

00381 19
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DE LOS ESQUELETOS A LA DOBLE HELICE:
HACIA UN ESTUDIO DE PALEOANTROPOLOGIA
MOLECULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

M. en C. ROCIO VARGAS SANDERS

DIRECTOR DE TESIS: DR. FAUSTINO RODRIGUEZ ROMERO

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	4
Material genético contemporáneo	4
Material genético antiguo	14
1. Estudios histológicos	14
2. Estudios de proteínas antiguas	15
3. ADN en restos antiguos	17
MATERIAL Y METODOS	
1. Aislamiento de ADN	22
2. Cuantificación de ácidos nucleicos	23
3. Electroforesis en geles de agarosa	23
4. Recuperación de ADN de Alto Peso Molecular	24
5. Sondas Monolocus	25
6. Transformación bacteriana	25
7. Preparación de plásmidos a gran escala por lisis alcalina	27
8. Preparación del gradiente de CsCl	28
9. Aislamiento del Inserto o Sonda	28
10. Hibridación Tipo Southern	30
11. Marcaje del Inserto o Sonda	31

12. Cuantificación de la Actividad Específica del Inserto o Sonda	32
13. Prehibridación	33
14. Hibridación	34
15. Lavado de los filtros	34
16. Obtención de ARNt	25
17. Preparación de Factores de Iniciación y Ribosomas	36
18. Preparación de 35S-Met-ARNt _i	35
19. Ensayos Enzimáticos	37

RESULTADOS

Observaciones histológicas	39
Observaciones Bioquímicas y de Biología Molecular	
1. Aislamiento y caracterización de ácidos nucleicos	39
a) Espectro de absorción en ultravioleta	41
b) Electroforesis en geles de agarosa	42
c) Tratamiento con desoxiribonucleasa y ribonucleasa	44
2. Demostración de su Origen Humano	45
a) Hibridación con HB-1	45
b) Hibridación con HEP-1 a	46
3. Identificación de individuos por ADN ("huellas digitales de ADN")	47
4. Purificación de ARNt	50
5. Formación de Met-ARNt _i	50

6. Formación del Complejo ternario	52
7. Unión de Met-ARnti a Ribosomas	53

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Observaciones Histológicas	55
Observaciones Bioquímicas y de Biología Molecular	
1. Aislamiento y Caracterización de ácidos nucleicos	56
a) Espectro de absorción en ultravioleta	56
b) Electroforesis en geles de agarosa	58
2. Demostración de su Origen Humano	64
3. Identificación de Individuos por ADN ("Huellas Digitales de ADN")	67
4. ARnti de Material Oseo	68

REFERENCIAS	71
-------------	----

RESUMEN

Quiénes y cómo eran los antiguos habitantes del actual territorio mexicano? Estas cuestiones se han planteado desde hace mucho tiempo, y para dar respuesta se ha estudiado el legado cultural y el biológico. En el primero están presentes la arquitectura, la religión, la literatura, entre otras. En el segundo se considera la diversidad y la relación del hombre con el medio ambiente, como resultado del atributo más sorprendente de los sistemas vivos: la capacidad de transmitir propiedades hereditarias de una generación a otra. Este último aspecto, justamente, ha suscitado desde hace mucho tiempo una muy amplia variedad de estudios dentro del campo de la antropología biológica.

Una de las fuentes fundamentales para estudiar la evolución biológica de la especie humana ha sido el estudio de los diferentes tipos de restos que se han encontrado. Entre los más notables se pueden mencionar : material óseo, tejido momificado y tejido congelado.

Una de las principales razones para estudiar el material óseo consiste en que nos muestra una amplia información acerca de los individuos y las poblaciones a las que pertenecieron.

Aunque los primeros estudios realizados en restos óseos se limitaban a un enfoque meramente descriptivo, al paso del tiempo han permitido no sólo esbozar las características físicas esenciales de los antiguos pobladores, sino también evaluar otros parámetros tales como su crecimiento y nutrición.

Actualmente, con el desarrollo y avance de las técnicas de bioquímica y biología molecular ha surgido la llamada "Arqueología Molecular" donde uno de los principales objetivos es la búsqueda de los ácidos nucleicos en diversos tejidos de varios cientos a miles de años de antigüedad de plantas y animales, incluyendo al hombre. Estos estudios han demostrado que la conservación del material genético es un fenómeno factible, por lo que estudios moleculares en poblaciones prehispánicas mexicanas abren la posibilidad de responder a viejas interrogantes y plantearnos nuevas preguntas.

En este estudio se describen los primeros datos sobre el aislamiento, la caracterización y la identificación de ADN y ARN en particular, Met-ARNTi de origen humano, proveniente de tejido óseo de poblaciones prehispánicas de diferentes zonas de la Cuenca del Valle de México y de la zona arqueológica de Tula, Hgo., fechado con 500-1,110 años de antigüedad.

Asimismo, se tienen los primeros indicios de un posible polimorfismo genético y la identificación de individuos por medio de " huellas digitales de ADN " de poblaciones prehispánicas mesoamericanas.

Es indudable que la información del presente trabajo resulta de enorme interés, ya que permitirá su aplicación inmediata para obtener un mejor conocimiento del hombre antiguo.

INTRODUCCION

Material genético contemporáneo: Propiedades, estado y alcances de la información.

La diversidad biológica es una realidad tangible basta observar el entorno. Esta diversidad se genera por las modificaciones genéticas que operan en los individuos poblaciones y especies que dependiendo de su permanencia o desaparición, trascienden en los procesos de especiación.

El *Homo sapiens* en consecuencia, está sujeto también a los procesos adaptativos que su habitat le impone y su éxito, como en otras especies, se finca en la variabilidad genética que posee. Lo anterior ha sido demostrado por el examen de un considerable número de individuos pertenecientes a los grupos étnicos actuales. Algunas variaciones como la estatura, el color de la piel y el cabello, entre otras, son fácilmente identificables y sencillas de analizar. Otras, por el contrario, han sido descubiertas recientemente sólo gracias al avance del conocimiento científico y de las nuevas tecnologías desarrolladas. Así, se tienen importantes datos antropológicos a nivel mundial: 1) Información sobre una amplia gama de caracteres morfológicos, métricos, lingüísticos y culturales que pueden ser comparados con peculiaridades genéticas. 2) Un vasto número de datos históricos que pueden ser utilizados para reconstruir patrones de las poblaciones y la secuencia de los eventos históricos que permiten la subdivisión y fusión de las mismas. 3) La tasa de fertilidad y mortalidad (edad

específica) y la distribución del tamaño de la progenie para entender la estructura y evolución de la población.

También existe una amplia información acerca de los grupos sanguíneos y de los *loci* de diferentes proteínas que se han utilizado para abordar diversos problemas: 1) Estimación de la estructura genética de las poblaciones aborígenes a varios niveles geográficos y sus relaciones con aspectos de la estructura demográfica y social, como los trabajos de Neel y colaboradores en los Yanomamas y otras tribus sudamericanas (Neel *et al.*, 1977; Smouse *et al.*, 1981); los de Kirk (1979), Birdsell *et al.* (1979) y Blake (1979) en nativos australianos y sobre diferentes grupos étnicos mexicanos (Córdova *et al.*, 1967; Gorodezky, 1988). 2) La valoración de las poblaciones geográficas, como los estudios a nivel mundial de Nei y Roychoudhury (1982), los de Rychkov y Sheremetyeva (1977) en grupos étnicos del Norte de Asia y 3) la reconstrucción de patrones de migración.

Las investigaciones sobre genética humana han sido complementadas por estudios clínicos sistemáticos y por datos aportados por especialistas de las diferentes áreas de la biología humana tales como: hematología, inmunología y antropología, entre otras. Cada grupo ha hecho contribuciones valiosas dentro de su especialidad para la identificación de marcadores genéticos (grupos sanguíneos, sistema HLA, isoenzimas, dermatoglifos, entre otros) y para la caracterización de defectos genéticos que podrían estar asociados con padecimientos complejos tales como: leucemia, artritis, desórdenes hematológicos

y anomalías psíquicas y neurológicas (Mourat, 1954; White y Caskey, 1988; Molecular Biology of *Homo sapiens*, 1986)).

Por otra parte, en los últimos veinte años el problema del origen del hombre se ha modificado profundamente gracias a la utilización de técnicas de análisis procedentes de la genética molecular, hasta el punto que ha nacido una nueva disciplina: la Antropología Molecular. Así, los estudios que permiten conocer secuencias de aminoácidos y la variación fenotípica de las proteínas han hecho factible descubrir la frecuencia aproximada con la que se lleva a cabo la sustitución de aminoácidos, así como el extenso polimorfismo proteico que se presenta en las poblaciones naturales (Harris y Hopkins, 1972; Selander y Whittman, 1983). También las investigaciones sobre secuenciación de ADN, ARN, la aplicación de los métodos con ADN recombinante, y amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), conducen a una nueva fuente de información, que permiten la purificación a gran escala de secuencias génicas particulares que actúan como "sondas" de secuencias homólogas en el genoma. Esto ha puesto al descubierto la organización del genoma, en donde se observa que muchos genes se encuentran en grupos o familias, en donde algunos de los miembros pueden estar localizados uno cerca del otro en la misma región cromosómica y estar muy relacionados en la secuencia de nucleótidos (Lewin, 1990). Frecuentemente, los genes en una familia codifican proteínas con funciones semejantes, pero no idénticas, o diferentes en su patrón de expresión como por ejemplo los que son transcritos en los diversos estadios de desarrollo y en tejidos específicos (Garrels, 1979; Van Nest *et al.* 1980; Derman *et al.* 1981).

Otro hecho que se ha manifestado es la evolución de los genes a través de la interpretación de una serie de propiedades biológicas relacionadas con la regulación de la expresión del genoma (Minty y Newmark, 1980; Lewin, 1990) y la clonación de fragmentos de ADN del genoma humano para formar bibliotecas génicas (Maniatis *et al.* 1982); además, la variabilidad genética que se puede detectar es mayor que la obtenida con la electroforesis de proteínas. Con estas técnicas ha sido posible determinar en las poblaciones humanas la existencia de polimorfismo de genes, o de otros fragmentos de ADN, que se muestran en dos o más alelos. Las variantes presentan mutaciones que han sido heredadas por una fracción apreciable de la población común. La mayoría de estas mutaciones son probablemente neutrales, aunque algunos polimorfismos reflejan ventajas selectivas en los distintos alelos.

El polimorfismo genético explica la variación hereditaria observada en la población humana, fundamentalmente la diversidad en las características moleculares (Wainscoat *et al.*, 1986; 1987; Cavalli-Sforza *et al.*, 1986) como los grupos sanguíneos (Salazar-Mallén y Arias, 1959 ; Córdova *et al.*, 1967; Neel *et al.*, 1977; Kirk, 1979; Birdsell *et al.*, 1979; Blake, 1979; Smouse *et al.*, 1981; White y Caskey, 1988), los antígenos de histocompatibilidad (Gorodezky, 1988), las diferencias metabólicas y aspectos relacionados con la personalidad. Estos polimorfismos son casi siempre debidos a sustituciones de nucleótidos; además, la mayoría de las deleciones o inserciones desorganizan el marco de lectura, dirigiendo un producto proteico completamente diferente y generalmente no funcional (Salser e Issacson, 1976; Kimura, 1977; Jukes y King, 1979; Lomedico *et al.*, 1979; Miyata *et al.*, 1980; Hoyshida y Miyata, 1983). Sin embargo,

existen familias de proteínas como las inmunoglobulinas que tienen regiones con múltiples variaciones en su secuencia de aminoácidos que conservan y enriquecen su función biológica fundamental que es la interacción con el determinante antigénico que provoca su síntesis. También están relacionadas con otras proteínas que cumplen su función de reconocimiento celular (Adams, 1980; Tonegawa *et al.*, 1981; Leder, 1982).

Los polimorfismos pueden ser utilizados para distinguir diversas copias en el mismo cromosoma, cuando un individuo es heterocigoto en un sitio polimórfico, éste llega a ser una posible pista que se transmite a la región del cromosoma en el hijo de este individuo. Lo anterior constituye una herramienta poderosa para localizar genes afectados por medio del análisis del parentesco (Molecular Biology of *Homo sapiens*, 1986; Nakamura *et al.*, 1987). También se pueden utilizar para estudiar y determinar los orígenes de grupos de poblaciones humanas, las cuales muchas veces difieren en las frecuencias de alelos particulares (Molecular Biology of *Homo sapiens*, 1986).

Se ha observado que el genoma humano contiene un gran número de variaciones dentro y fuera de las secuencias que expresan información como lo han señalado Jeffreys (1979) y Jeffreys *et al.* (1985a). Estos autores han calculado que 1 de cada 100 nucleótidos que no codifican, podrían ser polimórficos. Además, Ayala (1983) ha sugerido que cada individuo podría ser heterocigótico presentando por lo menos un polimorfismo por *locus*.

Las primeras variantes de ADN humano que se identificaron, corresponden a los polimorfismos en las secuencias de bases. Algunas de estas sustituciones de nucleótidos son identificables porque alteran el sitio de reconocimiento de las endonucleasas de restricción (Xan y Dozy, 1978); es decir, se modifica la secuencia específica de nucleótidos dando como resultado una variación en la longitud del tamaño de los fragmentos de ADN, también conocidos como Fragmentos Polimórficos de Longitud Variable (FPLV, en inglés RPFLs). Estos FPLVs representan cambios en el ADN, por lo que sirven como base para realizar estudios poblacionales (Botstein *et al.*, 1980; Williamson *et al.*, 1984; Cox *et al.*, 1985; Hofker *et al.*, 1985; Cooper y Schidke, 1986).

En años anteriores, la lista de FPLV era similar a la de proteínas (Beaudet, 1985) pero, actualmente, el número de las diferentes sondas que se utilizan para detectar FPLVs se ha incrementado de tal manera que es difícil decidir cual de ellas utilizar. En esta lista no se incluyen las que corresponden a loci desconocidos. Algunas de estas sondas son de FPLVs extremadamente variables que pueden ser de gran ayuda en estudios de genética poblacional.

Otras opciones que se pueden emplear para comparar al ADN de diferentes poblaciones son: el uso de ADN mitocondrial (ADNmt), las regiones hipervariables que se encuentran en serie y las técnicas de hibridación ADN- ADN en hidroxihapatita.

El ADNmt ha sido estudiado en diversas poblaciones humanas (Denaro *et al.*, 1981; Cann *et al.*, 1984; 1987; Horai y Matsunaga, 1986; Horai *et al.*, 1991; Pääbo *et al.*, 1990b; Wallace *et al.*, 1985; Wallace y Torroni, 1992). La variación genética del ADNmt es debida a los cambios en los sitios de restricción (Bonné-Tamir *et al.*, 1986); además de que se siguen patrones de herencia materna y en los mamíferos funcionan como haploides. El ADNmt es más sensible a las mutaciones comparado con el ADN nuclear por lo que podría funcionar como un factor limitante en las poblaciones (Wallace *et al.*, 1985; Wainscoat *et al.*, 1987; Wallace y Torroni, 1992). Sin embargo, para realizar estudios de ADNmt y obtener información más precisa acerca del polimorfismo de una determinada población, se requiere de un número significativo de muestras .

En el genoma humano y de otros eucariotes, se encuentran fragmentos de ADN repetidos y en serie, cuyas unidades varían en la repetición y en el tamaño. La gama en la que se encuentran es amplia; existen desde fragmentos grandes con una longitud de 50 Mb, como los satélites alfoideos de los centrómeros (Willard, 1991) hasta unidades tan pequeñas como las repeticiones de dinucleótidos (Weber y May, 1989; Litt y Luty, 1989) y mononucleótidos en los extremos de los transposones (Economou *et al.*, 1990) que frecuentemente presentan variación en el número de unidades repetidas.

Los análisis genéticos en el hombre pueden ser simplificados por la disponibilidad de sondas de las regiones hipervariables provenientes del ADN humano, los cuales muestran una variación multialélica correspondiente a una alta heterocigocidad. La primera de estas regiones fue aislada por Wyman y

White (1980) a partir de una biblioteca génica humana formada al azar. En el genoma humano se han descubierto regiones tales como: la 5' del gene de la insulina (Bell *et al.*, 1982), la región 3' del gene H-ras (Capon *et al.*, 1983), el gene α -globina (Jarman *et al.*, 1986), el gene de la colágena tipo II (Stoker *et al.*, 1985), el gene B de la apolipoproteína (Knott *et al.*, 1986) y la región entre los genes 1 y 2 de la globina (Goodburn *et al.*, 1983); así como el *locus* D14S1 definido por una clona anónima de ADN, derivada de la región telomérica del brazo largo del cromosoma 14 (Wyman y White, 1980; Balazs *et al.*, 1982; Wyman *et al.*, 1986). Estos minisatélites difieren sustancialmente en su variabilidad desde sólo 6 diferentes alelos detectados en la región hipervariable de la colágena (Sykes *et al.*, 1985; Wyman *et al.*, 1986) hasta más de 80, como los detectados en la región hipervariable en el *locus* D14S1 (Balazs *et al.*, 1982).

El descubrimiento y el uso de las sondas que son capaces de detectar un gran número de *loci* minisatélites hipervariables y repetidos en serie, señala su gran distribución en el genoma humano (Jeffreys *et al.*, 1985a) y proporciona una de las bases para el aislamiento sistemático de minisatélites por medio de clonación (Wong *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1987; Nakamura *et al.*, 1988; Armour *et al.*, 1990; Vergnaud *et al.*, 1991). Además de las sondas de minisatélites derivadas de un intrón del gene de la mioglobina (Jeffreys *et al.*, 1985a), se han reportado otro tipo de fragmentos repetidos en serie, naturales (Vassart *et al.*, 1987; Fowler *et al.*, 1988) y sintéticos (Ali *et al.*, 1986; Vergnaud, 1989) que se han usado para detectar *loci* hipervariables múltiples.

