restos esqueléticos de la serie contacto pertenecen a un asentamiento rural de la época colonial (siglo XVI), que tenía poco menos de 2000 habitantes y que estaba ubicado distante a los poblados aledaños; según Prada & Sterpone (1999), en este yacimiento se detectaron dos prácticas de enterramiento. La primera, eran inhumaciones individuales ubicadas en el interior de una capilla y sus alrededores y la segunda, enterramientos de tipo colectivo, ubicados más alejados de la capilla y que sugieren una época de gran mortalidad. Al parecer, según los autores, la pandemia de 1576-1581 pudo ser la responsable de un elevado número de muertes en poco tiempo, lo que obligó al uso de fosas comunes y a la posterior movilización de la población que sobrevivió (aproximadamente el 20% de los habitantes) hacia Tizayuca, el municipio más cercano, razón por la cual se supone que este poblado desapareció aproximadamente en el año 1600.

El nivel de aislamiento de esta colonia sustenta los datos genéticos encontrados en el análisis, lo cual sugiere una posible endogamia, debido al elevado número de individuos caracterizados con el haplogrupo A (0.70) y una disminución significativa de individuos pertenecientes al haplogrupo B (0.10). La distribución atípica de los linajes mitocondriales detectados en esta serie puede ser el resultado de la actuación de la deriva genética, ya que las poblaciones con un bajo número de

habitantes son más vulnerable a los efectos de la deriva genética, reflejando una disminución de la diversidad genotípica de la población.

Como hemos indicado en párrafos anteriores, las nuevas enfermedades traídas por los españoles suscitó una grave reducción de la población indígena, entre ellas la epidemia del año 1576, llamada Cocoliztle¹¹ (Ocaranza 1995), que produjo una fuerte devastación en la población de Tetetzontlilco (hoy Comunidad de Los Olmos), con la muerte de la mayoría de sus habitantes. Según los datos históricos, menos de 400 individuos pudieron sobrevivir a estas enfermedades y fueron obligados a emigrar a otros poblados.

En el análisis de secuencias la serie contacto, exhibe la mayor cantidad de haplotipos únicos. Los individuos de esta serie, comparten 4 secuencias con precontacto y ninguna con la serie post-contacto, con las excepciones de los haplotipos basales, descritos para el fragmento del HVI analizado en este estudio, Pr01A (16223T, 16290T, 16319A, 16362C) y Pr15B (16217C), que son compartidos por las tres series. Siendo la población de la serie contacto un grupo humano tan pequeño, es posible que muchos de sus haplotipos se hayan perdido al morir la mayoría de sus habitantes durante la etapa crítica de las pandemias, y esta sea la causa por la cual, no se detectaron haplotipos compartidos con la serie del post-contacto.

5.2.3. Serie post-contacto.

La inclusión española en las Américas y especialmente en México, produjo altos niveles de flujo génico que, indudablemente, afectaron la estructura demográfica de la región. Por una parte las guerras, las pandemias, el hambre, entre otros factores, produjeron el colapso de la población indígena; y por la otra, un contingente español que llegó a las tierras mexicanas conquistadas estableciendo su capital en el Valle Central y afianzado un sistema colonial que perduró cerca de tres siglos. Asimismo, de forma progresiva también se fueron incorporando a la sociedad colonial, los esclavos negros traídos de África.

¹¹ Cocoliztle en náhuatl quiere decir plaga o epidemia.

Dentro de este mosaico cultural de la época colonial, se destaca el escaso número de mujeres españolas que emigraron al Nuevo Mundo después de la conquista. Las estimaciones establecen que las mujeres constituyeron entre el 5-17% del total de inmigrantes que llegaron a las Américas, durante las primeras décadas del siglo XVI, siendo México y Perú sus principales puntos de destino (Bethel 1990).

Aguirre Beltrán (1972) citado por Martínez *et al.* (2006), señala que para el año 1793, en México, la población europea estaba formada principalmente por hombres adultos, de entre 29-40 años de edad y que las mujeres representaban apenas el 1.5% de la población. Este desequilibrio trajo como principal consecuencia, las mezclas entre hombres españoles y mujeres indígenas o esclavas, que además, eran vistas como menos respetables u objetivos más fáciles para la explotación masculina, motivo por el cual comienza el mestizaje racial, que fue fortaleciéndose progresivamente a lo largo de todo el período colonial. Mestizaje que, obviamente, no es posible detectar a nivel mitocondrial, debido a su exclusiva herencia materna.

Las muestras analizadas de la serie post-contacto, provienen de dos yacimientos representantes de la época colonial, 9 individuos del yacimiento del Convento de Santa María Texcala en el estado de Tlaxcala, que data del período colonial temprano (siglo XVII-XVIII), y 21 individuos del Hospital San Juan de Dios en ciudad de México, que pertenecen al colonial tardío (siglo XIX). Previos análisis de la morfología cráneo-facial en restos esqueléticos de estos mismos yacimientos, determinaron valores morfométricos intermedios entre ancestros españoles y amerindios (Martínez *et al.* 2006), lo cual sugiere que son grupos mestizos.

Los resultados de nuestro estudio a nivel del mtDNA, muestran una composición genética primordialmente Amerindia, que se corresponde con datos de poblaciones aborígenes contemporáneas mexicanas. Se trata pues de individuos de origen materno americano pero que, probablemente, muchos de ellos tengan un linaje paterno europeo. Por otra parte, la distribución de frecuencias de haplogrupos es muy similar a la observada en la serie precontacto que hemos analizado con la excepción de tres individuos del yacimiento Hospital San Juan de Dios (*SJD Ent.21*,

SJD Osario 3 y SJD Osario 13), los cuales resultaron negativos para los principales linajes americanos.

Según Beltrán 1944, citado por Green *et al.* (2000), el número de esclavos africanos que llegaron al México colonial fue aproximadamente de entre 200000-500000 individuos, cifra que posiblemente era mayor, ya que muchos esclavos fueron trasladados de forma ilegal y no eran reportados en los censos. Asimismo, diversos estudios con sistemas genéticos clásicos (Crawford MH, *et al.* 1974; Lisker *et al.* 1996), han definido la composición genética de la población mestiza mexicana contemporánea, como un modelo trihíbrido, y que la variabilidad en la distribución de los tres componentes se debe principalmente a factores geográficos e históricos, pero que en general, es equivalente entre españoles y amerindios, con una relativa menor proporción del aporte africano (Lisker *et al.* 1996; Cerda-Flores *et al.* 2002).

A pesar de que desconocemos el modelo de enterramiento del yacimiento Hospital San Juan de Dios, esta serie representa una población urbana del siglo XIX, ubicada en la ciudad de México, es decir, en el área más poblada del país, y con una estructura básicamente mestiza según los datos de Martínez *et al.* (2006), no obstante, los autores de este trabajo, no consideraron el posible aporte africano en sus análisis, ya que evidencias genéticas, demográficas e históricas sugieren una baja contribución africana en la población de esta región.

Los tres individuos de la serie post-contacto, que no segregaron para ninguno de los haplogrupos fundadores americanos fueron sometidos a restricción para la posición polimórfica 10871 *Mn/I*, que distingue haplogrupos europeos (pre-HV, H, V, U, K, J, T, X, W y otros) de los haplogrupos L1, L2, L3, y M, resultando negativos a un posible linaje europeo. Por lo cual, lo más probable es que estos tres individuos tengan un origen materno africano. Lamentablemente, sólo en uno de estos individuos (*SJD Osario 13*), se confirma este supuesto, con la secuencia del fragmento de 190 pb del HVI, que contiene los sitios polimórficos 16223T, 16278T, 16294T, 16309G, típicos del subhaplogrupo africano L2a.

El subhaplogrupo L2a, es el más común en toda África y parece estar dividido en dos subconjuntos por la mutación 16309G, siendo el grupo que contiene esta mutación más específico del África occidental (Torroni *et al.* 2001). En América, los

esclavos negros procedían fundamentalmente de la franja situada entre Senegal y Angola (costa atlántica del oeste africano), y la secuencia del individuo *SJD Osario 13*, que fue asignada al subhaplogrupo L2a, contiene, además, el cambio nucleotídico G→A en la posición 16309, característica de esta región geográfica, por lo cual, nuestros datos, a nivel mitocondrial, se corresponden con el contexto histórico esclavista de la época.

En relación a los otros dos individuos (*SJD Ent.21*, *SJD Osario 3*) que no se logró verificar por secuenciación del fragmento de la región HVI el posible linaje africano, podemos contemplar además, dos explicaciones alternativas. En primer lugar se puede presumir que se trate de linajes que pertenecen a haplogrupos americanos aún no descritos, o quizás que pertenecen a alguno de los haplogrupos americanos fundadores pero han perdido, por retromutación, el sitio de restricción diagnóstico. En todo caso, la historia esclavista de la colonia y la presencia de un individuo africano en este yacimiento, nos permiten suponer que la explicación más plausible es que estos otros dos individuos también pertenezcan a un linaje africano.

5.2.4. Las series antiguas del Valle Central de México y las poblaciones de comparación.

5.2.4.1. Frecuencias de haplogrupos.

En la comparación entre las series antiguas del Valle Central de México y las 31 poblaciones de referencia (tablas 3.7 y 3.8), en relación a los análisis con frecuencias de haplogrupos (componentes principales, prueba exacta de diferenciación poblacional y distancia genética), se puede observar que el conjunto de las poblaciones mexicanas se comporta como un bloque bien estructurado, con algunas variantes que reflejan cierta diversidad dentro de cada grupo, pero que, de igual manera, se puede detectar una continuidad temporal entre las muestras antiguas y las contemporáneas. En estos análisis, además, se observa que las poblaciones del sur del continente y las muestras Aleutianas quedan más alejadas de las series antiguas del Valle Central de México. Por otra parte, la tribu indígena Haida, perteneciente al grupo Na-Dene (Ward *et al.* 1993), se ubica muy cercana a

las series antiguas mexicanas de contacto y Maya, seguramente por la mayor frecuencia del linaje A.

El *pool* genético del grupo lingüístico Amerindio se caracteriza por presentar una distribución de linajes mitocondriales diferente a los otros dos grupos de Greenberg (1986). Los Esquimo-aleutianos, se caracterizan por alta frecuencia del haplogrupo D, con sus variantes específicas, y ausencia de los haplogrupos B y C (Shields *et al.* 1993; Merriwether *et al.* 1995; Rubicz *et al.* 2003); y las poblaciones del grupo lingüístico Na-Dene pertenecen, casi exclusivamente, al haplogrupo A. Por otra parte, los Amerindios, el grupo más ampliamente distribuido en el continente y al cual pertenecen las series estudiadas en este trabajo, presentan los linajes A, B, C y D con frecuencias que varían de Norte a Sur; de esta manera, con particulares excepciones, en todas las poblaciones amerindias están presentes los 4 principales haplogrupos fundadores, además del haplogrupo X que se restringe a una pequeña área de Norteamérica.

En el conjunto de las poblaciones mexicanas, la serie antigua de post-contacto presenta la mayor diversidad genética (0.7218 ± 0.0619), debido posiblemente, a los tres individuos designados como “otros” y que quizás, como hemos indicado anteriormente, tengan un origen materno africano; por el contrario, la serie antigua de la cultura Maya (González-Oliver *et al.* 2001), exhibe los valores de diversidad genética más bajo (0.2967 ± 0.1150), por lo tanto, el rango de diversidad entre las poblaciones mexicanas varían entre estas dos series, con una media de 0.5701, que se encuentra más cerca de la serie post-contacto que de la serie de la cultura Maya. Cabe destacar que la serie Maya, tiene una muy alta frecuencia del haplogrupo A (0.84) y ausencia de D. Asimismo, el escalamiento multidimensional construido con frecuencias de haplogrupos, a partir de la distancia de Reynolds, muestra que las tres series antiguas se encuentran distanciadas, con pocas excepciones, de las poblaciones del norte, centro y sur del continente, asimismo, están muy próximas entre sí y con todas las poblaciones mexicanas de referencia, incluso la serie de contacto.

Sobre la base de los análisis descritos podemos afirmar que las poblaciones mexicanas y en especial las poblaciones que ocupan el área mesoamericana de México, comparten el mismo *pool* genético, en cuanto a los linajes matrilineales, que

se ha mantenido a través del tiempo. Por lo cual, suponemos que los cambios demográficos que se dieron a la largo de la historia mexicana, como la reducción de la población indígena del siglo XVI (Stern 1994), no influyeron en el DNA mitocondrial de las dos series posteriores a la conquista española, que hemos analizado.