En el genoma humano es desconocido el número total de *loci* hipervariables, Knowlton y colaboradores (1986) han registrado 1680 recombinantes de una biblioteca genómica humana seleccionada al azar, y han descubierto 12 clones que presentan regiones muy polimórficas. Esto sugiere que el genoma humano contiene por lo menos 1500 regiones (Wong et al., 1987). Otros son los llamados minisatélites (Jeffreys et al., 1985a; 1985b; 1985c) que son considerados como "huellas digitales" de ADN en los que la variación alélica y la localización de las bandas se demuestran más fácilmente. Algunos minisatélites que son muy polimórficos tienen alelos múltiples, los cuales son relativamente raros. Estos sitios proporcionan una herramienta poderosa para distinguir ADN de diferentes individuos y por lo tanto tiene aplicaciones biológicas, antropológicas, médicas y forenses importantes (Jeffreys et al., 1985b; 1985c; Wong et al., 1987)

Por otro lado, la metodología de hibridación ADN-ADN es de uso limitado para la investigación filogenética, debido a la dificultad que representa el desarrollar esta técnica en muestras numerosas (Britten, 1986).

Con los avances en biología molecular se ha descrito un catálogo de alrededor de 4,000 genes transmitidos por herencia mendeliana (McKusick, 1986). Por lo anterior, se puede decir que el sistema humano está equipado con un fenotipo asombrosamente amplio, en donde miles de genes ya se han identificado en virtud del genotipo que se les ha conferido cuando está heredado en forma mutante. El límite de las mutaciones abarca desde deficiencias en enzimas, que son importantes en rutas metabólicas, hasta alteraciones tan sutiles como las

que modifican la psicología (Molecular Biology of *Homo sapiens*, 1986; White y Caskey, 1988).

Es necesario hacer notar que no obstante la complejidad del genoma humano, uno de los papeles centrales en la investigación biomédica contemporánea es la elaboración de mapas. Hasta ahora, el número de loci que han sido organizados en mapas es de menos del 2 % de los 50,000 genes que se ha propuesto que tiene como mínimo el *Homo sapiens* (McKusick, 1986).

Material genético antiguo: Propiedades estado y alcances de la información.

1. Estudios histológicos

Las estructuras subcelulares que contienen a los ácidos nucleicos se encuentran poco preservadas en restos antiguos; por ello, la arquitectura celular y subcelular ha sido técnicamente desafiante y enigmática; al menos, en un caso (Raases II) se han podido distinguir diferentes tipos celulares (Cockburn y Cockburn, 1980). La identificación histológica de tejido normal, o con alguna enfermedad, se ha basado en los patrones de tejido conjuntivo. Se han observado núcleos de restos momificados del Viejo y Nuevo Mundo. Por tinción con hematoxilina, se han podido identificar detalles nucleares en tejidos de por lo menos una momia egipcia de 4,000 años de antigüedad de las 23 examinadas (Pääbo, 1985b) y el análisis de tejido momificado peruano por tinción de Feulgen, revela que aproximadamente 1 de cada 3,000 células musculares contienen núcleos intactos (Rogan y Salvo, 1990).

Otros autores (Romano et al., 1976) han descrito la presencia de células sanguíneas en diversas fases de diferenciación y neutrófilos en restos óseos de 500 años de antigüedad. También se han mostrado osteocitos y núcleos en material óseo prehispánico fechado con 650-750 años de antigüedad (Vargas y Sánchez, 1990).

2. Estudios en proteínas antiguas

Los primeros indicios de que la información genética puede persistir en material antiguo, son las demostraciones de la subsistencia de proteínas en huesos y conchas fósiles de millones de años de antigüedad (Wyckoff, 1972; Weiner *et al.*, 1976; Curry, 1988). Otros datos son los referentes a la composición química, histología, y rutas metabólicas en huesos de dinosaurios fechados en 80 millones de años (Pawlicki *et al.*, 1966; Nowicki *et al.*, 1972; Miller y Wickoff, 1972; Pawlicki, 1976; 1984). Incluso en restos excepcionalmente bien preservados de un mamut siberiano de 40,000 años de antigüedad, el análisis elemental de aminoácidos y de albúmina, así como estudios de microscopía electrónica, han puesto en evidencia diferencias significativas cuando son comparadas con el elefante actual (Sensabaugh, 1982; Prager *et al.*, 1980).

También se han estudiado proteínas en momias peruanas (Pedro y Chinay, 1991).

De estos hechos surge la esperanza de recuperar información genética a partir de la secuencia de aminoácidos provenientes de restos antiguos. De ahí, los grandes esfuerzos realizados en las últimas dos décadas por estos estudios.

Otro tipo de investigaciones, son las referentes a la comparación de la estructura primaria de la albúmina entre especies extintas y vivientes. Con estudios inmunológicos se ha confirmado la relación cercana de parentesco que existe entre el mamut y los elefantes contemporáneos (Lowestein *et al.*, 1981).

A nivel poblacional, los estudios de antropología y paleozoología se han dirigido a determinar la frecuencia de alelos de los loci polimórficos en poblaciones antiguas. Uno de los de mayor interés, ha sido el sistema ABO (Candela, 1936; Wyman y Boyd, 1937; De Terra *et al.*, 1949; Toral 1949; Salazar-Mallén, 1951; Harrison *et al.*, 1969; Allison *et al.*, 1985). Sin embargo, la serología de los grupos sanguíneos en tejidos antiguos presenta dificultades, ya que existe la posibilidad de una degradación diferencial de los antígenos, así como la contaminación de otros antígenos de plantas o microorganismos que pueden reaccionar con el anticuerpo o bien oscurecer los determinantes del grupo sanguíneo. La identificación serológica mediante el sistema antigénico HLA, podría ser de mayor información en restos humanos bien preservados. Además, este grupo tiene la ventaja de disminuir riesgos de reacciones cruzadas irregulares, causadas por proteínas de otros organismos (Hansen y Görtler, 1983). No obstante, se tiene la dificultad inherente de interpretar la reacción, debido a la modificación que presentan los antígenos de los restos, originada por el proceso de la degradación del material biológico.

3. ADN en Restos Antiguos

El primer caso en el que se pudo aislar material genético a partir de un cadáver utilizando los avances metodológicos actuales (Wang y Lu, 1981), plantea la posibilidad de estudiar la información hereditaria de tejidos antiguos a otro nivel, el génico.

Actualmente, uno de los principales objetivos de esta línea de investigación es la búsqueda de ADN en diversos tejidos antiguos, tanto de plantas (Rogers y Bendich, 1985; Rollo et al., 1988; Helentjaris, 1988; Golenberg et al., 1990; Golenberg, 1991; Rollo et al., 1991), como de animales (Higuchi y Wilson, 1984; Johnson et al., 1985; Houde y Braun, 1988; Thomas et al., 1989). Estos resultados se resumen en los Cuadros 1 y 2. Higuchi y colaboradores (1984), fueron los primeros en clonar ADN obtenido de músculo deshidratado de la cuaga (*Equus cuagga*), un miembro extinto de la familia de los caballos de 140 años de antigüedad. Esto representa la primera información filogenética obtenida a través de secuencias de ADN de un espécimen de museo. Día a día se incrementan los estudios referentes a genes mitocondriales en diversos ejemplares (Higuchi y Wilson, 1984; Wrischinick et al., 1987; Higucji et al., 1987 Pääbo et al., 1988; Pääbo, 1989a; 1990a; Thomas et al., 1989.

Por lo que respecta a restos humanos, recientemente se publicó el caso extraordinario del hallazgo de un cerebro en un pantano de Florida, con una antigüedad de 8.000 años, preservado en su cráneo. En este espécimen se han podido estudiar aspectos anatómicos, histológicos e inclusive moleculares tales

como el aislamiento, identificación y amplificación de ADN mitocondrial y de algunos de los genes de la Clase I del sistema HLA (Doran *et al.*, 1986; Pääbo *et al.*, 1988; Lawlor *et al.*, 1991). Más aún, ha sido posible aislar y clonar material genético de una momia egipcia de la sexta dinastía 2770 a 2160 A.C. (Pääbo, 1985b), así como analizar ADN de momias procedentes de sitios arqueológicos de Groenlandia (Thuesen y Engberg, 1990). Otro tipo de estudios son los referentes a la identificación de las secuencias Alu I en momias egipcias y sudamericanas (Pääbo, 1986) y los ADN α 18S y 18S en momias sudamericanas (Rogan y Salvo, 1990); así como la amplificación de los genes mitocondriales correspondientes al citocromo B2, a las posiciones 13282 - 13286 de la región variable y a la región del asa D (Pääbo, 1986; Pääbo *et al.*, 1988; Pääbo, 1989a). Otros trabajos son los referentes a la identificación de HLA en momias (Stanstny 1974; Hansen y Gütler, 1983).

Otro tipo de tejido en el que se aplica la metodología de la biología molecular es el material óseo antiguo. En este tejido se ha logrado la recuperación y el análisis de material genético humano de restos óseos prehispánicos de 650-750 años de antigüedad (Vargas, 1989; Vargas y Sánchez, 1990), la amplificación de ADNmt en material óseo de 7,500 años de antigüedad (Hagelberg *et al.*, 1989), de esqueletos de 1475 años de antigüedad, procedentes de un sitio arqueológico de Groenlandia (Thuesen y Engberg, 1990) y últimamente existen datos referentes a la recuperación de genes nucleares de origen óseo, correspondientes al gene de la fibrosis quística (Turbon, citado por Sykes, 1991); amplificación de una secuencia del cromosoma Y (Hummel y Herrmann, 1991), del exón 7 de la fenilalanil hidroxilasa y fragmentos específicos derivados de

los cromosomas X y 12 (Meijer *et al.*, 1992). También se han identificado víctimas por medio de restos óseos (Hagelberg *et al.*, 1991a). Todos estos estudios se resumen en el Cuadro 2.

No obstante que se puede obtener material genético de diferentes restos humanos antiguos, muchas veces se le encuentra químicamente modificado y en fragmentos de bajo peso molecular como en el caso de tejido momificado (Pääbo, 1989a). La reacción de amplificación por PCR, ha sido modificada para eliminar la inhibición que se produce en el material genético antiguo en dicha reacción; esto ha hecho posible reconstruir secuencias de ADN antiguo (Pääbo, 1989b; 1990a; 1990c). De ahí la conveniencia de tomar en cuenta en el material a estudiar las reacciones *post-mortem* tales como la oxidación de azúcares o modificaciones de bases nitrogenadas (Pääbo, 1986; Rogan y Salvo, 1990) así como las condiciones de enterramiento a las que ha estado sujeto el material a estudiar. Recientemente se ha planteado la posibilidad de formar bibliotecas de ADN por medio de PCR en material antiguo (Foo *et al.*, 1992).

Todas estas investigaciones demuestran que la conservación de material genético bajo condiciones ambientales diversas es un fenómeno factible, por lo que estudios a nivel molecular abren nuevas perspectivas en áreas como: la antropología biológica, paleontología, arqueología, evolución biológica, la ciencia forense, ingeniería genética y biotecnología.

CUADRO 1
ESTUDIOS MOLECULARES EN RESTOS DE PLANTAS Y ANIMALES

ORIGEN	TEJIDO	ANTIGUEDAD (años)	TIPO DE ESTUDIO	REFERENCIA
Maíz	Semillas	$.98 \times 10^3$	Núcleos, nucleolos y cromatina Aislamiento y amplificación de ADN	Osborna <i>et al.</i> (1974) Rollo <i>et al.</i> (1988) Rollo <i>et al.</i> (1991) Belentjaris, (1988)
		3.3×10^3	Clonación de DNAr	Rollo <i>et al.</i> (1991)
Maíz		$.6 \times 2 \times 10^3$	DNA, amplificación de de DNA nuclear y de organelos	Goloubenoff <i>et al.</i> (1991)
Gramíneas	Hojas	$.8-11 \times 10^3$	Extracción de ADN	Rogers y Bendich (1985)
Cactáceas	Semillas	$.5-45 \times 10^3$	Extracción de ADN de alto peso molecular	
Asteráceas	Embriones		ARN	Venanzzi y Rollo, (1990)
Magnolia	Hoja	20×10^8	Gene RECL	Curry (1988), Golenberg <i>et al.</i> (1990)
<u>Taxodium</u>	Hojas	$17-20 \times 10^8$	Secuencia de RECL	Golenberg (1991) Soltis <i>et al.</i> (1992)
Molusco	Concha	80×10^8	Proteínas	Weiner <i>et al.</i> (1976)
Insectos en amber		40×10^3	Ribosomas, cromatina, incorp. de nucleótidos por Random Primer	Poinar y Hees (1982) Higuchi y Wilson (1984)
Dinosaurio	Hueso fosil	80×10^8	Composición Química	Pawlicki <i>et al.</i> (1966), Nowicki <i>et al.</i> (1972), Pawlicki (1976), Miller y Wickoff (1972), Pawlicki (1984)
Mamut	Músculo congelado	40×10^3	Análisis químico Microscopía aminácidos	Senzabaugh Jr. <i>et al.</i> (1982)

CUADRO 1 (Continuación)

ORIGEN	TEJIDO	ANTIGÜEDAD (años)	TIPO DE ESTUDIO	REFERENCIA
Mamut	Músculo desechado y tejido con gelado	53×10^3	Aislamiento y caracte- rización de ADN Albúmina	Frager <u>et al.</u> (1960) Johnson <u>et al.</u> (1985) Lovenstein <u>et al.</u> (1981)
Especies extintas	Piel		Recuperación de ADN	Higuchi y Wilson (1984)
Cuaga	Piel	$.140 \times 10^3$	Secuenciación de ADN ADNmt	Higuchi <u>et al.</u> (1984) Higuchi <u>et al.</u> (1987)
Aves			ADN	Boude y Braun (1988)
Lobo Marsupial	Piel	$.12 \times 10^3$	Clonación y amplifica- ción de ADN	Thomas <u>et al.</u> (1989)

CUADRO 2
ESTUDIOS MOLECULARES EN RESTOS HUMANOS

TEJIDO	ANTIGUEDAD	TIPO DE ESTUDIO	REFERENCIA
Gotas de sangre y semen	0.004×10^3	Identificación de huellas digitales de ADN	Gill <i>et al.</i> (1985)
Cerebro ^a	8.0×10^3	Anatómico, histológico e identificación de ADN mitocondrial Secuencia de ADNmt Caracterización de segmentos de genes nucleares (HLA)	Doran <i>et al.</i> (1986) PÉñbo <i>et al.</i> (1988) Lawlor <i>et al.</i> (1991)
Piel ^b		Grupos sanguíneos	Wyman y Boyd (1937), Boyd y Matton (1943)
Hígado	2.0×10^3	Aislamiento e identificación de ácidos nucleicos	Wang y Lu (1981)
	0.3×10^3	Tipos de HLA	Stastny (1974), Hansen y Güter (1983)
Piel ^b y vísceras ^b	2.4×10^3 5.0×10^3	Aislamiento de DNA, caracterización y clonación de DNA en bacterias Investigación de genética molecular Amplificación de ADN antiguo por PCR	PÉñbo (1984), PÉñbo (1985a), PÉñbo (1985b), PÉñbo (1986) PÉñbo <i>et al.</i> (1989c) PÉñbo <i>et al.</i> (1989b)
Piel ^b	0.5×10^3 0.5×10^3 1.475×10^3	Contaminación por plomo ADNr 28S ADNr 18S Recuperación y análisis de material genético	Horne y Kawasaki (1984), Rogan y Salvo (1990), Thuesen y Engberg (1990).
	0.5×10^3	Amplificación y análisis de HLA y D4S175 Recuperación de ADN y proteína	Haydon y Biukstra (1991), Pedro y Chinay (1991)
Oseo	$11-12 \times 10^3$	Identificación de grupos sanguíneos	Candela (1936), Wyman y Boyd (1937), De Terra <i>et al.</i> (1949), Toral (1949), Salazar-Mallén (1951), Allison <i>et al.</i> (1976), Romano <i>et al.</i> (1976)
	0.5×10^3	Identificación de células	

CUADRO 2 (Continuación)

TEJIDO	ANTIGUEDAD	TIPO DE ESTUDIO	REFERENCIA
Oseo		Detección inmunológica de hemoglobina	Ascenzi <i>et al.</i> (1985)
	1.1 x 10 ³	Análisis de aminoácidos	Von Endt y Ortner (1986)
	5.45 x 10 ³	Amplificación de genes mitocondriales	Hagelberg <i>et al.</i> (1989)
		Aislamiento y caracterización de genes MHC	Schmill y Fritzier (1989)
	0.650 x 10 ³	Aislamiento y caracterización de ADN y ARN	Vargas (1989), Vargas y Sánchez (1990)
	.5-1.1 x 10 ³	Aislamiento y caracterización de ADN	Vargas <i>et al.</i> (1990)
	1.457 x 10 ³	Recuperación y análisis de material genético humano	Thussen y Engeberg (1990)
	0.15-5 x 10 ³	Amplificación de genes mitocondriales	Hsenni <i>et al.</i> (1990)
	0.5 x 10 ³	Amplificación de ADN mitocondrial	Vargas y Mendoza (1991)
		Amplificación de cromosoma Y	Hummel y Herman (1991)
		Métodos de recuperación de ADN	Meijer <i>et al.</i> (1991)
	0.008 x 10 ³	Identificación de un esqueleto	Hagelberg <i>et al.</i> (1991a)
	5.5 x 10 ³	Análisis de ADN de hueso antiguo	Hagelberg <i>et al.</i> (1991b)
		Bibliotecas de ADN antiguo por PCR	Foo <i>et al.</i> (1992)
0.05-.568 x 10 ³	DNA y amplificación de fragmentos específicos de los cromosomas X y Y	Meijer <i>et al.</i> (1992)	
0.5-1.1 x 10 ³	Identificación de Mat-tRNAi	Vargas y Enriquez (1992)	
Dientes	0.15-5 x 10 ³	Amplificación de genes mitocondria	Hsenni <i>et al.</i> (1990)

Tejido húmedo^a

Nomias^b

Por toda esta información se puede describir a la evolución molecular como un proceso diacrónico de cambios genéticos que son el resultado de eventos estocásticos y de selección natural. Al tratar de reconstruir este proceso histórico, se enfrentan una serie de problemas, ya que sólo se tiene información de los genes de poblaciones actuales. De ahí que queden una serie de interrogantes sin responder:

¿Quiénes y cómo eran los antiguos habitantes del actual territorio mexicano?. Estos han sido objeto de estudio de antropólogos físicos desde hace mucho tiempo.

Hasta la fecha los estudios antropofísicos y paleodemográficos han proporcionado datos no sólo sobre sexo, edad, estatura y raza (Comas, 1976; Genovés, 1962; 1966; Jaén y López Alonso, 1974) sino que también han permitido deducir fenómenos tales como curvas de longevidad, mortalidad por grupos, (edad específica) y por sexo, así como algunos aspectos fundamentales de las condiciones de vida a las que algunas poblaciones antiguas estuvieron sujetas. Como ejemplo de esto último podrían mencionarse algunas patologías, estado nutricional y la evaluación de cambios económicos y sociales (Márquez, 1984; Jaén y Serrano, 1974; Serrano y Ramos, 1984).

Uno de los objetivos en el campo de la antropología física es la reconstrucción del pasado a través de los restos óseos. De ahí que surja el interés por utilizar nuevos criterios para complementar otros estudios sobre individuos y poblaciones pretéritas y se planteen las siguientes preguntas:

¿ Por qué no estudiar a los genes de las poblaciones mexicanas prehispánicas mexicanas ? ¿ Cómo se podría llevar a cabo esta investigación ?

Para contestar estas preguntas se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aislar y caracterizar ADN y ARN de restos óseos humanos prehispánicos y coloniales de varios cientos a miles de años de antigüedad.
2. Demostrar su origen humano.
3. Identificar individuos por ADN ("huellas digitales de ADN").
4. Identificar ARN, en particular el ARN de transferencia iniciador (ARNt) para síntesis de proteínas y demostrar su actividad.

El propósito de este trabajo es el de fincar la base de estudios de antropología molecular en material óseo antiguo de diferentes culturas mexicanas, para un futuro estudio sistemático a nivel poblacional con todas las perspectivas que de él se deriven.

MATERIAL Y METODOS

Los restos óseos humanos fueron obtenidos de diferentes zonas de la Cuenca de México: Entierro No. 1 del Peñón de Marquez, con una antigüedad de 650-750 años (Informe del DAF 1984); de Tlatelolco los entierros 1 y 2 del Pozo 20 y los Entierros 1 y 2 del Pozo 21 con una cronología tentativa de 400-500 años; del Sitio Coachilco Entierro 1-11 Azcapotzalco con una antigüedad de 500-700 años (Rescate Arqueológico); Xochimilco: Entierros 1, 2, 3, I, II, III con una antigüedad de 500-700 años; de la zona arqueológica de Tula Hgo., de los sitios: Malinche, Zapata II, Area del Museo (Plaza Charnay) y Viaducto con una antigüedad de 800 a 1110 años y por último de Villa Rica y Manatí, Veracruz con una antigüedad de 500 y 3,000 años respectivamente. En total 146 individuos (Cuadros 3 y 4). Este material fue proporcionado por los arqueólogos: Mta. Blanca Paredes, Ma. de Jesús Sánchez, Margarita Carball, Carmen Lechuga y Dra. Mari Carmen Serra, por los antropólogos físicos Rosa Ma. Peña y Tito G. Mendoza y por la restauradora Leticia Brito a quienes agradezco su colaboración.

1. Aislamiento de ADN.

Se utilizó una modificación al procedimiento de Maniatis y colaboradores (1982): un gramo de tejido se tritura en un mortero con 2.2 volúmenes de SSC IX (NaCl 0.15 M, citrato de sodio 0.015 M) y EDTA 0.0005 M, se lleva a un 0.5 % final de SDS, se extrae con fenol saturado en Tris-HCl (pH 8.0) y con dos extracciones subsiguientes de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se

CUADRO 2

MATERIAL OSEO PREHISPANICO Y COLONIAL DE LA CUENCA DE
MEXICO, MORELOS Y VERACRUZ

SITIO	SEXO	EDAD	ENTIERRO No.	ANTIGUEDAD (años)
Soledad	N.D.	A	Osario	300-400
Peñón del Marquez	F	A	1	650-750
Coachilco Azcapotzalco	N.D.	A	1	500-600
	M	A	2	
	N.D.	I	3	
	N.D.	A	4	
	N.D.	A	5	
	M	A	6	
	N.D.	I	7	
	N.D.	I	8	
	N.D.	A	9	
	F	A	10	
	N.D.	A	11	
Tlatelcico				
Pozo 10	F	I	1	500-600
	M	I	2	
Pozo 21	N.D.	I	1	
	F	A	2	

CUADRO 3 (Continuación)

SITIO	SEXO	EDAD	ENTIERRO No.	ANTIGUEDAD (años)
Xochimilco				
PAX 9	N.D.	I	1	600-700
PAX 9	N.D.	A	2	
PAX 9	N.D.	A	3	
PAX 20	N.D.	I	I	
PAX 20	N.D.	II	II	
PAX 20	N.D.	I	III	
Morelos				
Yautepec			4-2	1200-1500
Xochicalco				550-900
Veracruz				
Manatí			M-1	3000
Manatí			M-2	
Villa Rica			"C"	300
N.D.	No determinado		A	Adulto
F	Femenino		I	Infante
M	Masculino			

CUADRO 4

Relación de entierros de Tula, Hidalgo

Núm. de catálogo	Síto	Núm. de entierro	Núm. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de deformación
001	Área del Museo (Charmey)	5	1	M	Adulto Medio	Ligero aplanamiento en la región lambdica
002	Área del Museo (Charmey)	23	1	F	Adulto Medio	Ligero aplanamiento en la región lambdica
003	Área del Museo (Charmey)	5	3 1 A	M probable	Adulto Avanzado	No
	Área del Museo (Charmey)		1 B	?	Adulto Joven	No
	Área del Museo (Charmey)		1 C	-	Nonato	No
004	Área del Museo (Charmey)	3	1	M	Adulto Joven	No
005	Área del Museo (Charmey)	21	2 1 A	M	Adulto Medio	No
	Área del Museo (Charmey)		1 B	M	Adulto Medio	No
006	Área del Museo (Charmey)	5	1	-	Adulto Medio	No
007	Área del Museo (Charmey)	4	2 1 A	M	Adulto Medio	Tabular erecta típica
	Área del Museo (Charmey)		1 B	F	Adulto Medio	Tabular erecta típica
008	Área del Museo (Charmey)	4	1	-	1a. Infancia	No
009	Área del Museo (Charmey)	30	1	-	2a. Infancia	No
010	Área del Museo (Charmey)	1	1	M	Adulto Avanzado	No
011	Área del Museo (Charmey)	1	1	-	1a. Infancia	No
012	Área del Museo (Charmey)	14	1	M	Adulto Joven	No
013	Área del Museo (Charmey)	29	1	-	1a. Infancia	No
014	Área del Museo (Charmey)	12	1	-	1a. Infancia	No

CUADRO 4 (Continuación)

Núm. de catálogo	Síto	Núm. de entierro	Núm. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de deformación
015	Área del Museo (Charmey)	23	1	M	Adulto Medio	No
016	Área del Museo (Charmey)	20	4 1 A	M	Adulto Avanzado	No
	Área del Museo (Charmey)		1 B	F	Adulto Joven	No
	Área del Museo (Charmey)		1 C	-	Adolescente	No
	Área del Museo (Charmey)		1 D	-	2a. Infancia	No
017	Área del Museo (Charmey)	18	1	M	Joven	No
018	Área del Museo (Charmey)	19	1	F	Adulto Joven	No
019	Área del Museo (Charmey)	5	1	M	Adulto Avanzado	No
020	Área del Museo (Charmey)	11	1	M	Adulto Medio	No
021	Área del Museo (Charmey)	12	1	M	Senil	No
022	Área del Museo (Charmey)	4	1	M	Adulto Avanzado	No
023	Área del Museo (Charmey)	4	3 1 A	M	Senil	No
	Área del Museo (Charmey)		1 B	F	Adulto Avanzado	No
	Área del Museo (Charmey)		1 C	-	Adulto	No
024	Área del Museo (Charmey)	3	1	M	Adulto Avanzado	No
025	Área del Museo (Charmey)	3	1	F	Adulto Medio	No
026	Área del Museo (Charmey)	1	1	F	Adulto Avanzado	No
027	Área del Museo (Charmey)	27	4 1	-	1a. Infancia	No
028	Área del Museo (Charmey)		1	-	1a. Infancia	No
029	Área del Museo (Charmey)		1	-	1a. Infancia	No
030	Área del Museo (Charmey)		1	-	1a. Infancia	No
031	Área del Museo (Charmey)	1	1	M	Adulto Avanzado	No
032	Área del Museo (Charmey)	8	1	-	Subadulto	No
033	Área del Museo (Charmey)	7	1	-	3a. Infancia	No
034	Área del Museo (Charmey)	8	1	-	1a. Infancia	No

CUADRO 4 (Continuación)

Núm. de catálogo	Sito	Núm. de entero	Núm. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de deformación
035	Área del Museo (Cherny)	6	1	-	3a. Infancia	No
036	Área del Museo (Cherny)	3	1	M	Adulto Joven	No
037	Área del Museo (Cherny)	2	1	-	1a. Infancia	No
038	Área del Museo (Cherny)	2	1	-	Adolescente	No
039	Área del Museo (Cherny)	2	2 1A	F	Adulto Joven	Ligero aplastamiento en la región lambdica
	Área del Museo (Cherny)		1 B	F	Adulto Medio	Ligero aplastamiento en la región lambdica
040	Área del Museo (Cherny)	2	1	M	Adulto Medio	No
041	Área del Museo (Cherny)	2	1	-	Nonato	No
042	Área del Museo (Cherny)	1	1	-	Adulto Avanzado	No
043	Área del Museo (Cherny)	32	3 1A	M	Adulto Avanzado	No
044	Área del Museo (Cherny)	32	1 B	F	Adulto Avanzado	No
045	Área del Museo (Cherny)	32	1 C	-	1a. Infancia	No
046	Área del Museo (Cherny)	28	9 1A	-	2a. Infancia	S. A. R. lambdica abombamiento parietal
	Área del Museo (Cherny)	28	1 B	-	2a. Infancia	S. A. R. lambdica abombamiento parietal
	Área del Museo (Cherny)	28	1 C	-	1a. Infancia	No
	Área del Museo (Cherny)	28	1 D	-	1a. Infancia	No
	Área del Museo (Cherny)	28	1 E	-	Nonato	No
	Área del Museo (Cherny)	28	1 F	F	Adulto Medio	No
	Área del Museo (Cherny)	28	1 G	F	Adulto Medio	No
	Área del Museo (Cherny)	28	1 H	M	Adulto Avanzado	No
	Área del Museo (Cherny)	28	1 I	M	Adulto Medio	No

CUADRO 4 (Continuación)

Núm. de catálogo	Sito	Núm. de entero	Núm. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de deformación
047	Área del Museo (Cherny)	2	1	M	Adulto Medio	No
048	Área del Museo (Cherny)	2	1	-	1a. Infancia	No
049	Área del Museo (Cherny)	24	1	-	1a. Infancia	No
050	Área del Museo (Cherny)	25	1	-	1a. Infancia	No
051	Área del Museo (Cherny)	1	1	-	Adulto Medio	No
052	Área del Museo (Cherny)	1 "B"	2 1B	-	Adulto Medio	No
053	Área del Museo (Cherny)	1 "A"	2 1A	M	Adulto Avanzado	No
054	Área del Museo (Cherny)	1	1	-	2a. Infancia	No
055	Área del Museo (Cherny)	1	1	-	1a. Infancia	No
056	Área del Museo (Cherny)	1	1	-	1a. Infancia	No
057	Área del Museo (Cherny)	1	5 1A	F	Adulto Avanzado	No
	Área del Museo (Cherny)	1	1 B	M	Adulto Medio	No
	Área del Museo (Cherny)	1	1 C	M	Adulto Senil	No
	Área del Museo (Cherny)	1	1 D	M	Adulto Avanzado	Ligero aplastamiento en la región lambdica
	Área del Museo (Cherny)	1	1 E	M	Adulto Senil	No
058	Área del Museo (Cherny)	1	1	-	2a. Infancia	No
059	Área del Museo (Cherny)	13	1	-	1a. Infancia	No
060	Área del Museo (Cherny)	14	1	M	Adulto Medio	No
061	Área del Museo (Cherny)	2	1 ?	-	Adulto Medio	No
062	Área del Museo (Cherny)	2	1	F	Adulto Medio	Tuboar erecto (SR)
063	Área del Museo (Cherny)	2	1	F	Adulto Avanzado	No
064	Área del Museo (Cherny)	3	1	F	Adulto Medio	No
065	Área del Museo (Cherny)	4	1	M	Subadulto	No
066	Área del Museo (Cherny)	5	1	F	Senil	No

CUADRO 4 (Continuación)

Núm. de catálogo	Sexo	Num. de entierro	Num. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de deformación
067	Área del Museo (Chamay)	6	2 1 A	F	Adulto Avanzado	No
	Área del Museo (Chamay)	8	1 B	-	1a. Infancia	No
068	Área del Museo (Chamay)	7	1	M	Senil	No
	Área del Museo (Chamay)	21	5 1 A	M	Adulto Joven	Ligero aplastamiento en la región límbica
069	Área del Museo (Chamay)	21	1 B	M	Adulto Joven	Ligero aplastamiento en la región límbica
	Área del Museo (Chamay)	21	1 C	M	Adulto Medio	No
	Área del Museo (Chamay)	21	1 D	M	Adulto Medio	No
	Área del Museo (Chamay)	21	1 E	M	Adulto Avanzado	No
	Área del Museo (Chamay)	21	1 F	F	Senil	No
	Área del Museo (Chamay)	15	1	F	Adulto Medio	No
070	Área del Museo (Chamay)	8m	1	-	2a. Infancia	No
072	Área del Museo (Chamay)	31	1	F	Adulto Medio	No
073	Área del Museo (Chamay)	17	1	M	Adulto Medio	Tabular erecta típica
Cerro de la Malinche						
074	Malinche '80	15	2 1 A	-	Adulto	No
	Malinche '80	15	1 B	-	1a. Infancia	No
075	Malinche '80	14	1	-	Adulto	No
076	Malinche '80	13	1	M	Adulto Avanzado	No
077	Malinche '80	12	1	M	Adulto Avanzado	No
078	Malinche '80	11	1	-	Nonato	No
079	Malinche '80	9	1	-	1a. Infancia	No

CUADRO 4 (Continuación)

Núm. de catálogo	Sexo	Núm. de entierro	Núm. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de deformación
080	Malinche '80	1	1	-	2a. Infancia	NO
081	Malinche '80	2	1	-	1a. Infancia	No
082	Malinche '80	3	1	M	Adulto Medio	No
083	Malinche '80	5	1	-	2a. Infancia	No
084	Malinche '80	6	1	-	1a. Infancia	No
085	Malinche '80	10 D	1	-	1a. Infancia	No
086	Malinche '80	2	1	M	Adulto Avanzado	No
087	Malinche '80	7	1	M	Adulto Medio	No
088	Malinche '80	8	1	M	Adulto Medio	No
089	Malinche '80	10 C	1	M	Adulto Avanzado	No
090	Malinche '80	10 A	2 1	M	Adulto Medio	NO
090	Malinche '80	10 A	1	F	Adulto Avanzado	No
091	Malinche '80	10 B	1	-	Adolescente	No
092	Malinche '80	2	1	F	Adulto Joven	Ligero aplastamiento en la región límbica
092	Malinche '80	2	1	M	Adulto Joven	No
093	Malinche '80	3	1	M	Adulto Medio	No
094	Malinche '80	3	1	M	Adulto Medio	No
095	Malinche '80	4	1	F	Subadulto	No
096	Malinche '80	4	1	M	Adulto Medio	No
097	Malinche '80	5	1	M	Adulto Joven	No
098	Malinche '80	6	1	M	Adulto Joven	No
099	Malinche '80	23	1	M	Adulto Joven	No
100	Malinche '80	22	1	M	Adulto Medio	No
101	Malinche '80	17	5 1 B	-	3a. Infancia	No

CUADRO 4 (Continuación)

Núm. de catálogo	Síto	Núm. de entierro	Núm. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de deformación
102	Malinche '80	13	3 1 C	-	2a. Infancia	No
103	Malinche '80	14	3 1 O	-	2a. Infancia	No
104	Malinche '80	15	5 1 E	-	1a. Infancia	No
105	Malinche '80	10	1	M	Adulto Joven	No
108	Malinche '80	11	5 1 A	-	1a. Infancia	No
107	Malinche '80	7	1	-	Adolescencia	No
108	Malinche '80	8	1	-	2a. Infancia	No
100	Malinche '80	9	1	M	Adulto Joven	No
110	Malinche '80	16	1	-	Adolescencia	No
111	Malinche '80	20	1	M	Adulto Medio	No
112	Malinche '80	19	1	M	Adulto Joven	No
113	Malinche '80	17	1	M	Adulto Medio	No
114	Malinche '80	18	1	M	Adulto Medio	No
115	Malinche '80	21	1	F	Adulto Joven	Ligero aplastamiento de la región lambdica
116	Malinche '80	1	1	F	Adulto Joven	No
117	Malinche '80	1	1	-	Adulto	No
118	Malinche '80	2	1	M	Adulto Medio	No
119	Malinche '80	1	1	F	Adulto Medio	No
120	Malinche '80	1	1	-	Adulto	No
121	Malinche '80	1	1	F	Adulto Medio	Ligero aplastamiento
122	Piazas	2	1	-	2a. Infancia	No
123	Piazas	1	1	M	Adulto Joven	Ligero aplastamiento en la región lambdica con abombamiento en parietales y banda en frontal

CUADRO 4 (Continuación)

Núm. de catálogo	Síto	Núm. de entierro	Núm. de individuo	Sexo	Edad	Tipo de transformación
124	Zapala II (Ladera Oeste T.G.)					
125	Zapala II (Ladera Oeste T.G.)	5	1	F	Adulto Avanzado	No
126	Zapala II (Ladera Oeste T.G.)	1	3 1 A	-	1a. Infancia	No
127	Zapala II (Ladera Oeste T.G.)	1	1 B	-	2a. Infancia	No
128	Zapala II (Ladera Oeste T.G.)	2	1 C	-	1a. Infancia	No
129	Zapala II (Ladera Oeste T.G.)	3	1	F	Adulto Avanzado	Ligero aplastamiento en la región lambdica con abombamiento en parietales y deformación por intrusiones del terreno
130	Vieducto	4	1	F	Adulto Joven	No
131	Vieducto	2	1	-	2a. Infancia	No
132	Vieducto	1	1	-	Adulto Medio	No
133	Vieducto	1	1	-	2a. Infancia	No
134	Vieducto	1	2 1 A	-	1a. Infancia	No
135	Vieducto	1	1 B	-	3a. Infancia	No

Fuente: Paredes Guzmán, Blanca, José Flores y Ernesto Vázquez. "Catálogo de la Colección del Proyecto Tula 1180-1182", en *Revista Mexicana de Estudios Antropológicos*, 1, 2000-2, pp. 198-199, México, 1986.

precipita con etanol, el precipitado obtenido se recupera por centrifugación a 15,000 xg durante 30 min a 4°C y se resuspende en agua. Se guarda a -20°C hasta su uso.