Es de destacar, que en los dos trabajos publicados en series antiguas mexicanas, se analiza la distribución de frecuencias de haplogrupos en individuos de la época precontacto de las culturas Maya y Azteca (González-Oliver *et al.* 2001; Kemp *et al.* 2005). Nuestros análisis en las series coloniales de las épocas de contacto y post-contacto, representan los primeros estudios genéticos realizados en restos arqueológicos provenientes del proceso de mestizaje mexicano.

5.2.4.2. Secuencias HVI.

Está bien documentado que la población actual de México es, básicamente, mestiza (Lisker *et al.* 1996); no obstante, el aporte principalmente europeo, que pudo suceder durante la época colonial, es difícilmente detectable a nivel mitocondrial, y probablemente aquellas muestras poblacionales contemporáneas, que presenten haplogrupos no americanos, sean el producto de mezclas recientes, y no una base genética ancestral, por lo cual no fueron considerados en nuestros análisis. Por otra parte, es lamentable que no hallan sido publicadas secuencias de la región HVI ni de series antiguas, ni de poblaciones contemporáneas mexicanas, con la excepción del trabajo publicado por Green *et al.* (2000) en una muestra de la población actual ubicada al norte de México, en el estado de Chihuahua, que no forma parte del área geográfica de la antigua Mesoamérica, pero que nos permitió evaluar la filogenia de nuestras secuencias dentro del contexto mexicano.

Las secuencias obtenidas en las series antiguas del Valle Central de México fueron comparadas con secuencias publicadas de 18 poblaciones americanas y 2 asiáticas (12 contemporáneas y 8 series antiguas), tomando como base un fragmento de 162 pb de la región HVI del mtDNA, entre las posiciones 16209-16370. La mayoría de las mutaciones diagnósticas para los haplogrupos fundadores americanos, se encuentran dentro del fragmento que hemos analizado, en

concordancia con lo indicado por Gilbert *et al.* 2003a; no obstante, queda claro que algunas variantes, como C→T en la posición 16111, típica del haplogrupo A americano, no pudieron ser evaluadas. Según algunos autores (Forster *et al.* 1996; Starikovskaya *et al.* 1998), esta mutación define el sublinaje A2, que no ha sido encontrado en poblaciones asiáticas contemporáneas, con la excepción de algunos aborígenes del área geográfica que incluye Beringia.

El índice de diversidad genética, calculado a partir de las secuencias, presenta valores que oscilan entre 0.6000 ± 0.0643 de la población Na-Dene de Canadá y 0.9938 ± 0.0126 en la serie antigua de Chile. Las series antiguas del Valle Central de México se posicionan entre las 10 poblaciones con los valores más altos, siendo la serie contacto la que tiene la menor diversidad de las tres series antiguas. Al comparar los índices de diversidad genética obtenidos con frecuencias de haplogrupos y con secuencias nucleotídicas de la región HVI, se observa que los valores estimados a partir de frecuencias de haplogrupos oscilan entre rangos menores, que los estimados a partir de secuencias. Asimismo, las posiciones ocupadas por la mayoría de las poblaciones de comparación varían, sensiblemente, entre los análisis con las dos bases de datos diferentes (tabla 5.1), lo que sugiere que la información proporcionada por las frecuencias de haplogrupos puede ser limitada cuando se evalúa este parámetro (Montiel 2001).

En relación con la reconstrucción filogenética, a partir de la distancia de Reynolds, entre las secuencias de la región HVI de las poblaciones de referencia, se puede observar una distancia genética nula entre las series antiguas de precontacto y post-contacto, mientras que la serie contacto se observa un poco más alejada; igualmente, en un contexto general, las tres series del Valle Central exhiben una menor distancia sólo con la población Amerindia de Canadá y además, precontacto y post-contacto presentan distancias nulas con la serie antigua del noroeste de Estados Unidos.

Tabla 5.1.
Índice de Diversidad genética estimados a partir de
secuencias y de haplogrupos.

$\hat{H} \pm sd$		$\hat{H} \pm sd$	
Población	Secuencias	Población	Haplogrupos
ND.2	0.6000 $\pm$ 0.0643	ND.2	0.2321 $\pm$ 0.0850
AL.2	0.6486 $\pm$ 0.0368	DR.1	0.3913 $\pm$ 0.0912
BR.2	0.6566 $\pm$ 0.0257	AL.2	0.4538 $\pm$ 0.0236
EC.2	0.6655 $\pm$ 0.0387	CNMX.1	0.4874 $\pm$ 0.0972
CR.2	0.7034 $\pm$ 0.0721	CR.2	0.4966 $\pm$ 0.0799
VZ.2	0.8422 $\pm$ 0.0215	AR.1	0.5011 $\pm$ 0.0336
PN.2	0.8512 $\pm$ 0.0257	VZ.2	0.5412 $\pm$ 0.0243
AR.1	0.8596 $\pm$ 0.0696	CB.1	0.5619 $\pm$ 0.0954
US3.1	0.8745 $\pm$ 0.0274	BR.2	0.5737 $\pm$ 0.0259
CH.2	0.8881 $\pm$ 0.0259	CH.2	0.5833 $\pm$ 0.0150
MX1.2	0.8977 $\pm$ 0.0274	PRMX.1	0.6552 $\pm$ 0.0531
CA.2	0.8996 $\pm$ 0.0196	CA.2	0.6577 $\pm$ 0.0368
DR.1	0.9064 $\pm$ 0.0405	PR.2	0.6686 $\pm$ 0.0623
CNMX.1	0.9077 $\pm$ 0.0501	PN.2	0.6750 $\pm$ 0.0173
CB.1	0.9238 $\pm$ 0.0440	MX1.2	0.7010 $\pm$ 0.0116
BR.1	0.9281 $\pm$ 0.0401	US2.1	0.7011 $\pm$ 0.0366
PRMX.1	0.9316 $\pm$ 0.0301	US3.1	0.7028 $\pm$ 0.0268
PTMX.1	0.9354 $\pm$ 0.0335	EC.2	0.7055 $\pm$ 0.0185
MG.1	0.9500 $\pm$ 0.0158	PTMX.1	0.7218 $\pm$ 0.0619
SS.2	0.9610 $\pm$ 0.0122	MG.1	0.7305 $\pm$ 0.0545
PR.2	0.9659 $\pm$ 0.0178	CH.1	0.7568 $\pm$ 0.0228
US2.1	0.9701 $\pm$ 0.0171	SS.2	0.8217 $\pm$ 0.0218
CH.1	0.9938 $\pm$ 0.0126	BR.1	0.8366 $\pm$ 0.0445

Se destacan en color los valores de diversidad de las series antiguas del Valle Central de México.

La distancia de Reynolds considera la frecuencia de un haplotipo dentro de cada pareja de poblaciones, por lo cual, las poblaciones con mayor número de haplotipos compartidos y de frecuencias similares tienden a presentar distancias más próximas. Cuando consideramos el análisis con las frecuencias de haplogrupos, la población contemporánea del centro-norte de México (estado de Chihuahua), exhibe distancias menores con las series precontacto y post-contacto y ligeramente superior con la serie contacto; no obstante, en el análisis con secuencias, las distancias entre estos mismos grupos aumentaron significativamente.

En definitiva, es importante tomar en consideración estas discrepancias a la hora de decidir realizar reconstrucciones filogenéticas tomando como base sólo frecuencias de haplogrupos y en estos casos el análisis más idóneo sería la prueba exacta de diferenciación poblacional, que resuelve diferencias entre poblaciones, sin que esto conlleve relaciones de tipo filogenéticas. Estas consideraciones fueron

hechas por Montiel (2001), y se fortalecen aún más en este estudio, por el mayor número de individuos analizados y de secuencias obtenidas a partir de material arqueológico. No obstante, es importante destacar que a pesar de las enormes dificultades técnicas que conlleva la secuenciación de fragmentos de la región HVI, la información que se pueda obtener a partir de muestra antiguas con este método, por mínima que sea, compensa el esfuerzo realizado.

Siendo que las distancias estimadas a partir de secuencias consideran información genética más específica, queda claro que la población contemporánea del norte de México, está distanciada de las series antiguas analizadas en este estudio; contrariamente a lo esperado, cuando consideramos los haplotipos compartidos, las series antiguas del Valle Central comparten el mayor número de secuencias con esta muestra del norte de México. Es probable que los haplotipos compartidos entre la población contemporánea y las series antiguas del Valle Central sean el producto del flujo génico que, posiblemente, pudo suceder de forma continuada y bidireccional desde épocas precolombinas entre ambas regiones, lo cual se sustenta por hallazgos como el cultivo de maíz que supone una influencia mesoamericana en estos pueblos.

Muchas de las poblaciones del norte de México, fueron fundadas por grupos nómadas, familias de los Anasazi. Estas culturas llamadas Hohokam y Mogollón habitaron las tierras desérticas del norte mexicano entre 600 a.C y 1200 d.C. (Mendiola 2002). La cultura Mogollón se relaciona directamente con el área geográfica que ocupa el actual estado de Chihuahua, de donde proviene la muestra contemporánea mexicana de referencia. También es importante destacar que en la región del Valle Central de México, la época prehispánica se caracterizó por las migraciones de grupos provenientes del norte; en primer lugar los llamados Toltecas que establecieron su imperio en el Valle de México, luego los Chichimecas que se impusieron en la región central y dos siglos más tarde las tribus Nahuas que también llegaron al Valle de México procedentes del norte (Gutiérrez de Hoyos & Muñoz [s.f.]).

Veintinueve secuencias, que representan el 37% del total secuenciado, resultaron ser únicas cuando comparamos las tres series del Valle Central de México; sin embargo, en los análisis poblacionales y en especial en los *Median Joining*

Networks, contruidos para cada uno de los haplogrupos fundadores americanos, se pudo constatar que 12 de esos 29 haplotipos (6 de la serie contacto y 6 de la serie post-contacto), no eran únicos dentro del contexto de las poblaciones americanas, sino que han sido descritos previamente por otros autores.

Los haplotipos Cn15A, Cn22C, Pt11A y Pt20B, son compartidos exclusivamente con secuencias de la población mexicana del estado de Chihuahua, con la excepción del Cn15A, que además, se observa en las series antiguas de Mongolia y de la cultura Oneota, Estados Unidos. Este haplotipo exhibe las posiciones típicas de A, para el fragmento analizado, 16223T, 16290T, 16319A, 16362C, y además, la mutación 16274A; obviamente, la secuencia asiática, se diferencia por la ausencia de la posición polimórfica 16111T (lo cual se puede verificar en Keyser-Tracqui *et al.* 2003), y que no podemos evaluar en el fragmento analizado, lo que nos indica que para comparar grupos americanos y asiáticos, al menos para los linajes de A, se hace indispensable aumentar el tamaño del fragmento HVI.

Tomando en consideración las comparaciones con las poblaciones de referencia, la serie contacto sigue siendo la que exhibe el mayor número de secuencias únicas, entre las tres series antiguas mexicanas; hay que recordar que se trata de un pequeño poblado que se originó y desapareció como consecuencia del proceso de colonización; no obstante, es indudable, que la mayoría de sus linajes, están presentes en otras poblaciones del continente.

En relación a las secuencias únicas observadas en la serie precontacto que no fueron encontradas en ninguna de las poblaciones de referencia, pudiéramos plantearnos dos posibles hipótesis. La primera y considerando que la serie precontacto es la más antiguas de las tres del Valle Central analizadas, podrían tratarse de haplotipos muy ancestrales que, posiblemente, han desaparecido como consecuencia de procesos de deriva genética. Por otra parte, también podemos suponer que no se hayan analizado suficientes poblaciones, tanto contemporáneas como antiguas, o bien que el tamaño de muestra de las poblaciones analizadas sea muy pequeño; por lo tanto, si se analizan más poblaciones o se incrementen los números muestrales, estos linajes propios podrían dejar de serlo.

Comparando cada una de las posiciones nucleotídicas de las siete secuencias únicas de precontacto, con los sitios específicos con mayor tasa mutacional *in vivo* (Excoffier & Yang 1999) y con mayor daño molecular *post-mortem* (Gilbert *et al.* 2003a), la muestra Pr22B presenta los cambios 16270G y 16278T que son consistentes con altos niveles mutacionales *in vivo*, como de daño molecular *post-mortem*; además de la posición diagnóstica para el haplogrupo al cual pertenece. Sobre la base de estos datos es posible que esta secuencia sea un ejemplo de un daño molecular posterior a la muerte; sin embargo, es de resaltar que un individuo de la población mexicana contemporánea, perteneciente al haplogrupo B presenta el mismo cambio nucleotídico C→T en la posición 16278, al igual que un individuo de la serie post-contacto, lo que en definitiva, nos sugiere que el daño molecular, si es que existe, posiblemente sea, sólo la transversión 16270G. El resto de los cambios observados en las secuencias únicas precontacto en comparación con los datos aportados por Gilbert y colaboradores (2003a), no presentan niveles de daño molecular *post-mortem*, por lo cual pudiéramos sostener la hipótesis de que se trata de secuencias muy antiguas que se han podido perder a través del tiempo.

Este mismo análisis de comparación lo realizamos con las secuencias únicas de las series contacto y post-contacto. Los cambios 16234T, 16265G, 16278T que presentan los individuos (Cn10A, Cn17A y Pt12A) están sujetos a elevados niveles de daño *post-mortem*, según los datos de Gilbert *et al.* (2003a); no obstante, la posición 16234T tiene una alta frecuencia en individuos aleutianos pertenecientes al haplogrupo A (Rubicz *et al.* 2003), al igual que la secuencia de la serie contacto y la posición 16278T la exhiben individuos de la población actual de Canadá (Ward *et al.* 1993), igualmente pertenecientes al haplogrupo A. Por tanto, estas coincidencias minimizan la posibilidad de que estos cambios nucleotídicos en las series antiguas del Valle Central de México representen daños moleculares *post-mortem*. Otro de los casos de especial interés por es el individuo Pt19B con el cambio nucleotídico 16223T que ya fue analizado en párrafos anteriores.

Con los datos obtenidos en las series contacto y post-contacto, y su relación con los datos genéticos tanto de series anteriores a la conquista, como los aportados en este estudio (precontacto-Tlatelolco) y los de González-Oliver *et al.* (2001) y Kemps *et al.* (2005), como de datos de poblaciones actuales, se podría inferir que, efectivamente, el contacto europeo produjo un colapso en la población indígena (tal

es el caso del poblamiento de Tetetzontlilco-serie contacto); sin embargo, las evidencias de continuidad genética indican que no se observa una pérdida substancial ni de la variabilidad, ni de los linajes a nivel del DNA mitocondrial, queda entonces verificar si a nivel de linajes paternos sucede este mismo modelo. Asimismo, sería interesante verificar si en la población general mexicana actual, se observa un mayor número de linajes americanos y su frecuencia. Como se ha indicado anteriormente, son pocos los estudios sobre mtDNA publicados en poblaciones mexicanas; sin embargo, en las poblaciones de referencias se puede observar que son fundamentalmente mestizas pero con una alta frecuencia de linajes americanos.

Los linajes únicos y compartidos entre las tres series mesoamericanas, que han sido descritos en otras poblaciones, nos permiten deducir que las series antiguas del Valle Central de México tienen una continuidad, por vía materna, dentro del contexto de las poblaciones americanas y especialmente con la población mexicana contemporánea que hemos tomado como referencia. Afirmación que se hace evidente en el haplotipo 3-02B, compartido por un individuo precontacto, uno post-contacto y uno de México contemporáneo y el haplotipo 2-04B, compartido por un individuo post-contacto y uno de México contemporáneo, del cual deriva el individuo Pr22B de precontacto, que si se comprueba que la transversión 16270G es producida por un daño molecular quedaría incluida dentro de este mismo haplotipo, entre otros. Además, también se observa una mayor afinidad, desde la visión del DNA mitocondrial, entre las series antiguas mesoamericanas y las poblaciones del norte del continente como lo observamos en los haplotipos 2-04A y 12-05A, que son compartidos exclusivamente, entre la serie contacto y los amerindios de Canadá. Obviamente, en todos los casos, con las reservas debidas a la limitación del fragmento analizado, ya que es posible que estos haplotipos no sean iguales en lo que resta de secuencia.

Asimismo, estos linajes únicos y compartidos entre las series del Valle Central de México que han sido descritos en otras poblaciones americanas, ratifican la autenticidad del DNA obtenido a partir de los restos esqueléticos mesoamericanos, ya que la mayoría de las secuencias están representadas dentro de la filogenia americana, indicando así, que el modelo mutacional es propio y no producto de contaminaciones o daños moleculares.

5.3. Análisis de STRs autosómicos

El análisis de STRs autosómicos en DNA altamente degradado puede generar artefactos durante la PCR. Esto es especialmente cierto si los extractos contienen baja cantidad de DNA y además éste se encuentre muy degradado (Binladen *et al.* 2006). En el trabajo presentado por von Wurmb-Schwark y colaboradores (2003), en el cual simulaban un proceso de degradación artificial de DNA en tejido óseo, se demostró que las amplificaciones utilizando un *kit* comercial para 15 STRs además del gen de la amelogenina, a partir de estas muestras envejecidas *in vitro*, no se lograron resultados positivos en ninguno de los casos; no obstante, al amplificar mtDNA y de nDNA en una PCR-Duplex, lograron obtener, en algunos casos, fragmentos de 164 pb de nDNA y de 260 pb de mtDNA.

Binladen *et al.* (2006), recuperaron aDNA de varios especímenes preservados en depósitos de *permafrost*, temperatura ambiente, entre otros medios de conservación; que fueron analizados tanto mtDNA como nDNA, demostrando la presencia de daño molecular en ambos materiales genéticos; además, los autores indican que no existen diferencias significativas entre la frecuencia de daños detectados en el DNA mitocondrial y los daños detectados en el DNA nuclear, a pesar de las diferencias en el número de copias de cada uno por células. No obstante, en la literatura se han publicado estudios de STRs autosómicos analizados con *kits* comerciales en restos humanos antiguos, estableciendo una completa identificación de los locus analizados (p ej. Schmerer *et al.* 1999; Ricaut *et al.* 2004 y Ricaut *et al.* 2005, entre otros).

En nuestro caso, debido al buen rendimiento obtenido en el análisis de mtDNA, intentamos analizar STRs autosómicos a partir de PCR-Multiplex, que amplifican fragmento entre 80 y 300 pb. Con la obtención de los posibles locus entre el mayor número de muestras de las series analizadas, además de la posibilidad de realizar análisis con poblaciones mexicanas actuales, queríamos definir la posible relación de consanguinidad que pudieran presentarse entre algunos los grupos, como es el caso de la serie contacto, ya que ha presentado una alta frecuencia del haplogrupo A, y ha manifestado diferencias significativas, a nivel mitocondrial, con

las otras dos series antiguas analizadas. Sin embargo, no se logró obtener resultados positivos para ninguno de las muestras analizadas.

Los datos históricos sobre el yacimiento sugieren que parte de los enterramientos eran de tipo colectivo, posiblemente debido a una etapa crítica de alto índice de mortalidad, como hemos indicado en párrafos anteriores, o bien se trataba de tumbas familiares; de hecho no se dispone de datos tafonómicos que indiquen la simultaneidad o no de los enterramientos. A pesar de ello, sólo encontramos dos posibles enterramientos compartidos con individuos posiblemente consanguíneos, en ambos casos, que pertenecen al haplogrupo A. Es posible que el simple hecho de ser el haplogrupo de mayor frecuencia sea lo que determine esta similitud; en todo caso, no fue posible verificar la posible relación de consanguinidad entre estos individuos mediante el análisis de STRs.



Coatlicue
Diosa de la Tierra y Madre de Huitzilopochtli

6. Conclusiones

6.1. En relación a la metodología.

- En general, las muestras analizadas presentan una buena preservación, lo que ha condicionado, posiblemente, una mejor conservación del DNA en relación a otras series poblacionales analizadas en nuestro laboratorio de DNA antiguo.
- Las mejoras en la obtención de la muestra con la utilización de instrumental odontológico especializado y en los protocolos de extracción y de amplificación mediante PCR establecidos en el laboratorio de DNA antiguo de la UAB, con la incorporación de nuevas medidas de esterilización y la adecuación de un laboratorio de uso exclusivo para aDNA, han aumentado la eficiencia en la recuperación del DNA y han disminuido la posibilidad de contaminación.
- La incorporación de un protocolo de reacción de secuenciación en nuestro laboratorio, también ha favorecido a una mayor efectividad en cuanto al porcentaje de secuencias de la región HVI obtenidas.
- A nivel de procedimiento, la autenticidad del DNA obtenido está fuertemente soportado por el uso de controles de extracción y de amplificación, extracciones múltiples a partir de un mismo individuo, análisis desde el mismo producto de PCR o desde distintos productos de PCR de un mismo extracto.
- No se han observado prácticamente coincidencias entre las posiciones nucleotídicas de las secuencias del Valle Central de México con los sitios comprobados como de mayor daño molecular *post-mortem*, por lo cual se puede sostener que se trata de secuencias endógenas.

6.2. En relación a los análisis poblacionales y filogenéticos.

- La correspondencia entre los polimorfismos de restricción y los polimorfismos de la región HVI del mtDNA es prácticamente absoluta, lo cual confirma que se trata de un método eficaz para autenticar resultados con DNA antiguo.
- Las muestras pertenecientes a las tres series antiguas del Valle Central mexicano corresponden a uno de los cuatro principales linajes mitocondriales fundadores (A, B, C y D), lo cual confirma que se trata de Nativos americanos.
- La distribución de frecuencias de haplogrupos muestra que las poblaciones mexicanas constituyen un grupo bien definido que agrupa todas las poblaciones antiguas y contemporáneas, incluidas las series antiguas analizadas.
- Se presentan las primeras secuencias mitocondriales en muestras antiguas mexicanas, en las cuales se observa un elevado grado de diversidad haplotípica, lo que supone una variabilidad en el *pool* genético mitocondrial y sustenta una mínima posibilidad de contaminación entre las muestras.
- Los procedimientos de reconstrucción filogenética nos permiten deducir que las series antiguas del Valle Central de México tienen un vínculo por vía matrilineal con el resto de las poblaciones americanas, y especialmente con la población mexicana contemporánea de referencia. Esto además, ratifica la autenticidad del DNA obtenido a partir de los restos esqueléticos mesoamericanos.
- Los haplotipos únicos encontrados en las tres series podrían tratarse de linajes antiguos que, posiblemente, han desaparecido como consecuencia de procesos de deriva genética. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que no se hayan analizado suficientes poblaciones, por lo cual

al aumentar tanto el número como el tamaño muestral, estos linajes propios podrían dejar de serlo.

- La distribución atípica de los linajes mitocondriales de la serie contacto determina bajos niveles de diversidad genética, lo cual supone una posible endogamia debido al nivel de aislamiento al cual estuvo sometido esta colonia. Ello indica que esta población pudo sufrir un fuerte declive producto del proceso de colonización (epidemias, hambruna, etc.) que propició la pérdida de tipos mitocondriales. Este mismo efecto en otras poblaciones podría haber derivado en una pérdida de la variabilidad genética autóctona prehispánica.
- No ha sido posible detectar el grado de parentesco dentro de cada una de las series debido a la prácticamente nula eficiencia en los análisis de STRs autosómicos. La comparación de secuencias de mtDNA ha ofrecido sólo 4 coincidencias en tumbas compartidas (3 parejas de la serie precontacto y 1 de la serie contacto), dato evidentemente insuficiente para confirmar las relaciones de parentesco, aunque aporta datos a favor de ello.
- En cuanto al impacto genético, especialmente a nivel de linajes maternos, del proceso de colonización española en México, en las series con dataciones posteriores al Descubrimiento de las Américas, está virtualmente ausente el aporte europeo debido, posiblemente, a que el proceso de mestizaje que se produjo durante los siglos XVI y XIX fue de tipo unidireccional: hombre español – mujer indígena.
- El hallazgo de tres individuos de la época post-contacto (siglo XIX) con posibles linajes maternos africanos, se corresponde con el modelo esclavista de la época y muestra su mestizaje con la población indígena. Desde el establecimiento de la colonia española en México, un número importante de esclavos negros fueron trasladados desde la costa atlántica del oeste africano al Nuevo Mundo. El linaje de al menos uno de los tres individuos corresponde al subhaplogrupo L2a, exhibiendo el haplotipo más frecuente en el área geográfica del cual procedía el mayor contingente de esclavos.

- El contenido de información del fragmento de 162 pb de la región HVI entre las posiciones 16209-16370, no es suficiente para inferir reconstrucciones filogenéticas entre poblaciones asiáticas y americanas, en especial, en cuanto a la variabilidad haplotípica del linaje mitocondrial A.