2. Cuantificación de Ácidos Nucléicos.

La cantidad de ácidos nucleicos se calcula por espectrofotometría midiendo la absorción a una longitud de onda de 260 nm, en el que el espectro de éstos presenta un máximo de absorción, correspondiendo a un valor de 45 µg de ARN/ml y de 50 µg de ADN/ml para una absorción de 1 D.O. en celdillas de 1 cm de recorrido de luz (Boedtker, 1968), o por cuantificación de fosfatos (Spirin, 1958).

Otra técnica utilizada para cuantificar ADN es el método de difenilamina (Burton 1968) y por la comparación entre un patrón de ADN de concentración conocida en la electroforesis revelado por la tinción con bromuro de etidio y la muestra problema (Maniatis et al., 1982), y para ARN el método de orcinol (Schneider, 1957)

3. Electroforesis en geles de agarosa.

Las muestras de ADN fueron analizadas por electroforesis en agarosa. A los geles de agarosa (tipo I Sigma Chemical Co.) al 1 % se les aplica una corriente a 80 voltios por 1 h en Tris 0.089 M; ácido bórico 0.089 M y EDTA

0.002 M (TBE 1X). Las bandas fueron visualizadas por tinción con bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 20 min (Maniatis et al., 1982).

4. Recuperación de ADN de Alto Peso Molecular.

Se siguieron dos métodos a) Electroelución y b) separación con membrana de DEAE- celulosa NA 45 (Scheleicher & Schuell).

a) Electroelución (Maniatis et al., 1982).

Se corre el gel de agarosa y se localiza la banda de alto peso molecular utilizando U.V. de onda larga (300-360 nm). Se corta el pedazo de agarosa donde se encuentra la banda , se introduce en una bolsa de diálisis y se agrega TBE 0.5 X. La bolsa se coloca en una cámara de electroforesis y se corre a 100 V por 2-3 horas. De esta manera se electroeluye en el amortiguador de la bolsa . Se cambia la polaridad de la corriente por 2 min para liberar al ADN que se haya pegado a la pared de la bolsa. Se toma el amortiguador con el ADN y la porción eluida se extrae con fenol y fenol cloroformo. Se precipita con etanol. Se resuspende en agua y se guarda a - 20°C hasta que se use.

b) Se siguió una modificación del método Dretzen y colaboradores (1980).

Se hace una electroforesis en agarosa al 1 % del ADN del tejido óseo antiguo. Se localiza la banda de alto peso molecular y en la base se hace una incisión . Se introduce un fragmento de membrana de DEAE-celulosa NA 45 (Scheleicher & Schuell) previamente saturada en NaCl 2.5 M. La electroforesis

se continúa hasta que el ADN se adhiere a la membrana. Esto se registra por la fluorescencia del ADN en la membrana. Esta se coloca en un tubo ependorff y se agrega amortiguador de elución NaCl 0.15 M, EDTA 0.1 M y Tris- HCl 0.020 M (pH 8.0) (NET). Se incuba por 3 h a 68°C y se recupera con un pulso en la microfuga (colocando la membrana en la parte superior), se agrega TE. Se elimina el bromuro de etidio con tres extracciones con butanol. Se precipita con etanol y se guarda a -20°C.

5. Sondas Monolocus.

Las sondas monolocus fueron adquiridas de Cellmarck Diagnostics y se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6. Transformación bacteriana.

Se realizó utilizando el método de Cohen et al. (1983).

Se transformaron las cepas de *Escherichia coli* 1) STB con el plásmido pHB1 construido por inserción de un fragmento de 4.4 Kilobases (Kb) de ADN humano, que contiene el gene de la β -globina, al único sitio de Pst I en el plásmido PBr322 (Huttner et al., 1979 que fue donado por el Dr. Fernando Montiel (Fac. de Química UNAM) y 2) la cepa C-600 con el gene humano del factor de elongación ϵ (HEF- ϵ) clonado en PBR 322 que fue proporcionado por el Dr. Mario Castañeda (IIBM - UNAM). sonda proveniente del laboratorio del Dr. W. Moller de Leiden, Holanda.

1. Se crecen las bacterias en medio Luria sin antibiótico y con timidina (50mg/1000ml) por toda la noche a 37°C.

2. Se toma una colonia de la cepa a utilizar y se inocular en 5 ml de medio Luria sin antibiótico y con timidina, se dejan bajo agitación por toda la noche. De este cultivo se toman 0.2 ml y se inoculan 10 ml de medio Luria en las mismas condiciones descritas líneas arriba. Se coloca bajo agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.6 a 660 nm. Se centrifuga a 3,000 rpm (centrífuga clínica) por 5 min.

3. El precipitado se resuspende en CaCl₂ 50 mM en Tris-HCl (pH 8.0) y con timidina (5µg/ml). Se centrifuga a 3,000 rpm por 5 min y se resuspende en CaCl₂ 100 mM. Se incuba en hielo por 5 min. Las células así obtenidas son susceptibles de ser transformadas (células competentes).

4. Se colocan 200 µl de células competentes y 10 µl del plásmido con el inserto correspondiente en Tris-HCl 10 mM (pH7.5) . Se incuba en hielo por 15 min. Se da un choque térmico por 2 min y se inocular un tubo con medio Luria. Se incuban por 1 h a 37°C. Se centrifugan a 3,500 rpm por 5 min a temperatura ambiente.

5. Se colocan las células en placas con tetraciclina. Se dejan toda la noche a 37°C. Se seleccionan y se mantienen las colonias con los plásmidos en cajas Petri con medio selectivo. Cada mes se resiembran para conservar las cepas transformadas y se guardan a 4°C hasta la siguiente resiembra.

7. Preparación del plásmido a gran escala por lisis alcalina.

Se siguió el método de Birhoim y Doly, (1979). resumido en los siguientes pasos:

- 1.- Sembrar células de *E. coli* en Luria toda la noche en 500 ml.
2. Cosechar a las células por centrifugación a 7,000 rpm (GSA).
- 3.- Resuspender cada botella en 5 ml de solución I (glucosa 55mM Tris-HCl 25mM) y EDTA 10 mM) y Lisozima (5 mg/ml) 0.25 g/tubo.
- 4.- Transferir a tubos del rotor SW27 (Beckman) e incubar temperatura ambiente por 5 min.
- 5.- Agregar 10 ml/tubo de la solución II (Na OH 0.2 N y SDS 0.1% FRESCA. Mezclar e incubar en hielo por 10 min.
- 6.- Adicionar 7.5 ml de la solución III (CH3COOH 5.0 M (pH4.8) y CH3COOH). FRIA. Mezclar e incubar en hielo por 5 min.
- 7.- Centrifugar a 65,000 xg (SW 27 a 20,000 rpm) por 20 min a 40°C.
- 8.- Transferir al sobrenadante a 2 tubos Corex.
- 9.- Agregar 0.6 vol de iso-propanol.
- 10.- Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 15 min.
- 11.- Centrifugar a 12,000 xg (HB4 9,000 rpm) por 30 min a temperatura ambiente.
- 12.- Resuspender en STE [Tris-HCl 10 mM (pH 8.0)]; NaCl 100mM y EDTA 1 mM]. 6.48 ml/tubo.
- 13.- Guardar en tubos ependorff a -200°C.

8. Preparación del gradiente de ClCs.

La purificación de los plásmidos con los genes humanos de β -globina y del factor de elongación 1c (HEF-1c) se hizo por medio de un gradiente de cloruro de cesio (CsCl), siguiendo el método descrito por Maniatis *et al.*, (1982). Se prepara agregando 6.5 g de CsCl por cada 4.5 ml. de plásmido y 0.1 ml. de EDTA 0.2 M.; 0.625 ml. de Tris-HCl (pH 8.0) y el mismo volumen de Tris-HCl (9.5), ambos a una concentración de 1.0 M, 0.25 de sarcosil al 20 % y bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. Se centrifuga a 47,000 rpm (rotor 50, Beckman) por 16 horas.

Se extrae la banda de DNA del plásmido con una jeringa con aguja gruesa 18 x 38 mm (1 1/2). Se trata con isopropanol saturado en STE-NaCl (3 veces). Se toma la fase colorida hasta eliminar el Br-Et. Se agregan 5 vol. de agua bidestilada y estéril. Se agregan 2 vol. de etanol, y se dejan precipitando: a) -70°C por 30 min o b) -20°C por 120 min.

9. Aislamiento del inserto o sonda. Purificación de ADN de Alto Peso Molecular

Se siguió el método descrito por Maniatis *et al.* (1982).

- 1.- Electroforesis en gel de agarosa al porcentaje requerido para cada inserto o sonda.

- 2.- Cortar al DNA con las enzimas de restricción indicadas para cada inserto o sonda.
- 3.- Calentar a 70°C por 15 min (Para romper extremos cohesivos).
[COLOCAR EN HIELO]
- 4.- Correr gel de agarosa con marcador. Según el resultado se purifican los fragmentos.
- 5.- Digerir al DNA en gran escala con las enzimas de restricción indicadas.
- 6.- Aplicar una corriente de 90 Voltios al gel de agarosa y visualizar las bandas con U.V. onda larga.
- 7.- Hacer un corte inmediatamente abajo de las bandas formando un pocillo.
Este se llena con glicerol 50 % en TBE 1X.
- 8.- Correr el gel y la banda se recolecta en el pocillo (2-3 veces) hasta que ya no se observe.
- 9.- Pasar a un tubo ependorff. Agregar 1/20 vol de CH3COONa 3M y 2 vol de etanol.
- 10.- Precipitar -20°C 120 min o toda la noche o 1
 -70°C 30 min
- 11.- Centrifugar en la microfuga por 10 min. Lavar con etanol al 70 %
- 12.- Centrifugar en la microfuga por 15 min. Resuspender en 50 µl de STE.
- 14.- Comprobar al inserto o sonda en gel de agarosa.

Esta metodología también fue usada para obtener ADN de alto peso molecular.

Otra manera de obtener al inserto es utilizando membranas de celulosa DEAE-81 o MA45 como se describe líneas arriba.

10. Hibridación Tipo Southern.

Se siguió la metodología de Southern (1975). Las muestras a hibridar se procesaron de la siguiente manera:

- A. Transferencia del DNA de geles de agarosa a los filtros de nitrocelulosa o de Nylon DEAE- 81 y Nytran respectivamente..
- 1.- Preparar un gel de 0.8 cm de grosor y al 0.8 % y aplicar una corriente de 80 voltios.
 - 2.- a) Colocar el gel en HCl 0.25 N 10 min, con un cambio de 250 ml a temperatura ambiente. Lavar con agua destilada.
b) O bien colocarlo en el transiluminador 30 seg.
 - 3.- Colocar en NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M por 1 hora con un cambio de 250 ml.
 - 4.- Lavar con agua destilada.
 - 5.- Colocar en Tris-HCl 0.5 M (pH 7.4) y NaCl 3 M por 1 hora con un cambio de 250 ml.
 - 6.- Montar el sistema de transferencia.
 - 7.- Dar 12 horas de transferencia.
 - 8.- Colocar al filtro entre dos hojas de papel Whatman y hornear a 80°C por 4 horas a 20 mmHg.

11. Marcaje del inserto o sonda.

Para marcar el inserto o sonda (β -globina, HEF-1c y la sonda monoclonal MS1), se utiliza el juego para marcar ADN por medio de Random Primer con el Fragmento Klenow, siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Int., 1991).

La reacción en un volumen final de 50 μ l contiene: ADN lineal 25-50 ng., amortiguador, mezcla de desoxinucleótidos, dNTP- 32P (3000Ci/mmol) y fragmento Klenow. Se incuba por 3 horas (como tiempo mínimo). Pueden ser 24 horas. La reacción se detiene con 5 μ l de EDTA 0.5M (pH 8.0). Se agregan 115 μ l de STE. La muestra obtenida puede seguir dos caminos:

I. Pasar por una columna de Sephadex G-50 (Maniatis *et al.*, 1982).

II. Precipitar con CH₃COONa 3 M pH (5.2) y ADN de espermatozoos de salmón.

I Columna de Sephadex G-50.

- 1.- Se prepara una columna de Sephadex G-50.
- 2.- Se centrifuga durante 4 min a 1500 rpm y temperatura ambiente.
- 3.- Se enjuaga con 150 μ l de STE.
- 4.- Se coloca la muestra radiactiva sobre el Sephadex G-50.

- 5.- Se pone un tubo ependorff (sin tapa) en la base de la jeringa y se centrifuga a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente (para recuperar la sonda marcada).
- 6.- Se registra la marca con el Geiger aproximadamente a un metro de distancia. La muestra debe tener aproximadamente un 50 % de la marca registrada en la columna.

II. Precipitación con CH₃COONa y DNA de esperma de salmón.

- 1.- Después de marcar la sonda, agregar 5 µl de CH₃COONa 3 M (pH 5.2) y 5 µl de DNA de esperma de salmón (100 µg/ml).
- 2.- Añadir 2.5 vol. de etanol frío (125 µl). Dejar 5 min a temperatura ambiente
- 3.- Pasar a la microfuga 5 min. Decantar.
- 4.- Resuspender en 4.5 µl de STE. Agregar 5 µl de CH₃COONa 3M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol frío (125 µl).
- 5.- Dejar a temperatura ambiente por 5 min. Centrifugar en la microfuga por 5 min.
- 6.- Decantar y resuspender en 250 µl.
- 7.- Hervir por 5 min y pasar a hielo inmediatamente.

12. Cuantificación de la actividad específica del inserto o sonda.

- 1.- Tomar 1 µl de la muestra obtenida ya sea por los pasos I ó II.
- 2.- Agregar 50 µg de DNA de esperma de salmón.
- 3.- Adicionar 3 ml de TCA 10 %. Dejar por 3-6 min en hielo.

- 4.- Filtrar en filtro de fibra de vidrio 934 AM Whatman
- 5.- Lavar 3 veces con TCA 5 % y 2 veces con etanol al 95 %.
- 6.- Secar y contar en líquido de centelleo.

13. Prehibridación.

El filtro de nitrocelulosa o Nytran se trata de la siguiente manera: Se utilizan 0.2 ml/cm²

Formamida desionizada	50 %	Final
SSPE	5	X
Reactivo de Denharth	5	X
SDS	0.1	%
DNA de esperma de salmón	100	µg/ml

Se incuba por 24 horas a 42°C

- 1.- Humedecer el filtro en SSC IX.
- 2.- Agregar el volumen necesario (0.2 ml/cm²) del reactivo de prehibridación.
- 3.- Todo esto se coloca en una bolsa de polietileno, sellándola y evitando que se formen burbujas.
- 4.- Se puede preincubar por 45 min a 65°C, 3 horas a 40°C o por 24 horas a 40°C.

14. Hibridación.

- 1.- Al inserto o sonda obtenido por I ó II se le añade 1 ml de la solución de prehibridación. Se toman 5 ml de la solución de prehibridación (de la bolsa), el resto se elimina o se guarda a 4°C. (Se puede usar solamente 2 veces).
- 2.- Los 5 ml que se separaron se añaden a la bolsa y por último el mililitro que contiene al inserto o sonda radiactiva, previamente se desnaturaliza a 92°C y se enfría inmediatamente.
- 3.- Se sellan las bolsas y se incuban a 40°C de 24-36 horas

15. Lavado de los filtros.

- 1.- Después de hibridar se retiran del baño de incubación.
- 2.- Se lavan dos veces con SSC 2 X y SDS 0.1 % por 30 min c/u (con dos cambios de 250 ml c/u). Previamente se vacía el contenido de las bolsas y se guarda a -70°C.
- 3.- Se registra con el Geiger para detectar la radiactividad.
- 4.- Se lava 2-3 veces con SSC 0.2 X y SDS 0.1 % 15 min c/u por 30 min a 52°C en baño de agitación.
Para las sondas monoclonales los filtros se lavan con SSC 0.1 % y con SDS 0.1 % a 65°C (3X).
- 5.- Se registra con el Geiger para detectar si la radiactividad está localizada o distribuida. Dependiendo del resultado se lava otra vez con SSC 0.2 X y SDS 0.1 % a 52 % por 30 min en baño de agitación.

- 6.- Se acomoda entre papel Ega-Pack.
 - 7.- Se coloca en una pantalla y se expone a una película Kodak X-OMAT o Cromex 4 de Dupont. Se guardan a -70°C .
 - 9.- Se revelan las placas o películas expuestas.
16. Obtención de ARNT.