Códice azteca.

7. Bibliografía

7. Bibliografía.

- ♦ Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, Cruciani F, Zeviani M, Briem E, Carelli V, Moral P, Dugoujon JM, Roostalu U, Loogvali EL, Kivisild T, Bandelt HJ, Richards M, Villems R, Santachiara-Benerecetti AS, Semino O, 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. *Am J Hum Genet.* 75(5):910-8.
- ♦ Achilli A, Rengo C, Battaglia V, Pala M, Olivieri A, Fornarino S, Magri C, Scozzari R, Babudri N, Santachiara-Benerecetti AS, Bandelt HJ, Semino O, Torroni A. 2005. Saami and Berbers—an unexpected mitochondrial DNA link. *Am J Hum Genet.* 76(5):883-6.
- ♦ Adcock GJ, Dennis ES, Easteal S, Huttley GA, Jermini LS, Peacock WJ, Thorne A. 2001. Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implications for modern human origins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(2):537-42.
- ♦ Adovasio J, Page J. 2003. The First Americans. In: *Pursuit of Archaeology's Greatest Mystery.*
- ♦ Aguirre Beltrán G. 1972. La población negra de México. Estudio etnohistórico. Fondo de Cultura Económica. Ciudad de México.
- ♦ Alves-Silva J, Santos MS, Guimaraes PEM, Ferreira ACS, Bandelt H-J, Pena SDJ, Prado VF. 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67:444–61.
- ♦ Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290(5806):457-65.
- ♦ Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 23(2):147.
- ♦ Bandelt HJ. 2005. Mosaics of ancient mitochondrial DNA: positive indicators of nonauthenticity. *Eur J Hum Genet.* 13(10):1106-12.
- ♦ Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16(1):37-48.
- ♦ Bandelt HJ, Herrnstadt C, Yao YG, Kong QP, Kivisild T, Rengo C, Scozzari R, Richards M, Villems R, Macaulay V, Howell N, Torroni A, Zhang YP. 2003. Identification of Native American founder mtDNAs through the analysis of complete mtDNA sequences: some caveats. *Ann Hum Genet.* 67(Pt 6):512-24.

- ♦ Barnes I, Matheus P, Shapiro B, Jensen D, Cooper A. 2002. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science*. 295(5563):2267-70.
- ♦ Barrot C, Sanchez C, Ortega M, Gonzalez-Martin A, Brand-Casadevall C, Gorostiza A, Huguet E, Corbella J, Gene M. 2005. Characterisation of three Amerindian populations from Hidalgo State (Mexico) by 15 STR-PCR polymorphisms. *Int J Legal Med*. 119(2):111-5.
- ♦ Beltrán AG. 1944. The slave trade in Mexico. *Hispanic Am Hist Rev*. 24:412–31.
- ♦ Bethel L. 1990. *Historia de América Latina*. Ed. Crítica. Tomo IV. pp: 110. Barcelona.
- ♦ Bianchi NO, Catanesi CI, Bailliet G, Martínez-Marignac VL, Bravi CM, Vidal-Rioja LB, Herrera RJ, López-Camelo JS. 1998. Characterization of ancestral and derived Y-chromosome haplotypes of New World native populations. *Am J Hum Genet*. 63(6):1862-71.
- ♦ Binladen J, Wiuf C, Gilbert MT, Bunce M, Barnett R, Larson G, Greenwood AD, Haile J, Ho SY, Hansen AJ, Willerslev E. 2006. Assessing the fidelity of ancient DNA sequences amplified from nuclear genes. *Genetics*. 172(2):733-41.
- ♦ Bonatto SL, Salzano FM. 1997. Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups and their implications for the peopling of the New World. *Am J Hum Gen*. 61:1413-1423.
- ♦ Bortolini MC, Da Silva WA Junior W, De Guerra DC, Remonatto G, Mirandola R, Hutz MH, Weimer TA, Silva MC, Zago MA, Salzano FM. 1999. African-derived South American populations: A history of symmetrical and asymmetrical matings according to sex revealed by bi- and uni-parental genetic markers. *Am J Hum Biol*. 11(4):551-563.
- ♦ Bromham L, Eyre-Walker A, Smith NH, Smith JM. 2003. Mitochondrial Steve: paternal inheritance of mitochondrial in humans. *Trends Ecol Evol*. 18(1):2-4.
- ♦ Brown WM, George M Jr, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(4):1967-71.
- ♦ Brown MD, Hosseini SH, Torroni A, Bandelt HJ, Allen JC, Schurr TG, Scozzari R, Cruciani F, Wallace DC. 1998. mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/Western Asia and North America? *Am J Hum Genet*. 63(6):1852-61.
- ♦ Bryan A, Casamiquela R, Cruxent JM, Gruhn R, Ochsenius C. 1978. An El Jobo mastodon kills at Taima-taima, Venezuela. *Science*. 200:1275-7.
- ♦ Budowle B, Moretti T. 1999. Genotype Profiles for Six Population Groups at the 13 CODIS Short Tandem Repeat Core Loci and Other PCR-Based Loci. *Forensic Sci Comuications*. 1(2).
Disponibile en: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july1999/budowle.htm>

- ♦ Burger J, Hummel S, Hermann B, Henke W. 1999. DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*. 20(8):1722-8.
- ♦ Cann RL, Wilson AC. 1983. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics*. 104(4):699-711.
- ♦ Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 325(6099):31-6.
- ♦ Cano RJ, Poinar HN, Pieniazek NJ, Acra A, Poinar GO Jr. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature*. 363(6429):536-8.
- ♦ Carlyle SW, Parr RL, Hayes MG, O'Rourke DH. 2000. Context of maternal lineages in the Greater Southwest. *Am J Phys Anthropol*. 113(1):85-101.
- ♦ Carmack R, Gasco J, Gossen G. 1996. *The Legacy of Mesoamerica*. Prentice Hall, New Jersey.
- ♦ Casanova M, Leroy P, Boucekkine C, Weissenbach J, Bishop C, Fellous M, Purrello M, Fiori G, Siniscalco M. 1985. A human Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance. *Science*. 230:1403-6.
- ♦ Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldana HA, Cortes-Prieto LM, Barajas LO, Rivas F, Carracedo A, Zhong Y, Barton SA, Chakraborty R. 2002. Genetic admixture in three Mexican mestizo populations based on DS180 and HLA-DQA1 loci. *Am J Hum Biol*. 14:257-63.
- ♦ Cipollaro M, Galderisi U, Di Bernardo G. 2005. Ancient DNA as a multidisciplinary experience. *J Cell Physiol*. 202(2):315-22. Review.
- ♦ Corrêa AA. 1928. Nouvelle hypothèse sur le peuplement de l'Amérique du Sud. *Ann Faculd Cienc Port*. 15:5-31.
- ♦ Cooper A, Poinar HN. 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*. 289(5482):1139.
- ♦ Cottevaille-Giraudet R. 1931. *Les relations probables de l'Europe et de l'Amérique du Nord à l'Age du Renne*. Paris.
- ♦ Crawford MA. 1998. *The origins of Native Americans. Evidence from Anthropological Genetics*. Cambridge University Press. New York.
- ♦ Crawford MH, Leyshon WC, Brown K, Lees F, Taylor L. 1974. Human biology in Mexico. II. A comparison of blood group, serum and red cell enzyme frequencies, and genetic distances of the Indian populations of Mexico. *Am J Phys Anthropol*. 41(2):251-68.

- ♦ Crandall KA, Templeton AR. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*. 134:959–969.
- ♦ Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R. 1997. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(3):1041-6.
- ♦ Davis SA. 1991. Two Concentrations of Palaeo-Indian Occupation in the Far Northeast. *J Am Archaeol*. 3:31-56.
- ♦ Degusta D, Cook CH, Sensabaugh G. 1994. Dentin as a source of ancient DNA. *Ancient DNA newsletter*. 2(1):13.
- ♦ Derbeneva OA, Sukernik RI, Volodko NV, Hosseini SH, Lott MT, Wallace DC. 2002. Analysis of mitochondrial DNA diversity in the aleuts of the commander islands and its implications for the genetic history of beringia. *Am J Hum Genet*. 71(2):415-21.
- ♦ Derenko MV, Malyarchuk BA, Dambueva IK, Shaikhaev GO, Dorzhu CM, Nimaev DD, Zakharov IA. 2000. Mitochondrial DNA variation in two South Siberian Aboriginal populations: implications for the genetic history of North Asia. *Hum Biol*. 72(6):945-73.
- ♦ Derenko MV, Grzybowski T, Malyarchuk BA, Czarny J, Miscicka-Sliwka D, Zakharov IA. 2001. The presence of mitochondrial haplogroup X in Altaians from South Siberia. *Am J Hum Genet*. 69(1):237-41.
- ♦ Díaz N, Solórzano E, Montiel R, García C, Yañez C, Malgosa A. 2004. Determination génétique de l'individu Néolithique de Segudet (Ordino), les restes humains les plus anciens d'Andorre. *Antropo*. 7:39-44.
Disponible en: www.didac.ehu.es/antropo
- ♦ Di Benedetto G, Nasidze IS, Stenico M, Nigro L, Krings M, Lanziger M, Vigilant L, Stoneking M, Pääbo S, Barbujani G. 2000. Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps. *Eur J Hum Genet* 8:669-77.
- ♦ Dillehay TD. 2004. Monte Verde. Un Asentamiento Humano del Pleistoceno Tardío en el Sur de Chile. Colección Serie Universitaria, LOM Ed. Universidad Austral de Chile. pp: 173. Santiago.
- ♦ Dillehay TD, Pino M. 2000. The Settlement of the Americas. A New Prehistory. Basic Books, New York.
- ♦ Dillehay TD, Rossen J, Maggard G, Stackelbeck K, Netherly P. 2003. Localization and possible social aggregation in the Late Pleistocene and Early Holocene on the North Coast of Peru. *Quaternary Intern*. 109-110:3-11.
- ♦ Dixon EJ. 1993. Quest for the Origins of the First Americans. Albuquerque Eds. University of New Mexico Press. New Mexico.

- ♦ Dixon EJ. 1999. Bones, boats and bison; archaeology and the first colonization of western North America. Albuquerque Eds. University of New Mexico Press. pp: 322. New Mexico.
- ♦ Donnelly P, Tavaré S. 1986. The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability*. 18:1–19.
- ♦ Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, 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 Acad Sci U S A*. 95(21):12637-40.
- ♦ Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*. 12(2):241-53.
- ♦ Enríquez JA, Martínez F, Garese R, López MJ, Pérez A, Bornstein B, Montoya J. 1998. Sistema genético mitocondrial humano. *Rev Neurol*. 26 (Supl 1): S21-S26.
- ♦ Erickson DL, Smith BD, Clarke AC, Sandweiss DH, Tuross N. 2005. An Asian origin for a 10,000-year-old domesticated plant in the Americas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(51):18315-20.
- ♦ Eshleman JA, Malhi RS, Smith DG. 2003. Mitochondrial DNA studies of Native Americans: Conceptions and misconceptions of the population prehistory of the Americans. *Evol Anthropol*. 12:7-18.
- ♦ Excoffier L, Yang Z. 1999. Substitution rate variation among sites in mitochondrial hypervariable region I of humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 16(10):1357-68.
- ♦ Fagundes NJ, Bonatto SL, Callegari-Jacques SM, Salzano FM. 2002. Genetic, geographic, and linguistic variation among South American Indians: possible sex influence. *Am J Phys Anthropol*. 117(1):68-78.
- ♦ Fedje D. 2002. The early post-glacial history of the northern Northwest Coast: a view from Haida Gwaii and Hecate Strait. *Athena Rev*. 3:28-30.
- ♦ Fiedel SJ. 2000. The Peopling of the New World: Present Evidence, New Theories, and Future Directions. *J Archaeol Res*. 8(1):39-103.
- ♦ Filosto M, Mancuso M, Vives-Bauza C, Vila MR, Shanske S, Hirano M, Andreu AL, DiMauro S. 2003. Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann Neurol*. 54(4):524-6.
- ♦ Fix AG. 2002. Colonization models and initial genetic diversity in the Americas. *Hum Biol*. 74(1):1-10.
- ♦ Fix AG. 2005. Rapid deployment of the five founding Amerind mtDNA haplogroups via coastal and riverine colonization. *Am J Phys Anthropol*. 128(2):430-6.

- ♦ Fladmark K. 1979. Routes: Alternate Migration Corridors for Early Man in North America. *American Antiq.* 44:55-69.
- ♦ Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. 1996. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet.* 59(4):935-45.
- ♦ Francalacci P. 1995. DNA recovery from ancient tissue: problems and perspectives. *Human Evol.* 10(1):81-91.
- ♦ García-Bárcena J. 1998. Matutes de Santa Isabel Iztapan. *Arqueología Mexicana.* 5(30):54-6.
- ♦ García-Bour J, Pérez-Pérez A, Álvarez S, Fernández E, López-Parra AM, Arroyo-Pardo E, Turbón D. 2004. Early population differentiation in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia: ancient mtDNA sequences and Y-chromosome STR characterization. *Am J Phys Anthropol.* 123(4):361-70.
- ♦ Gerstenberger J, Hummel S, Schultes T, Hack B, Herrmann B. 1999. Reconstruction of a historical genealogy by means of STR analysis and Y-haplotyping of ancient DNA. *Eur J Hum Genet.* 7(4):469-77.
- ♦ Gibbons A. 1997. Monte Verde: Blessed But Not Confirmed. *Science.* 275(5304):1256-7.
- ♦ Gilbert MT, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, Cooper A. 2003a. Distribution patterns of postmortem damage in human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet.* 72(1):32-47.
- ♦ Gilbert MT, Hansen AJ, Willerslev E, Rudbeck L, Barnes I, Lynnerup N, Cooper A. 2003b. Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *Am J Hum Genet.* 72(1):48-61.
- ♦ Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. 1994. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet.* 6(2):130-5.
- ♦ Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M, Henderson D, Zurawski G. 1990. Chloroplast DNA sequence from a miocene Magnolia species. *Nature.* 344(6267):656-8.
- ♦ González AM, Brehm A, Pérez JA, Maca-Meyer N, Flores C, Cabrera VM. 2003. Mitochondrial DNA affinities at the Atlantic fringe of Europe. *Am J Phys Anthropol.* 120(4):391-404.
- ♦ González-José R, Neves W, Lahr MM, González S, Pucciarelli H, Hernández Martínez M, Correal G. 2005. Late Pleistocene/Holocene craniofacial morphology in Mesoamerican Paleoindians: implications for the peopling of the New World. *Am J Phys Anthropol.* 128(4):772-80.
- ♦ González-Oliver A, Márquez-Morfin L, Jiménez J, Torre-Blanco A. 2001. Founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in ancient Maya from Xcaret, Quintana Roo. *Am J Phys Anthropol.* 116(3):230-5.

- ♦ Goudet J, Raymond M, de Meeus T, Rousset F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*. 144(4):1933-40.
- ♦ Green LD, Derr JN, Knight A. 2000. mtDNA affinities of the peoples of North-Central Mexico. *Am J Hum Genet*. 66(3):989-98.
- ♦ Greenberg JH, Turner II CG, Zegura SL. 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr Anthropol*. 27:477-95.
- ♦ Gutiérrez G, Marín A. 1998. The most ancient DNA recovered from an amber-preserved specimen may not be as ancient as it seems. *Mol Biol Evol*. 15(7):926-9.
- ♦ Gutiérrez de Hoyos G, Muñoz Espinosa MT (s.f.). La Investigación Antropológica En América. En *Antropología II*. Colegio de Bachilleres. Disponible en: http://www.conevyt.org.mx/bachilleres/material_bachilleres/cb6/6sempdf/antropologia2/antropol_fasc1.pdf. Recuperado en febrero 2006.
- ♦ Haak W, Forster P, Bramanti B, Matsumura S, Brandt G, Tanzer M, Villems R, Renfrew C, Gronenborn D, Alt KW, Burger J. 2005. Ancient DNA from the first European farmers in 7500-year-old Neolithic sites. *Science*. 310(5750):1016-8.
- ♦ Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature*. 342(6249):485.
- ♦ Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ. 1991. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature*. 352(6334):427-9.
- ♦ Hagelberg E, Thomas MG, Cook CE, Sher AV, Baryshnikov GF, Lister AM. 1994a. DNA from ancient Mammoth bones. *Nature*. 370(6488): 333-4.
- ♦ Hagelberg E, Quevedo S, Turbón D, Clegg JB. 1994b. DNA from ancient Easter Islanders. *Nature*. 369(6475):25-6.
- ♦ Hall TA. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 41:95-8.
- ♦ Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, Jarjanazi H, Santachiara-Benerecetti S, Soodyall H, Zegura SL. 2001. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol Biol Evol*. 18(7):1189-203.
- ♦ Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S. 1996. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet*. 59(2):368-76.
- ♦ Handt O, Meyer S, von Haeseler A. 1998. Compilation of human mtDNA control region sequences *Nucleic Acids Res*. 26(1):126-12. Disponible en: www.hvrbase.de

- ♦ Hänni C, Laudet V, Sakka M, Begue A, Stehelin D. 1990. Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones. *C R Acad Sci III*. 310(9):365-70.
- ♦ Hansen AJ, Willerslev E, Wiuf C, Mourier T, Arctander P. 2001. Statistical evidence for miscoding lesions in ancient DNA templates. *Mol Biol Evol* 18:262-5.
- ♦ Hansen AJ, Mitchell DL, Wiuf C, Paniker L, Brand TB, Binladen J, Gilichinsky DA, Ronn R, Willerslev E. 2006. Crosslinks rather than strand breaks determine access to ancient DNA sequences from frozen sediments. *Genetics*. 173(2):1175-9.
- ♦ Hassanin A. 2002. Ancient specimens and DNA contamination: a case study from the 12S rRNA gene sequence of the "Linh Duong" bovid (*Pseudonovibos spiralis*). *Naturwissenschaften*. 89:107-110.
- ♦ Hayes, MG 1998. Mitochondrial DNA variation of ancient Aleuts. *Am J Phys Anthropol. Suppl* 26:95.
- ♦ Helm M, Brule H, Friede D, Giege R, Putz D, Florentz C. 2000. Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA*. 6(10):1356-79.
- ♦ Hummel S, Herrmann B. 1994. General aspects of sample preparation. In Herrmann B, Hummel S. (eds) *Ancient DNA. Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical and forensic specimen*. New york: Springer-Verlag p 59-68.
- ♦ Herrnstadt C, Elson JL, Fahy E, Preston G, Turnbull DM, Anderson C, Ghosh SS, Olefsky JM, Beal MF, Davis RE, Howell N. 2002. Reduced-median-network analysis of complete mitochondrial DNA coding-region sequences for the major African, Asian, and European haplogroups. *Am J Hum Genet*. 70(5):1152-71.
- ♦ Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, Labuda D. 2001. Phylogenetic and familial estimates of mitochondrial substitution rates: Study of control region mutations in deep-rooting pedigrees. *Am J Hum Genet* 69:1113-26.
- ♦ Heyerdhal T. 1953. Aboriginal Navigation in Peru. *Proceedings of the 30th International Congress of Americanists*. 1952. pp: 72-6. Cambridge.
- ♦ Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. 312(5991):282-4.
- ♦ Hofreiter M, Jaenicke V, Serre D, Haeseler Av A, Pääbo S. 2001a. DNA sequences from multiple amplifications reveal artefacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res*. 29(23):4793-9.
- ♦ Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. 2001b. Ancient DNA. *Nat Rev Genet*. 2(5):353-9. Review.

- ♦ Horai S, Hayasaka K, Murayama K, Wate N, Koike H, Nakai N. 1989. DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proc Japan Acad.* 65, Ser B. 10:229-33.
- ♦ 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(1):23-47.
- ♦ Horai S, Kondo R, Murayama K, Hayashi S, Koike H, Nakai N. 1991. Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from mitochondrial DNA. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 333(1268):409-16; discussion 416-7.
- ♦ Howell N, Smejkal CB, Mackey DA, Chinnery PF, Turnbull DM, Herrnstadt C. 2003. The pedigree rate of sequence divergence in the human mitochondrial genome: there is a difference between phylogenetic and pedigree rates. *Am J Hum Genet.* 72(3):659-70.
- ♦ Hubbe M, Mazzaia ET, Atui JP, Neves W. 2003. A Primeira Descoberta da América. *Sociedade Brasileira de Genética.* São Paulo.
- ♦ Hunley K, Long JC. 2005. Gene flow across linguistic boundaries in Native North American populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(5):1312-7.
- ♦ Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllensten U. 2000. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 408(6813):708-13.
- ♦ Ingman M, Gyllensten U. 2001. Analysis of the complete human mtDNA genome: Methodology and inferences for human evolution. *J Hered.* 92: 454-61.
- ♦ Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. 1996. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat Genet.* 12(4):417-20.
- ♦ Izagirre N, de la Rúa C. 1999. An mtDNA analysis in ancient Basque populations: implications for haplogroup V as a marker for a major paleolithic expansion from southwestern Europe. *Am J Hum Genet.* 65(1):199-207.
- ♦ Jackson LE Jr, Duk-Rodkin A. 1996. Quaternary geology of the ice-free corridor: glacial controls on the peopling of the New World. In: Akazawa T, Szathmari EJ. Eds. *Prehistoric Mongols and Dispersals.* Oxford University Press. Oxford.
- ♦ Jaenicke-Despres V, Buckler ES, Smith BD, Gilbert MT, Cooper A, Doebley J, Pääbo S. 2003. Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science.* 302(5648):1206-8.
- ♦ Jobling MA. 2001. Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci Int.* 118(2-3):158-62.

- ♦ Jobling MA, Gill P. 2004. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 5(10):739-51.
- ♦ Jobling MA, Tyler-Smith C. 1995. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet.* 11(11):449-56.
- ♦ Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C. 1997. The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med.* 110(3):118-24. Review.
- ♦ Johnson MJ, Wallace DC, Ferris SD, Rattazzi MC, Cavalli-Sforza LL. 1983. Radiation of human mitochondria DNA types analyzed by restriction endonuclease cleavage patterns. *J Mol Evol.* 19(3-4):255-71.
- ♦ Kaestle F. 1997. Molecular archaeology: An analysis of ancient Native American DNA from western Nevada. *Nev Hist Soc Q.* 40:85-96.
- ♦ Karafet TM, Zegura SL, Posukh O, Osipova L, Bergen A, Long J, Goldman D, Klitz W, Harihara S, de Knijff P, Wiebe V, Griffiths RC, Templeton AR, Hammer MF. 1999. Ancestral Asian source(s) of new world Y-chromosome founder haplotypes. *Am J Hum Genet.* 64(3):817-31.
- ♦ Kayser M, Brauer S, Schädlich H, Prinz M, Batzer M, Zimmerman P, Boatín BA, Stoneking M. 2003. Y Chromosome STR haplotypes and the genetic structure of U.S. populations of African, European, and Hispanic ancestry. *Genome Research.* 13:624–34.
Disponibile en: www.genome.org.
- ♦ Keyser-Tracqui C, Crubezy E, 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(2):247-60.
- ♦ Kemp BM, Reséndez A, Berrelleza R, Malhi RS, Smith DG. 2005. An analysis of ancient Aztec mtDNA from Tlatelolco: Pre-columbian relations and the spread of Uto-aztecan. *Biomolecular Archaeology: Genetic approaches to the past.* Reed DM. Eds. Southern Illinois University. 32. pp: 22-46. Illinois.
- ♦ Kim JH, Oh JH, Song JH, Jeon JT, Han SH, Jung YH, Oh MY. 2005. Molecular genetic analysis of ancient cattle bones excavated from archaeological sites in Jeju, Korea. *Mol Cells.* 20(3):325-30.
- ♦ Kivisild T, Shen P, Wall DP, Do B, Sung R, Davis K, Passarino G, Underhill PA, Scharfe C, Torroni A, Scozzari R, Modiano D, Coppa A, de Knijff P, Feldman M, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. 2006. The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics.* 172(1):373-87.
- ♦ Kivisild T, Reidla M, Metspalu E, Rosa A, Brehm A, Pennarun E, Parik J, Geberhiwot T, Usanga E, Villems R. 2004. Ethiopian mitochondrial DNA heritage: tracking gene flow across and around the gate of tears. *Am J Hum Genet.* 75(5):752-70.