Se preparó ARNT de material fresco proveniente de placenta humana (proporcionada por el Centro Quirúrgico Privado, Unidad de Gineco-Obstetricia de Sta. Teresa, D.F.) y de cerebro de rata recién nacida; así como de material óseo prehispánico y colonial. El método utilizado fue una modificación de Yang y Novelli (1971).

Los tejidos (placenta y cerebro) se cortan en pequeños pedazos. El hueso se tritura en un mortero. Todos los pasos se llevan a 4°C . Se homogeniza en Sacarosa 0.35M; Tris-HCl 0.05M (pH 7.4); KCl 0.05M y EDTA 0.001M (pH 7.4). Se centrifuga a 15,000 x g por 15 min. El sobrenadante obtenido se centrifuga a 30,000 x g por 15 min. El sobrenadante se centrifuga a 100,000 x g por 2 horas. Se toman las 3/4 partes del sobrenadante de 100,000 x g y se agregan 2 volúmenes de fenol saturado en Tris-HCl 0.05M (pH 7.4). Se centrifuga a 10,000 x g por 10 min. Se realizan dos extracciones subsiguientes con fenol y se precipita con etanol. El precipitado se recupera por centrifugación a 20,000 x g y se resuspende en Tris-HCl 0.05M (pH 8.9) y se incuba por 45 min a 37°C (para desacilar al ARNT). Se dializa contra agua bidestilada y se guarda a -20°C .

17. Preparación de Factores de Iniciación y Ribosomas.

Se prepararon de acuerdo al método de (Vargas y Castañeda, 1983). Todos los pasos se llevan a 4°C. La placenta se corta en fragmentos pequeños y se homogeneiza en un Potter-Elvehjem en una solución que contiene : Tris-HCl 50 mM; (pH 7.4); KCl 35 mM; acetato de magnesio 5 mM; DTT (ditiotreitól) 1mM y Sacarosa 350 mM. El homogeneizado se centrifuga secuencialmente a 15,000 , 30,000 y 100,000 x g por 15, 15 y 120 min respectivamente. El precipitado microsómico se lava y se resuspende en Tris-HCl 50 mM (pH7.4); KCl 35 mM; DTT 1 mM y glicerol 10 % . La suspensión se lleva a 0.5 M final con respecto a KCl. Se agita por 1.5 h, y se centrifuga a 150,000x g por 120 min. El sobrenadante obtenido es la fracción correspondiente a los factores de iniciación. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry et al., (1951) con albúmina sérica bovina como estándar.

El precipitado obtenido del lavado con KCl 0.5 M , se lava y resuspende con una solución que contiene : Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), Acetato de magnesio 1 mM, EDTA 0.1 M y Sacarosa 250 mM. La suspensión se clarifica por centrifugación y el sobrenadante constituye la preparación de ribosomas.

18. Preparación del [35S] Met-ARNTi.

El ARNT obtenido se aminoacila con L-[35-S]-Metionina en las condiciones descritas para el Met-ARNT iniciador utilizando las aminoacil-ARNT sintetasas de *Escherichia coli* (Stanley,1974). La reacción se lleva a cabo en un volumen final

de 0.1 ml de una mezcla de reacción que contiene: Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), KCl 70 mM, MgCl₂, DTT 3 mM, ATP 1 mM, fosfoenol piruvato 3 mM, piruvato cinasa 10 µg, [35S]-Met (0.45 µCi) y ARNT 100 µg. La reacción se inicia con la adición de las aminoacil-ARNt sintetasas de *E. coli* y se incuba a 37°C por 30 min. La reacción se detiene por la adición de Metionina 0.1M y agua a 4°C. La mezcla se aplica a una columna de DEAE-celulosa (4.5 x 7 cm) equilibrada con acetato de potasio 50 mM (pH 5.0) y KCl 250 mM. El met-ARNt iniciador se eluye con KCl 1 M, se concentra por precipitación con etanol, se resuspende en agua y se guarda a -80°C.

19. Ensayos Enzimáticos.

La actividad de los factores de iniciación fue medida por dos ensayos:

1) Formación del complejo ternario Met-ARNti-IF-2-GTP y 2) Unión del complejo ternario a los ribosomas, reacción que es dependiente de la presencia de AUG. La actividad específica que se obtiene con ambos ensayos es comparable.

La formación del complejo ternario se realiza como describe Vargas y Castañeda (1983) en una mezcla de reacción (volumen total 0.1 ml.) que contiene: Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), KCl 100 mM, GTP 1.5 mM, DTT 1 mM, fosfoenol piruvato 3 mM, piruvato cinasa 10 µg, [35-P]-Met-ARNt 20 µg (0.45 µCi), y 150 µg de la preparación de factores de iniciación. Después de incubar a 37°C por 15 min, la reacción se detiene por la adición de 3 ml de una solución amortiguadora que contiene Tris-HCl 20 mM (pH 7.4) y KCl 100 mM. La mezcla se pasa por filtro de

nitrocelulosa (Millipore HWAP 0.45 μ m). La radiactividad del filtro, representa la cantidad de [35S]-Met-ARnti unido al complejo ternario y se cuenta en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 1801) con un 95 % de eficiencia.

La unión del [35S]-Met-ARnti a los ribosomas se estima utilizado el procedimiento de Crystal y colaboradores (1974) en una mezcla de reacción que contiene: Tris-HCl 50 mM (pH 7.4); KCl 70 mM, MgCl₂, DTT 3 mM, ATP 1 mM, fosfoenol piruvato 3 mM, piruvato cinasa 10 μ g, [35-S]Met (0.45 μ C) y ARnt 100 μ g. La reacción se inicia con la adición de aminoacil-ARnt sintetadas de *E. coli* y se incuba a 37°C por 30 min. La reacción se detiene al agregar Metionina y agua a 4°C. La mezcla se aplica a una columna de DEAE-celulosa (4.5 x 7 cm) equilibrada con Acetato de Potasio 50 mM (pH 5.0) y KCl 250 mM. El [35-S]-Met-ARnt iniciador se eluye con KCl 1 M, se concentra por precipitación con etanol, se resuspende en agua y se guarda a -80°C.

RESULTADOS

Observaciones histológicas.

Al hacer la tinción de los cortes histológicos de cadera y vértebra de 650 a 750 años de antigüedad (Figura 1) se observa claramente material celular y núcleos, tanto de tejido sanguíneo como de tejido óseo. Romano y colaboradores (1976) han descrito células sanguíneas en diversas fases de diferenciación y neutrófilos en esqueletos prehispánicos de 500 años de antigüedad. Resultados semejantes se han reportado en tejido momificado y en tejido húmedo de cerebro (Cockburn y Cockburn, 1980; Pääbo, 1985a; Doran *et al.* 1986; Rogan y Salvo, 1990) en donde se han podido distinguir diferentes tipos celulares y núcleos. Todos estos resultados indican que algunas células y sus componentes pueden ser preservadas en restos humanos, que se han mantenido en diversas condiciones ecológicas.

Observaciones bioquímicas y de biología molecular

1. Aislamiento y caracterización de ácidos nucleicos.

Los resultados de la extracción de ácidos nucleicos de los 146 restos óseos prehispánicos provenientes de las diferentes zonas de la Cuenca de México, de la zona arqueológica de Tula, Hgo. y de Veracruz mostraron semejanzas.



A



B

Figura 1. Secciones de tejido óseo con una antigüedad de 650-750 años del entierro No. 1 de Peñón del Marquez, provenientes de (A) cadera y (B) de vértebra. Tinción May-Grüelnad-Gimsa. Aumento 400x200.

La recuperación y calidad de los ácidos nucleicos obtenidos en cinco muestras diferentes escogidas al azar pueden resumirse en el cuadro 5. La cantidad total es de 123-196 μ /g de tejido determinada por los métodos de Spirin (1958) y de Boedtker (1968). Esto significa que el porcentaje de recuperación con respecto a tejido fresco oscila entre 12.5 y 20 %, cantidad semejante al obtenido en tejido momificado (P&Mbo, 1985b). Sin embargo, alrededor de 2-3 % es ADN y el resto corresponde a ARN; estos porcentajes fueron obtenidos al cuantificar al ARN por medio del método de orcinol (Schneider, 1957); y para el ADN con el método de difenilamina (Burton, 1968). La cantidad de ADN del material óseo de las muestras óseas restantes fue semejante a las reportadas en el cuadro 5 (resultados no mostrados).

Por el momento se desconoce la cantidad de ácidos nucleicos que se obtiene de material óseo humano de entierros recientes. Este tipo de trabajo se ha planteado con material óseo de animales y por el momento se llevan a cabo experimentos al respecto.

Al usar Ribonucleasa durante la extracción de los ácidos nucleicos, la cantidad de ADN es de 9 μ g/g de tejido que corresponde a un 2.5 % del total de los ácidos nucleicos, este porcentaje es igual al que se obtiene cuando se cuantifica por los métodos anteriormente mencionados (cuadro 5). Esto significa que el rendimiento de ADN en restos óseos se sitúa dentro de los valores reportados para otros tejidos antiguos.

CUADRO 5

ACIDOS NUCLEICOS DE TEJIDO OSEO ANTIGUO

EXTRACCION	RECUPERACION (ug/g tejido)*	RECUPERACION (% tejido fresco)	DIFENIL AMINA (u/g tej.)	ORDINOL (u/g tej.)
1	123	24.6		
2	196	39.0	15	191
3	150	30	13	137
4	170	31.2	19	138
5	9 ^a	2.5		

* Determinación por el método de Spirin.

a Tratamiento con RNAasa durante la purificación.

Por lo que respecta al ARN, la cantidad que se obtiene al estimarse con orcinol es de 138-181 $\mu\text{g/g}$ de tejido (cuadro 5). Si esta cantidad se compara con el ARN total de tejido fresco, se obtiene alrededor de un 20 %.

La pureza del material determinada por la relación de las lecturas a 260/280 nm para ARN y ADN se encuentran entre 1.7-2.0. Si se reextrae con fenol la relación se incrementa de 2.0 - 2.3, lo que indica que la contaminación por proteína disminuye.

Para comprobar que el material aislado corresponde a ácidos nucleicos se utilizaron los siguientes criterios:

a) Espectro de absorción en ultravioleta (U.V.).

Se hizo la comparación entre los espectros de absorción a 260 nm del ADN humano obtenido de un cultivo celular de fibroblastos (BACD) (figura 2, curva A) y del ADN purificado de tejido óseo antiguo (figura 2, curvas B, C, D, y E). En el caso del tejido óseo se observa una coloración que dependiendo de la muestra oscila entre amarillo a café oscuro, lo que modifica el espectro típico de ácidos nucleicos (figura 2, curva B). Para eliminar al pigmento, las muestras fueron sometidas a una cromatografía en gel de Sephadex G-10 (Doran *et al.*, 1986), a electroforesis en gel de agarosa, recuperando el ADN en una membrana de DEAE-Celulosa o a la técnica de aislamiento del inserto como se describe en material y métodos. La calidad del espectro después de usar cualquiera de los métodos descritos mejora, dando como resultado un espectro característico de

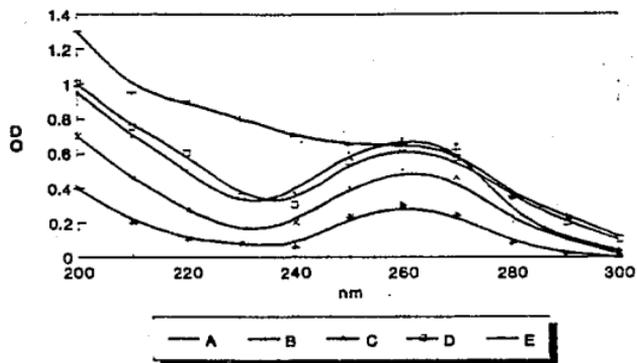


Figura 2. Espectro de Absorção em Ultravioleta. Se tomaram 10 μ l de ADN con y sin pigmento (eliminado como se describe en material y métodos):

ADN de cultivo celular	A
ADN de material óseo con pigmento	B
ADN de material óseo sin pigmento	C
Cromatografía en Sephadex G-10	D
Electroelución o Recuperación en DE-81 o NA-45	E
Aislamiento de ADN de Alto Peso Molecular	E

ácidos nucleicos (figura 2, curvas C, D, y E); no obstante, la recuperación del ADN varía de acuerdo al método utilizado (Figura 2).

b) Electroforesis en geles de agarosa.

Otro procedimiento utilizado para identificar al material genético fue mediante la electroforesis en agarosa. En las figuras 3-9 se muestra el patrón obtenido después de tefir el gel con bromuro de etidio, el cual revela ADN de alto peso molecular y degradado proveniente del material óseo prehispánico y colonial, con una antigüedad de 300 a 3000 años. El peso molecular que manifiesta se localiza entre 0.125 a >23.1 Kb, a diferencia del obtenido en otros restos humanos cuyo límite se encuentra entre 0.5 y 12 Kb (Doran *et al.*, 1986; Pääbo, 1986; Thuesen y Engberg, 1990; Hagelberg *et al.*, 1991; Meijer *et al.*, 1992). Es importante hacer notar que aún cuando las muestras provengan del mismo sitio, el ADN puede presentarse de bajo y de alto peso molecular (figuras 3-10).

Si se compararan los diferentes ADNs con respecto al peso molecular se encuentran de >23.1 Kb, como las muestras coloniales de la iglesia de la Soledad y de la Villa Rica, con 300 y 500 años de antigüedad respectivamente (figuras 3 y 9) y en los esqueletos prehispánicos de Tula y Xochimilco fechadas con 800 a 1000 años y 600 a 700 años de antigüedad respectivamente (figuras 5 y 9). El material genético de los esqueletos de 800 a 1,110 años de antigüedad se encuentra entre 0.56-67.0 Kb (Figura 3-9). Sin embargo, las muestras más antiguas, las de Manatí, Ver. y las de Yauhtepec, Mor. fechadas con 3,000 y 1,500

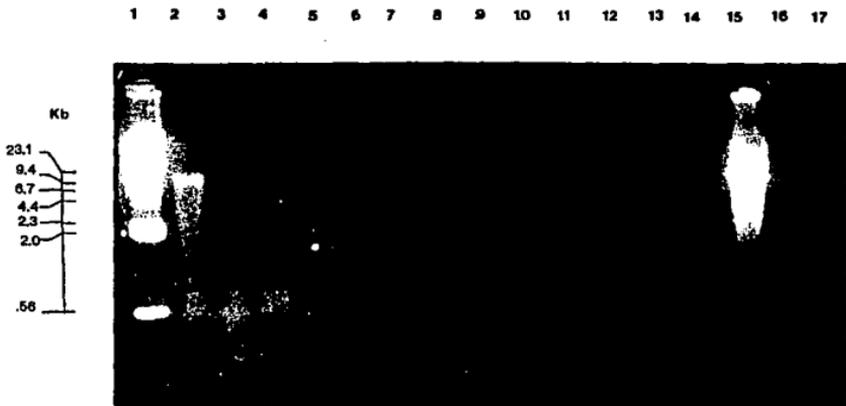


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN actual y de restos óseos humanos prehispánicos y coloniales de la Cuenca de México (Cuadro 3).

Carril(es)	Muestra
1	Marcador λ HindIII
2	Colonial (Iglesia de la Soledad)
3	Prehispánico (Peñón del Marqués)
4-14	Prehispánico (Sitio Coachilco)
15	Cultivo fibroblastos humanos (BAZD)



Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para ADN de restos óseos prehispánicos de Tlateloco, D.F.

Carril(es)	Muestra
2	Entierro 1A
3	Entierro 2A
4	Entierro 1B
5	Entierro 2B

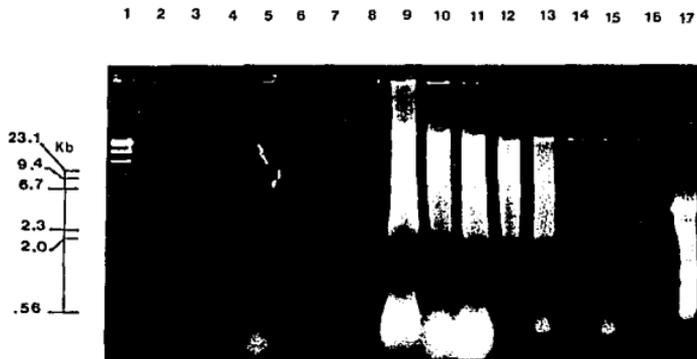


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de esqueletos prehispánicos de la zona arqueológica de Tula, Hgo. (Cuadro 4).

Carril(es)	Muestra
1	Marcador λ HindIII
2-8	Malinche (Pozo 14, ent. 18-23 y 28)
9	(Pozo 15, ent. 1)
10	(Pozo 16, ent. 1)
11	(Pozo 16, ent. 2)
12-16	ZapataII (Ent. 1-5)
17	PBR 322 HinfI

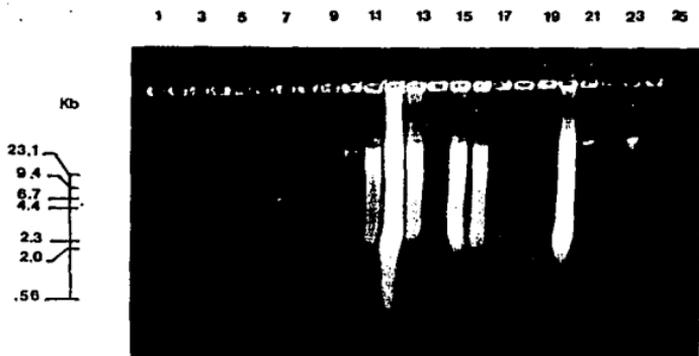


Figura 6. Electroforesis en agarosa al 1 % para ADN de esqueletos prehispánicos de Tula, Hgo. Sitio Charnay o Area del Museo (Cuadro 4).