- ♦ Kivisild T, Rootsi S, Metspalu M, Mastana S, Kaldma K, Parik J, Metspalu E, Adojaan M, Tolk HV, Stepanov V, Golge M, Usanga E, Papiha SS, Cinnioglu C, King R, Cavalli-Sforza L, Underhill PA, Villems R. 2003. The genetic heritage of the earliest settlers persists both in Indian tribal and caste populations. *Am J Hum Genet.* 72(2):313-32.
- ♦ Knight A, Underhill PA, Mortensen HM, Zhivotovsky LA, Lin AA, Henn BM, Louis D, Ruhlen M, Mountain JL. 2003. African Y chromosome and mtDNA divergence provides insight into the history of click languages. *Curr Biol.* 13(6):464-73.
- ♦ Kolman CJ, Bermingham E. 1997. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha Amerinds of Panama. *Genetics.* 147(3):1289-302.
- ♦ Kolman CJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA, Owsley DW, Tuross N. 1999. Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen. *J Infect Dis.* 180(6):2060-3.
- ♦ Kong QP, Yao YG, Sun C, Bandelt HJ, Zhu CL, Zhang YP. 2003. Phylogeny of East Asian mitochondrial DNA lineages inferred from complete sequences. *Am J Hum Genet.* 73(3):671-6.
- ♦ Krajewski C, Buckley L, Westerman M. 1997. DNA phylogeny of the marsupial wolf resolved. *Proc Biol Sci.* 264(1383):911-7.
- ♦ Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell.* 90(1):19-30.
- ♦ Krings M, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, Pääbo S. 1999. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the neandertal type specimen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10):5581-5.
- ♦ Krings M, Capelli C, Tschentscher F, Geisert H, Meyer S, von Haeseler A, Grossschmidt K, Possnert G, Paunovic M, Pääbo S. 2000. A view of Neandertal genetic diversity. *Nat Genet.* 26(2):144-6.
- ♦ Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* 5:150-63.
- ♦ Kuznetsov GV, Kulikov EE, Petrov NB, Ivanova NV, Lomov AA, Kholodova MV, Poltarau AB. 2001. The "Linh Duong" *Pseudonovibos spiralis* (Mammalia, Artiodactyla) is a new buffalo. *Naturwissenschaften.* 88:123-5.
- ♦ Kwok S, Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 339(6221):237-8.
- ♦ Lalueza C, Pérez-Pérez A, Prats E, Cornudella L, Turbon D. 1997. Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum Mol Genet.* 6(1):41-6.

- ♦ Lalueza-Fox C, Calderón FL, Calafell F, Morera B, Bertranpetit J. 2001. MtDNA from extinct Tainos and the peopling of the Caribbean. *Ann Hum Genet.* 65(Pt 2):137-51.
- ♦ Lalueza-Fox C, Gilbert MT, Martínez-Fuentes AJ, Calafell F, Bertranpetit J. 2003. Mitochondrial DNA from pre-Columbian Ciboneys from Cuba and the prehistoric colonization of the Caribbean. *Am J Phys Anthropol.* 121(2):97-108.
- ♦ Lalueza-Fox C, Sampietro ML, Caramelli D, Puder Y, Lari M, Calafell F, Martínez-Maza C, Bastir M, Fortea J, de la Rasilla M, Bertranpetit J, Rosas A. 2005a. Neandertal evolutionary genetics: mitochondrial DNA data from the Iberian Peninsula. *Mol Biol Evol.* 22(4):1077-81.
- ♦ Lalueza-Fox C, Castresana J, Sampietro L, Marques-Bonet T, Alcover JA, Bertranpetit J. 2005b. Molecular dating of caprines using ancient DNA sequences of *Myotragus balearicus*, an extinct endemic Balearic mammal. *BMC Evol Biol.* 5:70.
- ♦ Lambert DM, Ritchie PA, Millar CD, Holland B, Drummond AJ, Baroni C. 2002. Rates of evolution in ancient DNA from Adelie penguins. *Science.* 295(5563):2270-3.
- ♦ Lell JT, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Su B, Jin L, Schurr TG, Underhill PA, Wallace DC. 2002. The dual origin and Siberian affinities of Native American Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 70(1):192-206.
- ♦ Leonard JA, Wayne RK, Cooper A. 2000. Population genetics of ice age brown bears. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(4):1651-4.
- ♦ Lewis CM Jr, Tito RY, Lizarraga B, Stone AC. Land, language, and loci: mtDNA in Native Americans and the genetic history of Peru. 2005. *Am J Phys Anthropol.* 127(3):351-60.
- ♦ Lindahl T. 1993a. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 362(6422):709-15.
- ♦ Lindahl T. 1993b. Recovery of antediluvian DNA. *Nature.* 365(6448):700.
- ♦ Lindahl T, Nyberg B. 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry.* 11(19):3610-8.
- ♦ Lisker R, Ramirez E, Babinsky V. 1996. Genetic structure of autochthonous populations of Meso-America: Mexico. *Hum Biol.* 68(3):395-404.
- ♦ López Luján L. 1983. Los Mexica, últimos señores de Mesoamérica. En *Gran Enciclopedia de España y América*. Espasa-Calpe/Argantonio Eds. pp: 170-88. Madrid.
- ♦ López A, López Luján L. 2001. El pasado indígena. Fondo de Cultura Económica - El Colegio de México. México.

- ♦ López Luján L, Manzanilla L. 1994-1995. Historia Antigua de México: v. I, El México antiguo, sus áreas culturales, los orígenes y el horizonte Preclásico. P.p: 354; v. II, El horizonte Clásico. pp: 293; v. III, El horizonte Posclásico y algunos aspectos intelectuales de las culturas mesoamericanas. pp: 513. INAH/UNAM/Miguel Ángel Porrúa Eds. México.
- ♦ Lucotte G, Ngo NY. 1985. p49f, A highly polymorphic probe, that detects Taq1 RFLPs on the human Y chromosome. *Nucleic Acids Res.* 13(22):8285.
- ♦ Luna-Vázquez A, Vilchis-Dorantes G, Páez-Riberos LA, Muñoz-Valle F, González-Martín A, Rangel-Villalobos H. 2003. Population data of nine STRs of Mexican-Mestizos from Mexico City. *Forensic Sci Int.* 136(1-3):96-8.
- ♦ Lydolph MC, Jacobsen J, Arctander P, Gilbert MT, Gilichinsky DA, Hansen AJ, Willerslev E, Lange L. 2005. Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Appl Environ Microbiol.* 71(2):1012-7.
- ♦ Malgosa A, Montiel R, Díaz N, Solórzano E, Smerling A, Isidro A, García C, Simón M. 2005. Ancient DNA: A modern look at the infections of the past. *Reserch Signopost Eds. Recent Res Devel Microbiology.* 9:213-36. Kerala, India.
- ♦ Malhi RS, Smith DG. 2002. Brief communication: Haplogroup X confirmed in prehistoric North America. *Am J Phys Anthropol.* 119(1):84-6.
- ♦ Malhi RS, Schultz BA, Smith DG. 2001. Distribution of mitochondrial DNA lineages among Native American tribes of Northeastern North America. *Hum Biol.* 73(1):17-55.
- ♦ Malhi RS, Eshleman JA, Greenberg JA, Weiss DA, Schultz Shook BA, Kaestle FA, Lorenz JG, Kemp BM, Johnson JR, Smith DG. 2002. The structure of diversity within New World mitochondrial DNA haplogroups: implications for the prehistory of North America. *Am J Hum Genet.* 70(4):905-19.
- ♦ Malhi RS, Mortensen HM, Eshleman JA, Kemp BM, Lorenz JG, Kaestle FA, Johnson JR, Gorodezky C, Smith DG. 2003. Native American mtDNA prehistory in the American Southwest. *Am J Phys Anthropol.* 120(2):108-24.
- ♦ Malhi RS, Breece KE, Shook BA, Kaestle FA, Chatters JC, Hackenberger S, Smith DG. 2004. Patterns of mtDNA diversity in northwestern North America. *Hum Biol.* 76(1):33-54.
- ♦ Marota I, Basile C, Ubaldi M, Rollo F. 2002. DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. *Am J Phys Anthropol* 117:310-8.
- ♦ Martínez-Abadías N, González-José R, González-Martín A, Van der Molen S, Talavera A, Hernández P, Hernández M. 2006. Phenotypic evolution of human craniofacial morphology after admixture: a geometric morphometrics approach. *Am J Phys Anthropol.* 129(3):387-98.
- ♦ Mendiola F. 2002. El arte rupestre en Chihuahua. Expresión cultural de nómadas y sedentarios en el norte de México, INAH-Ichicult Eds. México.

- ♦ Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol.* 98(4):411-30.
- ♦ Merriwether DA, Huston S, Iyengar S, Hamman R, Norris JM, Shetterly SM, Kamboh MI, Ferrell RE. 1997. Mitochondrial versus nuclear admixture estimates demonstrate a past history of directional mating. *Am J Phys Anthropol.* 102(2):153-9.
- ♦ Merriwether DA, Hodgson JA, Friedlaender FR, Allaby R, Cerchio S, Koki G, Friedlaender JS. 2005. Ancient mitochondrial M haplogroups identified in the Southwest Pacific. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(37):13034-9.
- ♦ Mesa NR, Mondragón MC, Soto ID, Parra MV, Duque C, Ortiz-Barrientos D, García LF, Vélez ID, Bravo ML, Munera JG, Bedoya G, Bortolini MC, Ruiz-Linares A. 2000. Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America. *Am J Hum Genet.* 67(5):1277-86.
- ♦ Metspalu M, Kivisild T, Metspalu E, Parik J, Hudjashov G, Kaldma K, Serk P, Karmin M, Behar DM, Gilbert MT, Endicott P, Mastana S, Papiha SS, Skorecki K, Torroni A, 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 Genet.* 5:26.
- ♦ Meyer S, Weiss G, von Haeseler A. 1999. Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics.* 152:1103-10.
- ♦ Meyer E, Wiese M, Bruchhaus H, Claussen M, Klein A. 2000. Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. *Forensic Sci Int* 113:87-90.
- ♦ Montiel R. 2001. Estudio diacrónico de la variabilidad del DNA mitocondrial en población Catalana. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.
Disponible en: <http://www.tdcat.cesca.es/TDCat-0726101-095837>
- ♦ Montiel R, Malgosa A, Subirà E. 1997. Overcomming PCR inhibitors in ancient DNA extracts from teeth. *J Ancient Biomol.* 1:221-225.
- ♦ Montiel R, Malgosa A, Francalacci P. 2001. Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Hum Biol.* 73(5):689-713.
- ♦ Montiel R, García C, Cañadas MP, Isidro A, Guijo JM, Malgosa A. 2003. DNA sequences of *Mycobacterium leprae* recovered from ancient bones. *FEMS Microbiol Lett.* 226(2):413-4.

- ♦ Montiel R, Bettencourt C, Silva C, Santos C, Prata MJ, Lima M. 2005. Analysis of Y-chromosome variability and its comparison with mtDNA variability reveals different demographic histories between islands in the Azores Archipelago (Portugal). *Ann Hum Genet.* 69(Pt 2):135-44.
- ♦ Mooder KP, Schurr TG, Bamforth FJ, Bazaliiski VI, Savel'ev NA. 2006. Population affinities of Neolithic Siberians: a snapshot from prehistoric Lake Baikal. *Am J Phys Anthropol.* 129(3):349-61.
- ♦ Moraga ML, Rocco P, Miquel JF, Nervi F, Llop E, Chakraborty R, Rothhammer F, Carvallo P. 2000. Mitochondrial DNA polymorphisms in Chilean aboriginal populations: implications for the peopling of the southern cone of the continent. *Am J Phys Anthropol.* 113(1):19-29.
- ♦ Moraga M, Santoro CM, Standen VG, Carvallo P, Rothhammer F. 2005. Microevolution in prehistoric Andean populations: chronologic mtDNA variation in the desert valleys of northern Chile. *Am J Phys Anthropol.* 127(2):170-81.
- ♦ Moritz C, Dowling TE, Brown W. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematic. *Ann Rev Ecol Syst.* 18:269-92.
- ♦ Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- ♦ Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics.* Columbia University Press. New York.
- ♦ Neves WA, Pucciarelli HM. 1990. The origin of the first Americans: an analysis based on the cranial morphology of early South American human remains. *Am J Phys Anthropol.* 81:274.
- ♦ Neves WA, Prous A, Powell JF, Ozolins EG. 1998. Lapa Vermelha IV Hominid 1: Morphological affinities of the earliest known American. *Am J Phys Anthropol. Suppl* 26:169.
- ♦ Neves WA, Hubbe M. 2005. Cranial morphology of early Americans from Lagoa Santa, Brazil: implications for the settlement of the New World. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(51):18309-14.
- ♦ Nicholson GJ, Tomiuk J, Czarnetzki A, Bachmann L, Pusch CM. 2002. Detection of bone glue treatment as a major source of contamination in ancient DNA analyses. *Am J Phys Anthropol.* 118(2):117-20.
- ♦ Nielsen H, Enberg J, Thuesen I. 1994. DNA from arctic human burials. In *Ancient DNA.* Herrmann B, Hummel. Eds. Springer Verlag. pp: 122-40. New York.
- ♦ Ocaranza F. 1995. Las grandes epidemias del siglo XVI. En *Historia de la medicina en México.* Ocaranza F. Eds. Conaculta, México.
- ♦ Olson LE, Hassanin A. 2003. Contamination and chimerism are perpetuating the legend of the snake-eating cow with twisted horns (*Pseudonovibos spiralis*). A case study of the pitfalls of ancient DNA. *Mol Phylogenet Evol.* 27(3):545-8.