Carril(es)	Muestra
1-3	Pozo 40 ent. 4-6
4-5	Co 23 y 24
6	2a. Fase, ent. 21
7	Area A, ent. 19
9-12	Area B, ent. 12,13,16 y 17
13	Pila 24, ent. 2
14	Pozo 7, ent. 3
15-16	Pozo 26, ent. 1 y 2
17	Pozo 27, ent. 1
18	Pozo 29, ent. 1
19-21	Pozo 31, ent. 28, 30 y 31
22	Pozo 33, ent. 1
23	Pozo 38, ent. 2
24-25	Area B, ent. 15 y 17

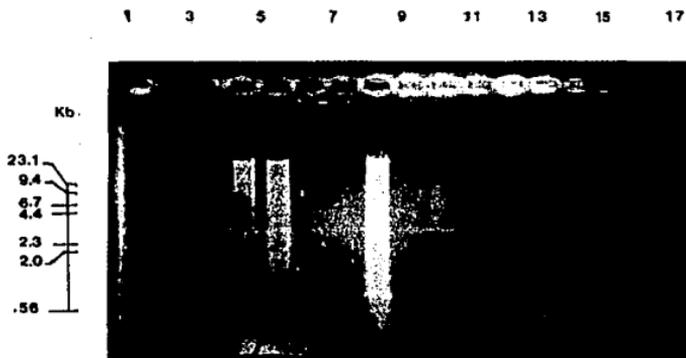


Figura 7. Electroforesis en agarosa al 1 % para ADN de esqueletos prehispánicos de la zona arqueológica de Tula Hgo. Sitios Charnay y Malinche.

Carril(es)	Muestra
4	Malinche A
5	B
6	C
7	D
8	E
9	F
10	G
11	H
12	I
13	J
14	K
15	Ma80 Mont 1, Ent. 1
16	Cha81 CD, Ent. 27
17	Cha81 AA, Ent. 18

1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25



Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % para ADN de restos óseos prehispánicos de Tula, Hgo. Sitio Charnay.

Carril(es)	Muestra
2	Area A, ent. 20
3-4	Area B, ent. 14-15
5	Area B", ent. 15
6	Area C, cepa 2, ent.2
7-8	C/698 ent. 21 y 21"
9	Pozo 8, ent. 2
10	Pozo 14, ent. 3
11-12	Múltiple ent. 9A y 9D
13	Pozo 25, ent. 1
14-16	Pozo 27, ent. 2, 3 y 6
17-18	Pozo 31, ent. 28 y 28(7)
19	Pozo 40, ent. 7
20	Cepa 1, ent. 2 29B
21	Cepa N 14, ent. 23
22	Viaducto 80, Pila 23, ent.1
23	Viaducto 80, Pila 24, ent.1(Olla)
24	Pila 24, ent.1
25	Juego de Pelota

años de antigüedad respectivamente, sólo se presenta ADN de bajo peso molecular 0.56-12.0 Kb (Figura 9). En el entierro 1 (PAX9), la cantidad de ADN que se obtuvo fue baja y con un peso molecular de 9.4 Kb; en el entierro 2 (PAX) se obtuvo mayor cantidad y, simultáneamente, alto y bajo peso molecular; y, finalment, en el entierro 3 (PAX), se obtuvo mayor cantidad y mejor calidad que los dos anteriores (Figura 9, carriles 7-9). En FAX 20 en el entierro I el ADN fue <23.1 Kb y la misma cantidad que el entierro; en cambio en los entierros II y III de >23.1 Kb (figura 9, carriles 10-12). Es decir, se obtiene material genético de alto y bajo peso molecular que depende más del entorno que de la antigüedad, como también se ha reportado para material óseo fechado con 7,500 años (Hagelberg et al., 1989).

Estos resultados sugieren que el tiempo no es un factor determinante para la obtención de ADN de alto peso molecular, sino que es necesario tomar en cuenta otros factores.

En algunos casos el patrón de ADN durante la electroforesis en el gel de agarosa del material óseo no fue visible debido a que la muestra estaba muy diluida (figuras 6-8), por lo que fue necesario concentrar por medio de precipitación con etanol. Después de la concentración fue posible observar el patrón característico del ADN (Figura 4).

Por otro lado la cantidad de material genético que se recupera de las diferentes piezas óseas (costilla, cadera, falange, hueso largo, vértebra) así como de esqueletos de infantes, adolescentes, adultos medios o adultos

2 4 6 8 10 12 14

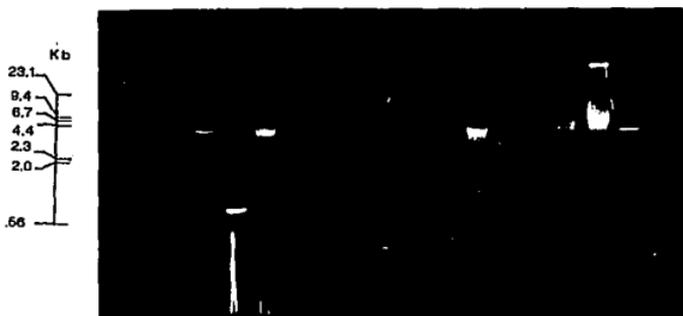


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % para ADN de restos óseos prehispanicos y coloniales (Cuadro 3).

Carril(es)	Muestra
2 y 15	Marcador HindIII
3	PBR322 HinfI
4	Colonial (Villa Rica)
5	Prehispanico (Manatí, Ver.)
6	Prehispanico (Yautepec, Mor.)
7	Prehispanico (Xochicalco, Mor.)
8-10	Prehispanico (Xochimilco, D.F.)
	PAX 9 ent. 1-3
11-13	Prehispanico (Xochimilco D.F.)
	PAX 20 ent. I-III
14	Actual (Sangre)

avanzados, fue variable aun cuando se coloque el mismo volumen de ADN (figuras 3-9). Sin embargo, al cuantificarlo por los métodos descritos en material y métodos se obtienen cantidades semejantes a las descritas en el cuadro 5.

En la figura 10, se muestra la cantidad obtenida del mismo ejemplar y distintas piezas. La mayor fue de costilla y cadera (carriles A y B); en cambio fue menor en vértebra, fémur y tibia (carriles C, D, y E).

Estos resultados indican que es posible obtener ADN de cualquier pieza ósea, de diferente edad, sexo y antigüedad, así como de diferentes zonas geográficas (Figuras 3-10).

c) Tratamiento con Desoxiribonucleasa (DNAasa) y Ribonucleasa (RNAasa).

Una de las formas más directas de demostrar la presencia de ADN es su sensibilidad a la DNAasa y su resistencia a la RNAasa. En la figura 11, se observa el efecto de la DNAasa sobre el ADN humano actual (carril 5) y ADN de costilla y cadera (carriles 6 y 7); la sensibilidad manifestada demuestra que el material es ADN; además, la resistencia a la RNAasa se hizo patente en la zona donde se identifica al ADN (figura 12, carriles 6 y 7), pero donde se localiza al ARN se puede observar su sensibilidad a dicha enzima (figura 12, carriles 2 y 3). Este resultado, aunado a la determinación de ARN por el método de Orcinol (como se describe en material y métodos) demuestra la presencia de ARN en restos óseos humanos.

1 2 3 4 5 6 7

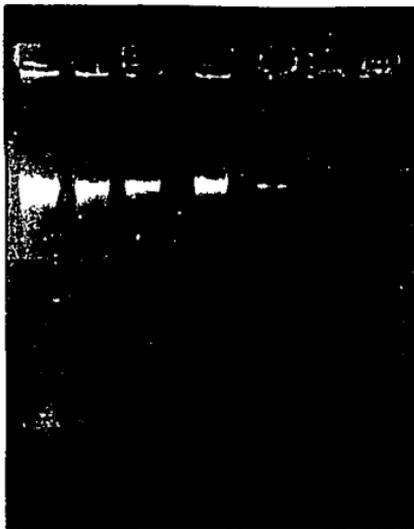


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para ADN prehispánico de diferentes piezas óseas del entierro No.1 del Peñón del Marqués.

Carril(es)	Pieza Osea
1	costilla
2	cadera
3	vértebra
4	fémur
5	tibia



Figura 11. Efecto de DNAasa sobre el ADN de material óseo prehispánico. A 10 ug del ADN de costilla y cadera tratado con RNAasa durante la purificación como se describe en material y métodos, se digiere con DNAasa. En ausencia de DNAasa: ADN de timo de ternera, Carril 1; ADN de costilla, carril 2; ADN de cadera, carril 3. En presencia de DNAasa : ADN de timo de ternera, carril 5; ADN de costilla, carril 6 y ADN de cadera, carril 7.

1 2 3 4 5 6 7

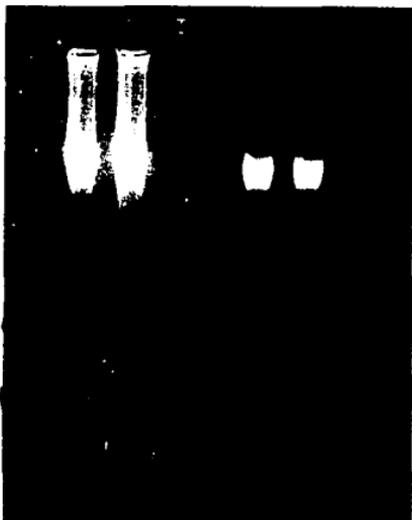


Figura 12. Tratamiento con RNAasa. El ADN de material óseo prehispanico de costilla y cadera, se digiere con RNAasa como se describe en material y métodos. En ausencia de RNAasa : ADN de costilla, carril 2; ADN de cadera, carril 3. En presencia de RNAasa: ADN de costilla, carril 5; ADN de cadera, carril 6.

De todos estos resultados se infiere que el material aislado de restos óseos humanos prehispánicos es ADN y ARN.

2. Demostración de su Origen Humano.

El siguiente paso fué la demostración de que las preparaciones de ADN y ARN tienen un origen humano. Para el primero, las pruebas se basan en los datos obtenidos al emplear la técnica de hibridación tipo Southern (1975) con los genes humanos de la β -globina (H β 1) y del factor de elongación α (HEF-1 α).

a) Hibridación con H β 1

El ADN de alto peso molecular obtenido del material óseo de la iglesia de la Soledad (costilla), Azcapotzalco (falange y costilla) y Peñón del Marquez (costilla) con una antigüedad de 400, 500 y 650 años respectivamente, se digiere con EcoRI y se hibrida con el gene humano de la β -globina como se describe en material y métodos. La autoradiografía de la hibridación se muestra en la figura 13, como consecuencia, algunos productos hibridaron con el gene humano. Las bandas de 9.4, 7.3, 5.6, 5.2, 4.9 y 4.0 Kb del ADN actual, corresponden con las bandas del tejido colonial y prehispánico (figura 13). Las bandas de menor peso molecular 1.7 y 1.35 Kb se presentan en la misma cantidad en el ADN actual, en el colonial y en un ejemplar prehispánico (figura 13, carriles 1-3); en cambio en los del sitio Coacuilco Azcapotzalco, la concentración es menor (figura 13,

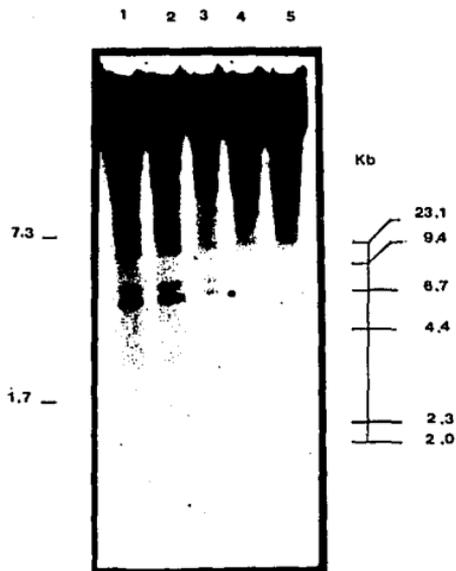


Figura 13. Hibridación Tipo Southern de ADN contemporáneo (células de fibroblastos humanos, BAZD) y ADN de restos óseos prehispánicos con una antigüedad de 300-750 años. El ADN se corta con la endonucleasa de restricción EcoRI, se transfiere y se hibrida con el gene humano de la β -globina.

Carril(es)	Muestra
1	ADN actual
2	ADN prehispánico
3	Peñón del Marqués
4	Tlateloco
5	Azcapotzalco E 10 E 11

carriles 4 y 5). El reconocimiento sugiere la presencia de ADN humano en el material óseo antiguo; además de que el patrón de reconocimiento es semejante.

Estos resultados sugieren que la antigüedad de estos especímenes no es factor determinante para el reconocimiento de secuencias humanas.

b) Hibridación con HEF-1c

Otro de los genes utilizados para identificar ADN humano de tejido óseo antiguo, fue el factor de elongación 1 α (EF-1 α).

En la figura 14, se muestra la hibridación tipo Southern de ADN de 16 de los 32 esqueletos seleccionados al azar provenientes de la zona arqueológica de Tula, Hgo. de los sitios Malinche, Zapata II y Charnay (Área del Museo) con una antigüedad de 800-1,100 años, comparado con ADN actual (línea de fibroblastos humanos, BAZD). El material genético se digiere con EcoRI y se hibrida como se explica en material y métodos.

Los resultados muestran que diez fragmentos se encuentran en forma invariable en el ADN actual y ADN prehispánico de todos los individuos examinados. Sin embargo, los fragmentos de 19 Kb están presentes únicamente en los individuos prehispánicos; los de 3.7 en 6 individuos prehispánicos y los de 2 Kb en ambos. Es decir, las secuencias de este gene son también reconocidas por ADN proveniente del material óseo antiguo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

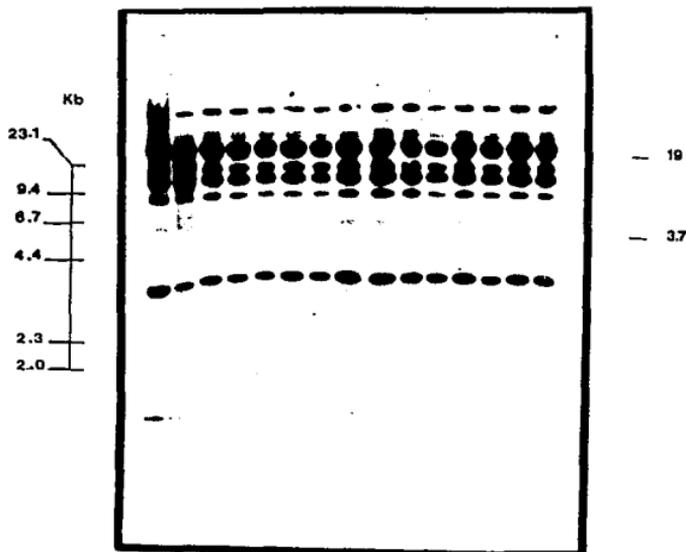


Figura 14. Hibridación Tipo Southern de ADN contemporáneo (fibroblastos humanos, BAZD) y Prehispánico (material óseo de Tula Hgo.), con una antigüedad de 800-1,110 años, con el gene humano del factor de elongación α (HEF1- α). El ADN de alto peso molecular obtenido como se describe en material y métodos se digiere con EcoRI, se transfiere y se hibrida con HEF1- α .

Carril(es)	Muestra
1	ADN contemporáneo
2-15	ADN prehispánico
16	Marcador

A la fecha, sólo ha sido posible identificar a otros genes nucleares en esqueletos humanos antiguos por medio de la amplificación con PCR entre los que se encuentran: el de la fibrosis quística (Turbon, citado por Sykes, 1991), una secuencia del cromosoma Y (Hummel y Herrman. 1991), del exón de la fenilhidroxilasa y fragmentos específicos derivados de los cromosomas X y 12 (Meijer et al., 1992).

Estos resultados manifiestan que el ADN de restos prehispánicos y coloniales reconocen genes humanos, presentando patrones semejantes con el ADN actual.

3. Identificación de individuos por ADN ("huellas digitales de ADN").

Las sondas p g3, MS1, MS31, MS32, MS8 y MS43, han sido utilizadas para estudios de " huellas digitales " de ADN. relaciones de parentesco en individuos actuales y estudios forenses (Wong et al., 1987). De ahí, el interés por usar estas sondas en la identificación de individuos prehispánicos y coloniales con el objeto de realizar estudios de parentesco y de migraciones en las poblaciones mexicanas pretéritas. Es necesario resaltar que para realizar este tipo de estudios se requiere de ADN de alto peso molecular (Gill et al., 1985), de ahí la importancia de obtener material genético de alto peso molecular.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

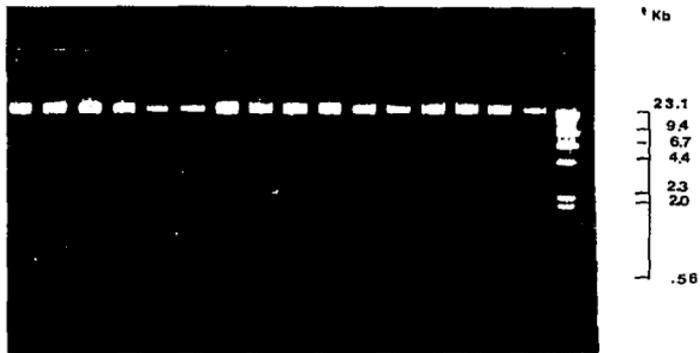


Figura 15. Electorforesis en agarosa al 0.8 % de ADN de alto peso molecular de restos óseos prehispánicos. El ADN de alto peso molecular se obtienen como se describe en material y métodos . Muestras de ADN de esqueletos de Tula, Hgo., Tlateloco y Xochimilco.

El ADN de alto peso molecular (figura 15) de las muestras óseas provenientes de la Villa Rica, Manatí y Xochimilco, se corta con la enzima *HinfI*, se aplica a una electroforesis, se transfiere y se hibrida con la sonda MS1 como se describe en material y métodos.