- ♦ O'Rourke DH, Carlyle SW, Parr RL. 1996. Ancient DNA: Methods, progress and perspectives. *Am J Hum Biol.* 8:557-71.
- ♦ O'Rourke DH, Hayes MG, Carlyle SW. 2000. Spatial and temporal stability of mtDNA haplogroup frequencies in native North America. *Hum Biol.* 72(1):15-34.
- ♦ Ovchinnikov IV, Gotherstrom A, Romanova GP, Kharitonov VM, Liden K, Goodwin W. 2000. Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature.* 404(6777):490-3.
- ♦ Owen RC. 1984. The Americas: the case against an ice-age human population. *The Origin of Modern Humans: A World Survey of the Fossil Evidence.* Owen RC, Alan R. Eds. Liss. pp: 517-63. New York.
- ♦ Pääbo S. 1985a. Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. *J Arch Sci* 12:411-7.
- ♦ Pääbo S. 1985b. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature.* 314(6012):644-5.
- ♦ Pääbo S. 1986. Molecular Genetic Investigations of Ancient Human Remains. In *Molecular Biology of Homo sapiens.* Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 51. pp: 441-6.
- ♦ Pääbo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(6):1939-43.
- ♦ Pääbo S, Wilson AC. 1988. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. *Nature.* 334(6181):387-8.
- ♦ Pääbo S, Wilson AC. 1991. Miocene DNA sequences - a dream come true? *Curr Biol.* 1(1):45-6.
- ♦ Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, Kuch M, Krause J, Vigilant L, Hofreiter M. 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet.* 38:645-79. Review.
- ♦ Page RD. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-8.
- ♦ Pakendorf B, Stoneking M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 6:165-83. Review.
- ♦ Paredes M, Galindo A, Bernal M, Avila S, Andrade D, Vergara C, Rincón M, Romero R, Navarrete M, Cárdenas M, Ortega J, Suárez D, Cifuentes A, Salas A, Carracedo A. 2004. Análisis de los 13 loci del codis en las 4 principales regiones etno-geográficas de Colombia. *Salud Uninorte.* 18:67-102.
- ♦ Parr RL, Carlyle SW, O'Rourke DH. 1996. Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *Am J Phys Anthropol.* 99(4):507-18.

- ♦ Phillips P, Willey GR. 1953. Method and Theory in American Archaeology: An Operational Basis for Cultural-Historical Integration. *American Anthropologist*. 55(5 Pt. 1):615-33.
- ♦ Poinar HN. 2002. The genetic secrets some fossils hold. *Acc Chem Res*. 35(8):676-84. Review.
- ♦ Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S. 1998. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*. 281(5375):319-20.
- ♦ Poinar HN, Kuch M, McDonald G, Martin P, Pääbo S. 2003. Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol*. 13:1150–1152.
- ♦ Ponsuksili S, Wimmers K, Schmoll F, Horst P, Schellander K. 1999. Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken. *J Hered*. 90(6):656-9.
- ♦ Prada ME, Sterpone O. 1999. Bony evidence of Kneeling posture in the Metatarsals from “Los Olmos” (Hidalgo, México). En *Actas del V Congreso Nacional de Paleopatología*. Sánchez JE Eds. pp: 48-53. Alcalá la Real
- ♦ Pucciarelli HM. 2004. Migraciones y variación craneofacial humana en América. *Complutum*. 15:225-47.
- ♦ Quintana-Murci L, Semino O, Bandelt HJ, Passarino G, McElreavey K, Santachiara-Benerecetti AS. 1999. Genetic evidence of an early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nat Genet*. 1999 23(4):437-41.
- ♦ Quintana-Murci L, Chaix R, Wells RS, Behar DM, Sayar H, Scozzari R, Rengo C, Al-Zahery N, Semino O, Santachiara-Benerecetti AS, Coppa A, Ayub Q, Mohyuddin A, Tyler-Smith C, Qasim Mehdi S, Torroni A, McElreavey K. 2004. Where west meets east: the complex mtDNA landscape of the southwest and Central Asian corridor. *Am J Hum Genet*. 74(5):827-45.
- ♦ Rafi A, Spigelman M, Stanford J, Lemma E, Donoghue H, Zias J. 1994. *Mycobacterium leprae* DNA from ancient bone detected by PCR. *Lancet*. 343(8909):1360-1.
- ♦ Rajkumar R, Banerjee J, Gunturi HB, Trivedi R, Kashyap VK. 2004. Phylogeny of the M superhaplogroup inferred from complete mitochondrial genome sequence of Indian specific lineages. *G Biology*. 6:P3.
Disponibile en: <http://genomebiology.com/2004/6/2/P3>
- ♦ Reidla M, Kivisild T, Metspalu E, Kaldma K, Tambets K, Tolk HV, Parik J, Loogvali EL, Derenko M, Malyarchuk B, Bermisheva M, Zhadanov S, Pennarun E, Gubina M, Golubenko M, Damba L, Fedorova S, Gusar V, Grechanina E, Mikerezi I, Moisan JP, Chaventre A, Khusnutdinova E, Osipova L, Stepanov V, Voevoda M, Achilli A, Rengo C, Rickards O, De Stefano GF, Papiha S, Beckman L, Janicijevic B, Rudan P, Anagnou N, Michalodimitrakis E, Koziel S, Usanga E, Geberhiwot T,

Herrnstadt C, Howell N, Torroni A, Villems R. 2003. Origin and diffusion of mtDNA haplogroup X. *Am J Hum Genet.* 73(5):1178-90.

♦ Relethford JH. 2001. Ancient DNA and the origin of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(2):390-1.

♦ Renne PR, Feinberg JM, Waters MR, Arroyo-Cabrales J, Ochoa-Castillo P, Pérez-Campa M, Knight KB. 2005. Geochronology: age of Mexican ash with alleged 'footprints'. *Nature.* 438(7068):E7-8.

♦ Reynolds JB, Weir BS, Cockerham CC. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics.* 105:767-79.

♦ Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, Machado AL, Guapindaia V, Zago MA. 1996. Heterogeneity of Mitochondrial DNA haplotypes in pre-Columbian Natives of the Amazon region. *Am J Phys Anthropol.* 101:29-37.

♦ Ribeiro-dos-Santos AK, Santos SE, Machado AL, Guapindaia V, Zago MA. 1997. Reply to Monsalve on "Mitochondrial DNA in ancient Amerindians". *Am J Phys Anthropol.* 103:423-5.

♦ Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Bourgeois J, Crubezy E, Ludes B. 2004a. Genetic analysis of a Scytho-Siberian skeleton and its implications for ancient Central Asian migrations. *Hum Biol.* 76(1):109-25.

♦ Ricaut FX, Keyser-Tracqui C, Cammaert L, Crubezy E, Ludes B. 2004b. Genetic analysis and ethnic affinities from two Scytho-Siberian skeletons. *Am J Phys Anthropol.* 123(4):351-60.

♦ Ricaut FX, Fedoseeva A, Keyser-Tracqui C, Crubezy E, Ludes B. 2005. Ancient DNA analysis of human neolithic remains found in northeastern Siberia. *Am J Phys Anthropol.* 126(4):458-62.

♦ Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ, Sykes BC. 1998. Phylogeography of mitochondrial DNA in Western Europe. *Ann Hum Genet.* 62(Pt 3):241-60.

♦ Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V, Rengo C, Sellitto D, Cruciani F, Kivisild T, Villems R, Thomas M, Rychkov S, Rychkov O, Rychkov Y, Golge M, Dimitrov D, Hill E, Bradley D, Romano V, Cali F, Vona G, Demaine A, Papiha S, Triantaphyllidis C, Stefanescu G, Hatina J, Belledi M, Di Rienzo A, Novelletto A, Oppenheim A, Norby S, Al-Zaheri N, Santachiara-Benerecetti S, Scozzari R, Torroni A, Bandelt HJ. 2000. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet.* 67(5):1251-76.

♦ Richards M, Rengo C, Cruciani F, Gratrix F, Wilson JF, Scozzari R, Macaulay V, Torroni A. 2003. Extensive female-mediated gene flow from sub-Saharan Africa into near eastern Arab populations. *Am J Hum Genet.* 72(4):1058-64.

♦ Richter C, Park JW, Ames BN. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(17):6465-7.

- ♦ Rickards O, Martínez-Labarga C, Lum JK, De Stefano GF, Cann RL. 1999. mtDNA history of the Cayapa Amerinds of Ecuador: detection of additional founding lineages for the Native American populations. *Am J Hum Genet.* 65(2):519-30.
- ♦ Rohland N, Pollack JL, Nagel D, Beauval C, Airvaux J, Pääbo S, Hofreiter M. 2005. The population history of extant and extinct hyenas. *Mol Biol Evol.* 22(12):2435-43.
- ♦ Rosa A, Brehm A, Kivisild T, Metspalu E, Villems R. 2004. MtDNA profile of West Africa Guineans: towards a better understanding of the Senegambia region. *Ann Hum Genet.* 68(Pt 4):340-52.
- ♦ Rousset F, Raymond M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics.* 140(4):1413-9.
- ♦ Rubicz R, Schurr TG, Babb PL, Crawford MH. 2003. Mitochondrial DNA variation and the origins of the Aleuts. *Hum Biol.* 75(6):809-35.
- ♦ Saccone C, Pesole G, Sbisá E. 1991. The main regulatory function of mammalian mitochondrial DNA: Structure-function model and evolutionary pattern. *J Mol Evol* 33:83-91.
- ♦ Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732):1350-4.
- ♦ Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-25.
- ♦ Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sánchez-Diz P, Macaulay V, Carracedo A. 2002. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet.* 71(5):1082-111.
- ♦ Salas A, Richards M, Lareu MV, Scozzari R, Coppa A, Torroni A, Macaulay V, Carracedo A. 2004. The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet.* 74(3):454-65.
- ♦ Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B. 1999. Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis.* 20(8):1712-6.
- ♦ Santos C, Montiel R, Angles N, Lima M, Francalacci P, Malgosa A, Abade A, Aluja MP. 2004. Determination of human caucasian mitochondrial DNA haplogroups by means of a hierarchical approach. *Hum Biol.* 76(3):431-53.
- ♦ Santos C, Montiel R, Sierra B, Bettencourt C, Fernandez E, Alvarez L, Lima M, Abade A, Aluja MP. 2005. Understanding differences between phylogenetic and pedigree-derived mtDNA mutation rate: a model using families from the Azores Islands (Portugal). *Mol Biol Evol.* 22(6):1490-505.