En la figura 16, se muestran los resultados de la hibridación con la sonda MS1 de individuos prehispánicos de Veracruz, Morelos y Xochimilco (carriles 3 a 13) comparados con dos individuos actuales (carriles 2 y 14). Las bandas representativas del ADN de los individuos actuales son de 9.3 y 6.2 Kb (carril 2) y 5.0 y 1.98 Kb (carril 14) respectivamente. En todos los individuos prehispánicos y coloniales, se encuentran bandas de 1.7 Kb y otras de aproximadamente 0.8 y .56 Kb cuyo significado se desconoce. Estas bandas de bajo peso molecular se han reportado también, en individuos caucásicos actuales; aunque tampoco han sido caracterizadas (Wong et al., 1987).

Un hecho que es importante, es el caso de los individuos de los entierros II y III de PAX 20 presentan el mismo patrón en las bandas de 6.2 y 4.4 Kb (Figura 16, carriles 8 y 9) que podría sugerir alguna relación genética entre estos dos individuos, como los patrones que se han descrito para poblaciones actuales cuando se usan las mismas sondas (Wong et al., 1987).

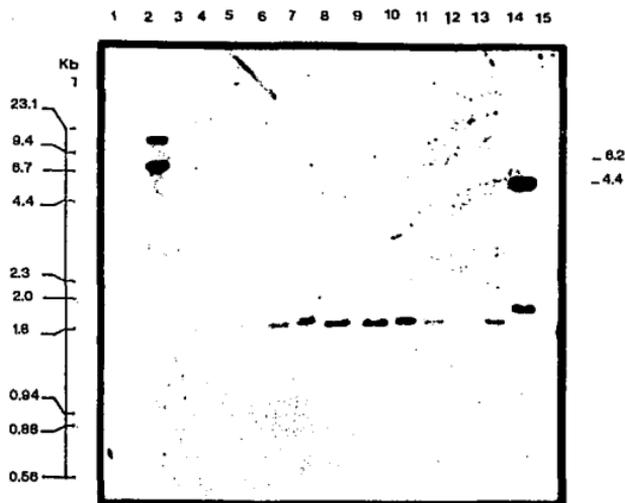


Figura 16. Hibridación Tipo Southern de ADN Contemporáneo y ADN Prehispánico de con la sonda monolocus MS1. El ADN de alto peso molecular obtenido como se describe en material y métodos, se digiere con *Hinf*I, se transfiere e hibrida con la sonda MS1.

Carril(es)	Muestra
1 y 15	Marcador Lambda HindIII
2 y 14	ADN Contemporáneo
	Colonial
3	Villa Rica
	Prehispánico
4	Xochimilco 1-9
5	2-9
6	3-9
7	I-20
8	II-20
9	III-20
10,11 y 13	Manatí, Veracruz

Por lo que respecta al ARN, sólo se identificó al ARN de transferencia (ARNt).

Las funciones del ARNt son: su capacidad para aminoacilarse, formar el complejo ternario de iniciación y de elongación, la unión de estos complejos a ribosomas y el reconocimiento de secuencias específicas en el ARN mensajero (ARNm), durante los procesos de iniciación, elongación y terminación de la síntesis de polipéptidos (Moldave, 1985)

Las células de eucariontes contienen en el citoplasma dos especies de ARNmeti y ARNmetmet. El primero, es utilizado exclusivamente para la iniciación de la síntesis de proteínas; en cambio, el segundo introduce residuos de metionina durante el crecimiento de la cadena polipeptídica (Kozak, 1983).

El proceso de iniciación involucra además del ARNmeti, GTP, ATP, por lo menos 10 factores de iniciación (eIFs), RNAm y subunidades de ribosomas para formar el complejo de iniciación 80S (Moldave, 1985).

La iniciación de la síntesis de proteínas en sistemas de eucariontes *in vitro* presenta cuatro mecanismos básicos: 1) La formación del complejo ternario eIF2-GTP-met-ARNti; 2) la transferencia del complejo ternario a la subunidad 40S; 3) la unión del ARNm al complejo 40S (complejo de preiniciación) y 4) la unión del complejo de preiniciación a la subunidad 60S para formar el complejo de iniciación 80S (Maitra et al., 1982)

4. Purificación de ARNT

Los resultados de la purificación del ARNT de placenta humana, cerebro de rata y material óseo antiguo se muestran en el cuadro 6. Se observan las relaciones 260/230 y 260/290 nm que muestran el grado de pureza con respecto a proteína y la recuperación expresada en $\mu\text{g/g}$ de tejido. Los valores están cercanos o dentro de los valores reportados que son de 2.5, lo que indica que el ARNT de tejidos frescos (placenta y cerebro de rata) y del tejido óseo antiguo está puro con respecto a proteína.

La recuperación del ARNTi del tejido óseo de 500-1100 años de antigüedad es semejante, oscila entre 66 a 86 $\mu\text{g/g}$ de tejido. Esta cantidad representa del 48 al 62 % del ARN total (cuadro 5). Sin embargo, con respecto al ARNT de tejido fresco la recuperación es de 4.5 a 6 veces menos (cuadro 6).

5. Formación de Met-ARNTi

Se examinaron las capacidades funcionales de los ARNT iniciadores de tejido fresco y antiguo. El primero representado por placenta humana y el segundo proveniente de material óseo antiguo de diversas zonas de la Cuenca de México y de la zona arqueológica de Tula, Hgo. con una antigüedad estimada entre 500 a 1100 años. En el cuadro 7, se observa la capacidad para formar al met-ARNTi cuando se utilizan las aminonoacil-ARNT sintetizadas de *E. coli* y los APNT de placenta humana, de cerebro de rata y de tejido óseo antiguo.

CUADRO 6

PURIFICACION DE ARNT DE TEJIDO FRESCO Y ANTIGUO

ORIGEN	260/230	260/280	RECUPERACION (ug/g tejido)
Cerebro de rata	2.30	2.00	400
Placenta humana	2.45	2.30	380
Coachilco	2.30	1.92	80
Tlatelolco	1.94	1.82	66
Peñón de Marquez	2.20	2.00	68
Lapata II	2.30	1.26	35
Malinche	2.10	1.98	86

Met-ARNTi de tejido fresco y antiguo después de la columna de DEAE-celulosa.

Las muestras de ARNT purificado de los diferentes tejidos: cerebro de rata, placenta y material óseo humano reaccionaron con las aminoacil-ARNT sintetasas de *E. coli* para formar el Met-ARNTi (cuadro 7, figura 17).

Los resultados indican que la reacción de aminoacilación se lleva cabo en todos los ARNT provenientes de tejido fresco y tejido antiguo. Sin embargo, la reacción de aminoacilación en el material óseo es 30% menos con respecto a la del tejido fresco (cuadro 8).

Para determinar si este porcentaje no es debido a un reconocimiento inespecífico, los ARNTi de tejido fresco y antiguo se trataron con Ribonucleasa (como se describe en material métodos) previo a la reacción de aminoacilación. Los resultados muestran que la RNAasa tiene un efecto inhibitorio significativo durante la reacción de aminoacilación del ARNT iniciador en ambos tejidos. El efecto inhibitorio es mayor en el tejido fresco (cuadro 7).

Por otro lado, el ARNT del tejido fresco es un 25-40 % más sensible a la ARNasa que del ARNT obtenido de restos óseos prehispánicos (cuadro 7).

Los productos de la reacción de aminoacilación fueron aplicados a una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5 %. En la figura 17 se observan los Met-ARNTi de tejido fresco: cerebro de rata, placenta humana purificados como se describe en material y métodos y de germen de trigo (donado por la Dra. Ruth Román de la Facultad de Química), comparados con el producto de la reacción de aminoacilación de los Met-ARNTi provenientes de material óseo antiguo de 500

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 %. Met-ARNti de tejido fresco y antiguo, después de la reacción de aminoacilación, se aplica a una electroforesis en TBE 1X por 4 h y se tiñe con bromuro de etidio.

Carril(es)	Muestra
2	Met-ARNti de tejido fresco
3	germen de trigo
4	cerebro de rata
4	placenta humana
6	Met-ARNti de restos óseos
7	Peñón del Marquez
7	Tlateloco
8	Tula, Hgo.
9	Tula, Hgo.

CUADRO 7

FORMACION DE MET-ARNti

TEJIDO	[S]-MET-ARNti (pmolas)	ANTIGUEDAD (años)
FRESCO		
Cerebro de Rata	2.48 ± 0.30	
Cerebro de Rata + RNAasa	0.011 ± 0.0014	
Placenta Humana	2.21 ± 0.148	
Placenta Humana + RNAasa	0.0086 ± 0.0005	
OSEO ANTIGUO		
Malinche	0.095 ± 0.049	1,000-1,100
Malinche + RNAasa	0.0085 ± 0.0007	
Lapata III	0.711 ± 0.03	800-1,100
Lapata II + RNAasa	0.0089 ± 0.0003	
Peñón del Marquez	0.7235 ± 0.07	650-750
Peñón del Marquez + RNAasa	0.0125 ± 0.002	
Tlatelolco	0.2955 ± 0.051	500-600
Tlatelolco + RNAasa	0.011 ± 0.002	
Coachilco	0.5985 ± 0.049	500-600
Coachilco + RNAasa	0.012 ± 0.0004	

CUADRO 9

FORMACION DE MET-ARNT:

TEJIDO	[S]-MET-ARNTi (pmolas) X	[S]-MET-ARNTi (pmolas) %
Fresco	2.4133 ± 0.090	100
Oseo Antiguo	0.8550 ± 0.020	34.24

a 1,100 años de antigüedad. Los resultados indican que la reacción de aminoacilación se lleva a cabo en los ARNT tanto de tejido fresco como de tejido antiguo.

Los resultados sugieren que factores como la antigüedad o las diferentes condiciones de enterramiento a las que estuvieron sujetos los restos óseos, parecen no ser determinantes para la formación del met-ARNT iniciador en condiciones *in vitro*, debido a que los ARNTs provenientes de esqueletos prehispánicos presentan capacidad para llevar a cabo la reacción de aminoacilación (cuadro 7, figura 17).

6. Formación del Complejo Ternario

El siguiente objetivo fue probar la capacidad del ARNTi de placenta y de tejido óseo antiguo para formar el complejo ternario GTP-eIF2-met-ARNTi.

Se optimizaron las condiciones para la formación del complejo ternario con los factores de iniciación (las proteínas del lavado ribosómico) de placenta y el met-ARNTf de *E. coli* y el met-ARNTi de placenta y de tejido óseo antiguo.

Las variables que se estudiaron fueron: tiempo, concentraciones de magnesio, de GTP y de [35S]-Met-ARNTi (figura 18).

La reacción de formación del complejo ternario en ambos tejidos fue semejante. La reacción se estabiliza a los 10 min de incubación a 37°C (Figura

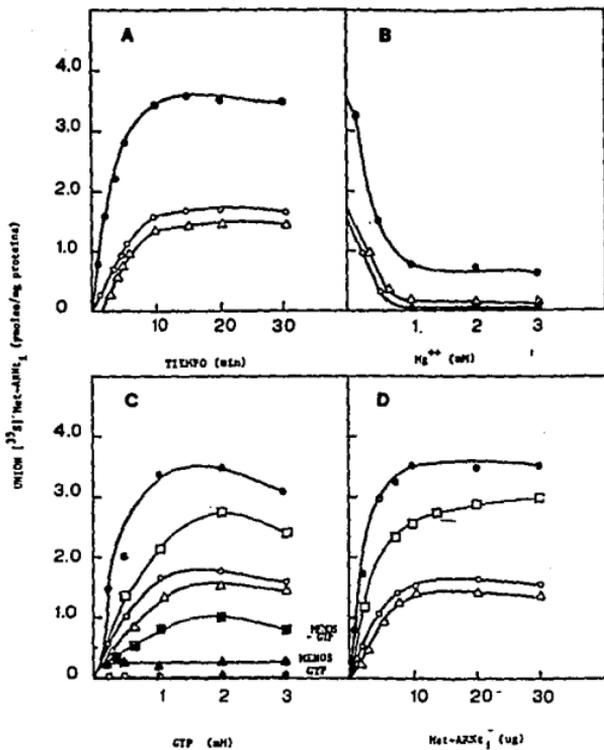


Figura 18. Formación del complejo ternario de iniciación de síntesis de proteínas. La reacción se hizo como se describe en material y métodos. Factores de iniciación de placentas humana. Met-ARN_t de *E. coli* (Sigma Chem. Co.) (□) y Met-ARN_t de placenta humana (●) y de restos óseos humanos (○, △).

18 A), se inhibe a bajas concentraciones de Mg^{++} (figura 18 B), muestra un actividad máxima entre 1-2 mM de GTP, en tanto que la reacción independiente de GTP representa menos del 3 % de la actividad (figura 18 C). La reacción también es dependiente de la concentración del met-ARNi (figura 18 D). Sin embargo, la actividad del ARNti es 2.3 veces mayor en el tejido fresco.

Por otra parte, el comportamiento del Met-ARNti de *E. coli* es diferente al del Met-ARNti de placenta humana y de material óseo, con respecto a GTP y a la saturación con Met-ARNti (figuras 18C y 18D).

Estos resultados sugieren que los Met-ARNti de material óseo antiguo son de origen euariótico.

7. Unión del Met-ARNti a los Ribosomas

Con el objeto de estudiar la actividad del complejo ternario Met-ARNti-pIF2-GTP proveniente restos óseos humanos, se establecieron las condiciones para la formación del complejo de iniciación en tejido fresco y antiguo.

En el cuadro 9 los resultados de la unión del complejo ternario Met-ARNti-pIF2-GTP a los ribosomas en presencia de AUG, indican en ambos tejidos la dependencia de cada uno de los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción de unión del complejo ternario a los ribosomas como son: Los ribosomas, el GTP, el codón de iniciación AUG y los factores de iniciación.

CUADRO 9

REQUERIMIENTOS PARA LA UNION DE MET-ARNti A LOS RIBOSOMAS .

ENSAYO	UNION DE [S]-MET-ARNti (pmolas/mg proteína)
A. Met-ARNti (Placenta)	
Completo	3.42
-AUG	0.19
-GTP	0.1044
-Factores de iniciación	0.20
-Ribosomas	0.18
B. Met-ARNti (Restos Cseos)	
Completo	1.52
-AUG	0.09
-GTP	0.37
-Factores de iniciación	0.087
-Ribosomas	0.296

Estos resultados indican la posibilidad de que el Met- ARNti de restos óseos antiguos sea de origen humano, debido a que el factor de iniciación 2 de placenta (pIF-2) forma el complejo ternario y éste reconoce a los ribosomas de placenta para formar al complejo de iniciación en presencia de AUG. Sería interesante estudiar a los otros factores de iniciación involucrados en la síntesis de proteínas de eucariontes en presencia de mensajeros endógenos y exógenos, así como la actividad de los factores de elongación EF-1 y EF-2. Del primero se tiene el reconocimiento a nivel génico con una de las tres subunidades de EF-1, la correspondiente a la subunidad α (figura 14).

Por lo tanto, no es sólo posible aislar ARNt, sino que la molécula puede preservar funciones tales como: reconocimiento de dos diferentes enzimas; las aminoacil-ARNt sintetetasas y factores de iniciación (pIF-2), reconocer a los ribosomas y al codón de iniciación, como lo indican las reacciones probadas en este trabajo : aminoacilación, formación del complejo ternario y la unión de este complejo a los ribosomas para constituir el complejo de iniciación de síntesis de proteínas, no obstante la antigüedad y condiciones ecológicas a las que estuvo sujeto el material óseo estudiado.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Observaciones histológicas

El examen histológico demuestra que en el tejido óseo prehispánico con una antigüedad de 650 a 750 años se conserva material celular; incluyendo algunos osteocitos y restos de epitelio de vasos sanguíneos (figura 1). Asimismo, se observan núcleos, cuya nitidez fue mayor al emplear una tinción específica para ácidos nucleicos; en contraste con la resolución obtenida con la tinción de hematoxilina-eosina (resultados no mostrados). Este hecho es indicativo de la presencia de ácidos nucleicos como también ha sido identificado en otros tejidos humanos antiguos (Pääbo, 1985b; 1986; Doran *et al.*, 1986).

Otros autores (Romano *et al.*, 1976) han descrito en material óseo de 500 años de antigüedad, la presencia de células sanguíneas en diversas fases de diferenciación y neutrófilos.

Estos resultados indican que en las diferentes condiciones ecológicas de enterramiento de los esqueletos de este estudio, algunas células y sus componentes pueden ser preservados

Observaciones bioquímicas y de biología molecular.

1. Aislamiento y caracterización de ácidos nucleicos.

Los resultados de la extracción de ácidos nucleicos en los diversos especímenes mostraron semejanzas en la pureza y recuperación. El primero tiene como base la relación de las lecturas a 260/280 nm, es de 1.7 a 2.0 (cuadro 5). El segundo, la cantidad de ácidos nucleicos totales es de 123 a 196 $\mu\text{g/g}$ de tejido. Sin embargo, únicamente 9 $\mu\text{g/g}$ de tejido corresponden a ADN y el resto a ARN. (cuadro 5). La cuantía de ADN es semejante cuando se compara con la obtenida en tejido momificado (Pääbo, 1985a; Pääbo, 1986) y con la de restos de animales (Johnson et al., 1986). Inclusive si la purificación se realiza en presencia de RNAasa, la recuperación del ADN es de 9 $\mu\text{g/g}$ de tejido. Esto significa que el rendimiento del ADN en restos óseos se encuentra dentro de los valores obtenidos en otros tejidos antiguos.

a) Espectro de absorción en ultravioleta.

La presencia de un colorante café amarillento que coprecipita con los ácidos nucleicos modifica al espectro de ultravioleta de los mismos (Figura 2 curva B). La cromatografía en Sephadex G-10 elimina el pigmento, aunque se pierde aproximadamente un 25 % del material genético. De manera semejante, si la muestra se dializa el pigmento se descarta de la preparación acompañada por una pérdida mayor de alrededor de un 50 % (resultados no mostrados). Sin embargo, el patrón después de tratamientos como: cromatografía en Sephadex G-10 ,

electroelución, recuperación en membranas de celulosa DEAE-81 y/o NA-45 y por el método de aislamiento de la sonda (como se describe en material y métodos), es 65 a 85% mayor. Es importante hacer notar que el ADN recuperado por todos estos métodos muestra un patrón que lo identifica con un espectro característico de ácidos nucleicos (figura 2 curvas C, D, y E).