- ♦ Santos FR, Pandya A, Tyler-Smith C, Pena SD, Schanfield M, Leonard WR, Osipova L, Crawford MH, Mitchell RJ. 1999. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *Am J Hum Genet.* 64(2):619-28.
- ♦ Santos M, Ward RH, Barrantes R. 1994. mtDNA variation in the Chibcha Amerindian Huetar from Costa Rica. *Hum Biol.* 66(6):963-77.
- ♦ Schmitz RW, Serre D, Bonani G, Feine S, Hillgruber F, Krainitzki H, Pääbo S, Smith FH. 2002. The Neandertal type site revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(20):13342-7.
- ♦ Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin ver 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Lab. Dept. Of Anthropology and Ecology. University of Geneva. Switzerland.
- ♦ Schultes T, Hummel S, Herrmann B. 1999. Amplification of Y-chromosomal STRs from ancient skeletal material. *Hum Genet.* 104(2):164-6.
- ♦ Schurr TG. 2000. Mitochondrial DNA and the Peopling of the New World. *American Scientist* online. 88(3):246.
Disponible en: <http://www.americanscientist.org>
- ♦ Schurr TG, Sherry ST. 2004. Mitochondrial DNA and Y chromosome diversity and the peopling of the Americas: evolutionary and demographic evidence. *Am J Hum Biol.* 16(4):420-39.
- ♦ Schurr TG, Ballinger SW, Gan YY, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, Wallace DC. 1990. Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet.* 46(3):613-23.
- ♦ Schurr TG, Sukernik RI, Starikovskaya YB, Wallace DC. 1999. Mitochondrial DNA variation in Koryaks and Itel'men: population replacement in the Okhotsk Sea-Bering Sea region during the Neolithic. *Am J Phys Anthropol.* 108(1):1-39.
- ♦ Schwartz M, Vissing J. 2003. New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(2):247-51. Review.
- ♦ Scozzari R, Torroni A, Semino O, Sirugo G, Brega A, Santachiara-Benerecetti AS. 1988. Genetic studies on the Senegal population. I. Mitochondrial DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 43(4):534-44.
- ♦ Sensabaugh GF, Blake ET. 1994. DNA analysis in biological evidence: Application of the Polymerase Chain Reaction. 3rd Ed. Forensic Science Handbook.
- ♦ Serre D, Langaney A, Chech M, Teschler-Nicola M, Paunovic M, Menecier P, Hofreiter M, Possnert G, Pääbo S. 2004. No evidence of Neandertal mtDNA contribution to early modern humans. *PLoS Biol.* 2(3):E57.

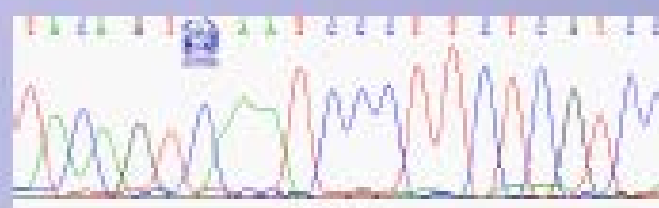
- ♦ Shen P, Wang F, Underhill PA, Franco C, Yang WH, Roxas A, Sung R, Lin AA, Hyman RW, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. 2000. Population genetic implications from sequence variation in four Y chromosome genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(13):7354-9.
- ♦ Shen P, Lavi T, Kivisild T, Chou V, Sengun D, Gefel D, Shpirer I, Woolf E, Hillel J, Feldman MW, Oefner PJ. 2004. Reconstruction of patrilineages and matrilineages of Samaritans and other Israeli populations from Y-chromosome and mitochondrial DNA sequence variation. *Hum Mutat*. 24(3):248-60.
- ♦ Shields GF, Schmiechen AM, Frazier BL, Redd A, Voevoda MI, Reed JK, Ward RH. 1993. mtDNA sequences suggest a recent evolutionary divergence for Beringian and northern North American populations. *Am J Hum Genet*. 53(3):549-62.
- ♦ Shuster RC, Rubenstein AJ, Wallace DC. 1988. Mitochondrial DNA in anucleate human blood cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 155(3):1360-5.
- ♦ Sidow A, Wilson AC, Pääbo S. 1991. Bacterial DNA in *Clarkia* fossil. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 333(1268):429-32.
- ♦ Sigurgardottir S, Helgason A, Gulcher JR, Stefansson K, Donnelly P. 2000. The mutation rate in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet*. 66(5):1599-609.
- ♦ Smerling A. 2004. Análisis de ADN de *Streptococcus mutans* recuperado en restos antiguos. DEA. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- ♦ Smith DG, Malhi RS, Eshleman J, Lorenz JG, Kaestle FA. 1999. Distribution of mtDNA haplogroup X among Native North Americans. *Am J Phys Anthropol*. 110(3):271-84.
- ♦ Smith CI, Chamberlain AT, Riley MS, Stringer C, Collins MJ. 2003. The thermal history of human fossils and the likelihood of successful DNA amplification. *J Hum Evol*. 45(3):203-17.
- ♦ Solórzano E, Díaz N, Montiel R, Cañadas MP, Malgosa A. 2004. Análisis molecular de casos de treponematosi congénita en individuos neonatales del siglo XVI (Huelva-España). En Egocheaga JE. *Biología de las poblaciones humanas: Diversidad, tiempo, espacio* Eds. XIII Congreso de la Sociedad Española de Antropología Biológica. pp: 247-53. Oviedo.
- ♦ Spigelman M, Lemma E. 1993. The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *Int J Osteoarchaeol*. 3:137-43.
- ♦ Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod*. 63(2):582-90.

- ♦ Starikovskaya YB, Sukernik RI, Schurr TG, Kogelnik AM, Wallace DC. 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(5):1473-91.
- ♦ Starikovskaya EB, Sukernik RI, Derbeneva OA, Volodko NV, Ruiz-Pesini E, Torroni A, Brown MD, Lott MT, Hosseini SH, Huoponen K, Wallace DC. 2005. Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of the southern extent of Siberia, and the origins of Native American haplogroups. *Ann Hum Genet.* 69(Pt 1):67-89.
- ♦ Stern P. 1994. Gente de color quebrado: Africans and Afromestizos in colonial Mexico. *Colonial Latin Am Hist Rev.* 3:185–204.
- ♦ Stone AC, Stoneking M. 1993. Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population. *Am J Phys Anthropol.* 92(4):463-71.
- ♦ Stone AC, Stoneking M. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *Am J Hum Genet.* 62(5):1153-70.
- ♦ Stone AC, Stoneking M. 1999. Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354(1379):153-9.
- ♦ Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 10(3):512-26.
- ♦ Tanaka M, Cabrera VM, Gonzalez AM, Larruga JM, Takeyasu T, Fuku N, Guo LJ, Hirose R, Fujita Y, Kurata M, Shinoda K, Umetsu K, Yamada Y, Oshida Y, Sato Y, Hattori N, Mizuno Y, Arai Y, Hirose N, Ohta S, Ogawa O, Tanaka Y, Kawamori R, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Shimokata H, Suzuki R, Shimodaira H. 2004. Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res.* 14(10A):1832-50.
- ♦ Tankersley KB, Smith EE, Cochran DR. 1990. The Distribution of Fluted Points in Indiana: An Update. *Curr Res in the Pleistocene.* 7:47–50.
- ♦ Tarazona-Santos E, Santos FR. 2002. The peopling of the Americas: a second major migration? *Am J Hum Genet.* 70(5):1377-80.
- ♦ Torroni A, Schurr TG, Yang CC, Szathmary EJ, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM, Wallace DC. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics.* 130(1):153-62.
- ♦ Torroni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith DG, Vullo CM, Wallace DC. 1993a. Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet.* 53(3):563-90.

- ♦ Torroni A, Sukernik RI, Schurr TG, Starikorskaya YB, Cabell MF, Crawford MH, Comuzzie AG, Wallace DC. 1993b. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am J Hum Genet.* 53(3):591-608.
- ♦ Torroni A, Chen YS, Semino O, Santachiara-Beneceretti AS, Scott CR, Lott MT, Winter M, Wallace DC. 1994a. mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four Native American populations from southern Mexico. *Am J Hum Genet.* 54(2):303-18.
- ♦ Torroni A, Neel JV, Barrantes R, Schurr TG, Wallace DC. 1994b. Mitochondrial DNA "clock" for the Amerinds and its implications for timing their entry into North America. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(3):1158-62.
- ♦ Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus ML, Wallace DC. 1996. Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics.* 144(4):1835-50.
- ♦ Torroni A, Bandelt HJ, D'Urbano L, Lahermo P, Moral P, Sellitto D, Rengo C, Forster P, Savontaus ML, Bonne-Tamir B, Scozzari R. 1998. mtDNA analysis reveals a major late Paleolithic population expansion from southwestern to northeastern Europe. *Am J Hum Genet.* 62(5):1137-52.
- ♦ Torroni A, Rengo C, Guida V, Cruciani F, Sellitto D, Coppa A, Calderon FL, Simionati B, Valle G, Richards M, Macaulay V, Scozzari R. 2001. Do the four clades of the mtDNA haplogroup L2 evolve at different rates? *Am J Hum Genet.* 69(6):1348-56.
- ♦ Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ. 1997. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.* 7(10):996-1005.
- ♦ Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science.* 253(5027):1503-7.
- ♦ Vona G, Falchi A, Moral P, Calo CM, Varesi L. 2005. Mitochondrial sequence variation in the Guahibo Amerindian population from Venezuela. *Am J Phys Anthropol.* 127(3):361-9.
- ♦ von Wurmb-Schwark N, Harbeck M, Wiesbrock U, Schroeder I, Ritz-Timme S, Oehmichen M. 2003. Extraction and amplification of nuclear and mitochondrial DNA from ancient and artificially aged bones. *Leg Med.* 5 Suppl 1:S169-72.
- ♦ Wakeley J. 1993. Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 37(6):613-23.
- ♦ Walden KK, Robertson HM. 1997. Ancient DNA from amber fossil bees? *Mol Biol Evol.* 14(10):1075-7.

- ♦ Wallace DC. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(19):8739-46. Review.
- ♦ Wallace DC, Garrison K, Knowler WC. 1985. Dramatic founder effects in Amerindian mitochondrial DNAs. *Am J Phys Anthropol.* 68(2):149-55.
- ♦ Ward RH, Frazier BL, Dew-Jager K, Pääbo S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(19):8720-4.
- ♦ Ward RH, Redd A, Valencia D, Frazier B, Pääbo S. 1993. Genetic and linguistic differentiation in the Americas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(22):10663-7.
- ♦ Watson E, Forster P, Richards M, Bandelt HJ. 1997. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *Am J Hum Genet.* 61(3):691-704.
- ♦ Weiss G, von Haeseler A. 1998. Inference of population history using a likelihood approach. *Genetics.* 149(3):1539-46.
- ♦ Willerslev E, Cooper A. 2005. Ancient DNA. *Proc Biol Sci.* 272(1558):3-16. Review.
- ♦ Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, Brandt TB, Gilbert MTP, Shapiro B, Bunce M, Wiuf C, Gilichinsky DA, Cooper A. 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science.* 300:791-795.
- ♦ Willerslev E, Hansen AJ, Poinar HN. 2004. Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends Ecol Evol.* 19(3):141-7.
- ♦ Willey G, Phillips, P. 1953. Method and Theory in American Archaeology, II: Historical-Developmental Interpretation. *Am Anthropologist.* 57:723-819.
- ♦ Williams SR, Chagnon NA, Spielman RS. 2002. Nuclear and mitochondrial genetic variation in the Yanomamo: a test case for ancient DNA studies of prehistoric populations. *Am J Phys Anthropol.* 117(3):246-59.
- ♦ Wrischnik LA, Higuchi RG, Stoneking M, Erlich HA, Arnheim N, Wilson AC. 1987. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* 15(2):529-42.
- ♦ Y Chromosome Consortium. 2002. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 12(2):339-48.
- ♦ Yang DY, Watt K. 2005. Contamination controls when preparing archaeological remains for ancient DNA analysis. *J Archaeol Sci.* 32:331-6.
- ♦ Yao YG, Nie L, Harpending H, Fu YX, Yuan ZG, Zhang YP. 2002. Genetic relationship of Chinese ethnic populations revealed by mtDNA sequence diversity. *Am J Phys Anthropol.* 118(1):63-76.

- ♦ Yao YG, Watkins WS, Zhang YP. 2000. Evolutionary history of the mtDNA 9-bp deletion in Chinese populations and its relevance to the peopling of East and Southeast Asia. *Hum Genet* 107:504-12
- ♦ Zakharov IA, Derenko MV, Maliarchuk BA, Dambueva IK, Dorzhu CM, Rychkov SY. 2004. Mitochondrial DNA variation in the aboriginal populations of the Altai-Baikal region: implications for the genetic history of North Asia and America. *Ann N Y Acad Sci.* 1011:21-35.
- ♦ Zegura SL, Karafet TM, Zhivotovsky LA, Hammer MF. 2004. High-resolution SNPs and microsatellite haplotypes point to a single, recent entry of Native American Y chromosomes into the Americas. *Mol Biol Evol.* 21(1):164-75.
- ♦ Zink AR, Grabner W, Nerlich AG. 2005. Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *Am J Phys Anthropol.* 126(1):32-47.
- ♦ Zlojutro M, Rubicz R, Devor EJ, Spitsyn VA, Makarov SV, Wilson K, Crawford MH. 2006. Genetic structure of the Aleuts and Circumpolar populations based on mitochondrial DNA sequences: a synthesis. *Am J Phys Anthropol.* 129(3):446-64.



2006