Por otra parte, este pigmento no sólo se encuentra en restos óseos, ya que también ha sido observado en otros tejidos antiguos (Doran et al., 1986; Pääbo, 1986). Pääbo (1986) sugiere que corresponde a reactivos de Maillard. Sin embargo, en los restos prehispánicos no fueron identificados (estos resultados no se muestran). Además, durante la electroforesis en agarosa al 1 %, el colorante migra frente al azul de bromofenol, lo que también indica que no se trata de reactivos de Maillard.

Las causas de la variación de este pigmento son desconocidas, se podría plantear alguna relación con las características del tipo de suelo, tiempo y tipo de enterramiento y otros factores físico-químicos (Vargas y Sánchez, 1990). Estudios en este sentido se están desarrollando .

Si bien no ha sido caracterizado químicamente, su presencia es independiente de la forma de conservación a la que los diferentes restos han estado sujetos (Johnson et al., 1985; Doran et al., 1986; Pääbo, 1989a; Vargas y Sánchez, 1990).

Actualmente se tienen los primeros intentos de aislamiento del pigmento. En forma simultánea se aísla el ADN de alto peso molecular y el pigmento durante la electroforesis con DE-81 o con NA-45 y como el pigmento corre al frente del azul de bromofenol es el primero en obtenerse. Quedan por realizarse los estudios de identificación del pigmento.

b) Electroforesis en geles de agarosa.

El ADN obtenido de material óseo prehispánico manifiesta un peso molecular que se localiza entre 0.125 a >23.1 Kb (figuras 3-10, 15) a diferencia del obtenido en otros restos cuyo límite se encuentra entre 0.5 y 12 Kb, aún cuando hayan sido preservados bajo condiciones de anaerobiosis extrema u otras condiciones ambientales (Doran *et al.*, 1986 ; Thuesen y Engberg, 1990; Hagelberg *et al.*, 1991a; Hagelberg *et al.*, 1991b; Meijer *et al.*, 1992).

El ADN de bajo peso molecular parece ser común en la mayoría de los restos óseos humanos (Pääbo, 1986; Thuesen y Engberg, 1990; Hagelberg *et al.*, 1989; Meijer *et al.*, 1991; Meijer *et al.*, 1992). Se desconoce la causa de esta degradación que podría atribuirse a procesos como el efecto de la radiactividad ambiental, procesos autolíticos *post-mortem* oxidación de azúcares y de componentes macromoleculares (Pääbo, 1986; Rogan y Salvo, 1990). Otro punto a considerar es la modificación de las bases nitrogenadas, ejemplo de esto último son las alteraciones de las pirimidinas en tejidos momificado (Pääbo, 1989a). Este último dato es consistente con el hecho de que el efecto oxidativo sobre las pirimidinas es mayor que en las purinas (Sholer *et al.*, 1960).

Sin embargo los resultados de este trabajo muestran ADN de alto peso molecular de los diversos esqueletos estudiados. Estos datos no están exclusivamente relacionados con las condiciones de entierro encontradas al momento de la excavación debido a que éste se ha visto sujeto a múltiples modificaciones ambientales desde su inhumación hasta el momento de su exhumación. En este sentido deben valorarse los siguientes aspectos: ubicación del entierro (zona habitacional, templo, entre otros), sistema de enterramiento (primario, secundario, presencia de ofrenda) .

También deben considerarse diversos factores: 1) Físicos: desplazamiento del terreno, usos del suelo, filtraciones, humedad, temperatura, clima, entre otros; 2) Químicos: pH, potencial de óxido-reducción, sales orgánicas e inorgánicas del suelo. Ejemplo de esto son los efectos de radiación sobre ácidos nucleicos bajo diferentes condiciones tales como: radiaciones en soluciones oxigenadas o en soluciones anóxicas (Hutchinson, 1985)

La mayor dificultad en los estudios de radiación ionizante sobre el ADN es la gran cantidad de productos que se forman. Se han identificado 24 diferentes productos para timidina radiada en soluciones oxigenadas y otros productos no identificados. Otros grupos son los que se encuentran en condiciones anóxicas y cuando es directamente radiado . Para la citosina, la desoxiribosa y posiblemente para las purinas se obtienen resultados semejantes. Así, existen cientos de productos inducidos por la radiación del ADN. Una segunda dificultad es que los productos iniciales son inestables, convirtiéndolos en otros productos en periodos de horas o días. Afortunadamente el número de estos

productos es extremadamente bajo. La acción de las radiaciones es indiscriminada. Los efectos de la radiación sobre moléculas particulares como el ADN son la suma de procesos de acción directa, lo que significa que los efectos de la energía se deposita directamente en la molécula y por acción indirecta, donde el efecto de las especies reactivas, formadas en el entorno, se difunden a la molécula y reaccionan con ella (Hutchinson, 1985).

El efecto de la radiación en soluciones acuosas de ADN son los causados por los productos que se forman por la acción de la radiación ionizante en el agua: el radical $-OH$, el electrón hidratado e^- ac., el átomo de H, agua oxigenada y el hidrógeno. El radical de mayor importancia es el $-OH$ en soluciones oxigenadas; éste, reacciona principalmente con las moléculas orgánicas ya sea por adición o extracción de H en una unión C-H para formar agua y un radical carbonilo. En soluciones anóxicas, el H también puede adicionarse a dobles enlaces o extraer H de uniones C-H. El electrón hidratado reacciona con las bases pero no con los azúcares (Hutchinson, 1985).

La radiación en soluciones diluidas de ADN induce rompimientos en las cadenas de doble hélice. El ADN radiado a $0^{\circ}C$ muestra una pequeña disminución en el número de rompimientos después de varios días de almacenamiento a bajas temperaturas y pH neutro, esto se ha determinado con ADN cadena sencilla y doble cadena superenrollada. La incubación a pH neutro y aumento a $37^{\circ}C$, incrementa en número de rompimiento observándose una vida media de de 30 min (Hutchinson, 1985).

Si el ADN se trata con una solución alcalina, el rompimiento se incrementa por dos veces con respecto al observado en condiciones neutras. La hidrólisis en NaOH 0.1M en sitios lábiles inducidos por la radiación es muy rápido, con una vida media menor a los 5 min para ADN cadena sencilla, menos de 2 min para cadena doble y círculos supererrollados (Hutchinson, 1985). Se puede establecer que los rompimientos del ADN con tratamientos alcalinos son causadas principalmente en los azúcares (Hutchinson, 1985). Esto indica que este tipo de factores pueden alterar la integridad de las moléculas preservadas en los diferentes restos no sólo humanos, sino de plantas y animales, por lo que es de suma importancia considerar el entorno de los mismos.

Por último, es necesario considerar los factores biológicos que afectan al ADN de restos antiguos : microorganismos, hongos, plantas y animales que influyen durante la diagénesis del cuerpo al esqueleto y de éste hasta nuestro análisis. Asimismo, las enfermedades carenciales que en vida hubiera sufrido el individuo con sus afecciones al tejido óseo, que pueden repercutir en la conservación del tejido óseo.

Por esto, una explicación tan general como "condiciones ambientales" en el contexto arqueológico del entierro, resulta difícil de conciliar cuando se encuentran datos donde los entierros de una misma antigüedad y condiciones ambientales iguales, no proporcionan los mismos valores en la purificación de los ácidos nucleicos (figuras 1-9).

No obstante, en este trabajo ha sido posible purificar ADN de alto peso molecular de restos óseos humanos con una antigüedad de 500 a 1100 años (figura 15). Resultados semejantes se han obtenido sólo con muestras de gotas de sangre y semen de por lo menos cuatro años (Gill et al., 1985).

Los estudios de polimorfismos de ADN en poblaciones humanas actuales y la identificación de individuos por ADN (Gill et al., 1985) requieren de material genético de alto peso molecular. De ahí la importancia de obtener ADN de alto peso molecular en poblaciones prehispanicas mexicanas. Este logro permite estudios de identificación de polimorfismos con genes como los del factor de elongación 1a (figura 14). Este resultado significa el primer polimorfismo de ADN detectado en restos óseos humanos. Así, se abre la perspectiva de estudiar variabilidad genética en una población mexicana del pasado.

Quedan por identificarse otros polimorfismos para este gene como el observado en una población caucásica contemporánea (Opendakker et al., 1987)

Asimismo, con el ADN de alto peso molecular es posible detectar otros genes, FPLV y regiones hipervariables como los minisatélites. Las sondas derivadas de regiones hipervariables y en serie, permiten detectar un gran número de *loci* minisatélites no sólo en individuos y poblaciones actuales (Jeffreys et al., 1985a; 1985b; 1985c; Gill et al., 1985; Wong et al., 1987) sino en individuos prehispanicos como los reportados en este trabajo (figura 16).

Esto significa que con la obtención de ADN de alto peso molecular de esqueletos antiguos, es posible detectar polimorfismos y usar herramientas tan poderosas como son las sondas de minisatélites para estudios de identificación de individuos por ADN, relaciones de parentesco, variabilidad genética y emigraciones e inmigraciones de las poblaciones preteritas mesoamericanas y realizar a futuro relaciones con algunos grupos étnicos actuales.

La prueba más directa de la presencia de ADN en las muestras es su sensibilidad a la DNAasa, esto se muestra claramente en la figura 11.

Por otro lado, es posible aislar ADN de material óseo diverso (costilla, cadera, huesos largos, vértebra) , de ambos sexos, de diferente edad (1a. infancia, 2a. infancia, adolescente, adulto medio y adulto avanzado), con distinta antigüedad y de zonas con propiedades geográficas diversas (figuras 3-10). Esto es importante, porque en algunas excavaciones se pueden encontrar individuos incompletos, lo que dificulta la aplicación de los métodos antropométricos clásicos para la identificación del (los) individuo(s); en cambio, con el ADN aislado de cualquier pieza ósea, es posible realizar estudios moleculares y aplicarlos a contextos arqueológicos y antropológicos.

2. Demostración de su origen humano

La hibridación del ADN de tejido óseo antiguo con los genes humanos de la β -globina y del factor de elongación 1 α (HEF-1 α) señalan su origen humano. En el caso de la digestión del ADN antiguo con EcoRI, la hibridación con β -globina muestra las mismas bandas que en el ADN actual, dos de ellas son características (7.3 y 1.5 Kb) (Huttner *et al.*, 1979). También las digestiones mostraron bandas mayores que representan las secuencias de ADN de alto peso molecular (figura 13).

Por otra parte, la hibridación con el gene HEF-1 α , muestran que diez de los fragmentos producidos por la digestión con EcoRI son invariables en el ADN de origen prehispánico y en el ADN contemporáneo. Sin embargo, existen algunas bandas que son representativas de toda la población prehispánica estudiada, las de 19 Kb; en cambio las de 3.7 Kb sólo se presentan en 7 de los 32 individuos estudiados con este gene (figura 14). Cabe hacer notar que este patrón se encuentra entre individuos que tienen una diferencia de 200 años de antigüedad; es decir, en ocho generaciones si se toma en cuenta 25 años de edad por generación. Este resultado significa el primer polimorfismo detectado en una población mexicana del pasado.

Paredes (1990), plantea que los individuos de esta población pertenecen a ocupaciones Tolteca, Tolteca-Azteca y Azteca por el contexto arqueológico en el que se encuentra el material óseo. El posible polimorfismo detectado en esta población podría ser una característica genética de la misma; esto podría tener

un significado importante desde el punto de vista de las migraciones toltecas. Esto significa que los estudios arqueológicos, lingüísticos e históricos se enriquecen con la aplicación de investigaciones a nivel de antropología molecular e incluso algunas de las hipótesis y teorías de migración planteadas por estas áreas, podrían ser apoyadas, eliminadas o bien originar nuevos planteamientos.

En este trabajo, los RFLPs (RFLPs) de 3.7 Kb de 7 de los 32 individuos estudiados provenientes de la zona arqueológica de Tula, Hgo. originarios de diferentes épocas podrían representar un posible polimorfismo del gene HEP-1a (figura 14) en las poblaciones prehispánicas mexicanas. Quedan por realizarse estudios en un mayor número de individuos y en diferentes poblaciones mesoamericanas; compararlas entre ellas y con poblaciones de grupos étnicos actuales.

También se han detectado polimorfismos para el gene del factor de elongación 1a de individuos de una población caucásica (Opdenakker *et al.*, 1987).

Hasta ahora los estudios sobre la estructura genética de la población mexicana actual tienen dos tipos de orientación: la primera fundamentalmente médica, como son los trabajos realizados sobre errores innatos del metabolismo o aberraciones cromosómicas, y la segunda, antropológica.

Durante los últimos 40 años se ha publicado numerosos trabajos en relación con la distribución de los grupos sanguíneos y otros factores hereditarios en grupos indígenas y no indígenas en México, así como los resultados de encuestas sobre errores innatos del metabolismo y otras enfermedades genéticas.

Entre los marcadores genéticos que se han estudiado en poblaciones mexicanas contemporáneas se encuentran: el sistema ABO, secretor y Lewis, MNs, P, Rh-Hr, Kill, Duffy, y algunas enzimas como G6-PD, GP-GD, fosfoglucomutasa, fosfatasa ácida, entre otras (Lisker, 1981). También se han estudiado proteínas como: Hb normal y anormal, inmunoglobulinas, haptoglobulinas, transferrinas, albúmina y pseudocolinesterasa, entre otras (Lisker, 1981).

Por otro lado, la utilización de marcadores del MHC ha permitido demostrar la restricción de variantes en tribus de América y en otras poblaciones aborígenes (Gorodetzky, 1988).

Con este trabajo, se abre la posibilidad de realizar estudios de antropología molecular no sólo en poblaciones mexicanas pretéritas, sino también en poblaciones actuales (indígenas y mestizas) y comparalas entre sí, para contestar algunas de las preguntas que se plantearon al inicio de este trabajo.

3. Identificación de individuos por ADN ("huellas digitales" de ADN).

Los resultados de la hibridación con la sonda MS1 (figura 16), muestran que los individuos actuales y dos de los once individuos prehispánicos estudiados, presentan patrones característicos. En cada individuo, las bandas son de diferente peso molecular. Sin embargo, el hecho de que las bandas de 9.3 y 5.0 Kb sean iguales en dos de los individuos prehispánicos estudiados, podrían indicar que tienen alguna relación de parentesco, debido a que la sonda puede detectar un locus grande, individual y variable. En este locus, se ha confirmado herencia Mendeliana al analizar la segregación en líneas de parentesco provistas por el programa CEPH (Wong et al., 1987).

Estos datos se ven reforzados por el contexto arqueológico en el que se encuentran estos dos individuos provenientes de los entierros II y III del Proyecto Arqueológico Xochimilco (PAX20), correspondientes a restos óseos de infantes de 6 a 8 y de 3 a 5 años de edad (Brito, 1992), localizados en lo que se conoce como unidad habitacional prehispánica (Manzanilla, 1986).

En este sentido, es necesario considerar el parentesco biológico y el parentesco cultural (Millones y Vargas, 1991). En este trabajo se propone la posibilidad de correlacionar el parentesco cultural, establecido en un contexto arqueológico, con el parentesco biológico determinado por los estudios de identificación de individuos por ADN.

4. ARNt en material óseo

Un aspecto de singular importancia es la presencia de ARN, que hasta la fecha no ha sido reportado en restos óseos humanos. La cantidad total de ARN que se recupera es de 138-181 µg/g (cuadro 5), de la cual del 44-48% corresponde al ARN de transferencia (cuadro 6), pero con respecto a ARNt de tejido fresco es del 17 al 20.5% .

Otros autores, han descrito la presencia de ARN ribosómico en semillas de maíz (Venanzi y Rollo, 1990; Rollo et al, 1991), en diversas plantas y en momias (Rogan y Salvo, 1990) de varios cientos a miles de años de antigüedad. En material óseo prehispánico no se identificó ADNt (estos resultados no se muestran). Sin embargo, fue posible identificar ARN de transferencia y de éstos al iniciador para la síntesis de proteínas (figura 17).

Por otra parte, el hecho de que el ARNt proveniente de restos óseos humanos presente capacidad funcional para formar: el Met-ARNt (cuadro 7), el complejo ternario de iniciación (figura 16) y que éste pueda unirse a los ribosomas y al codón de iniciación para constituir el complejo de iniciación para síntesis de proteínas (cuadro 9), revela la presencia de una estructura tridimensional del ARNt que permite interactuar con las enzimas correspondientes en cada una de las reacciones probadas. Esta estructura podría estabilizarse por cationes (Rich et al., 1979) presentes en la matriz del suelo en donde se encontraron los esqueletos.

Se ha postulado que las hipermodificaciones de bases y azúcar en ARNT actual no modifican las propiedades biológicas (Ryzard, 1985). Esto permite que cada una de las reacciones en las que se encuentra involucrado el ARNT persistan, aún cuando el tiempo y los diversos factores físicos, químicos y biológicos a los que estuvo sujeto el material óseo hayan sido diferentes.

El efecto de la RNAasa sobre los ARNT de tejido fresco y de tejido antiguo es distinto, el primero es 2.8 veces más sensible (cuadro 8), esto podría explicarse por algunas de las modificaciones que pueden sufrir las bases nitrogenadas y la ribosa en el ARNT de restos. Se han reportado alteraciones en algunos ARNT de células tumorales, pero no se incluye al Met-ARNTi (Nishimura, 1979). Por el momento, se desconoce la presencia de modificaciones como las reportadas en tejido momificado (Pääbo, 1989a). Sin embargo, aún cuando estuvieran presentes, el ARNTi de material óseo antiguo reacciona como sustrato de las aminoacil-ARNT sintetasa y del IF-2 y es capaz de unirse a los ribosomas.

Es necesario tomar en cuenta que parte de este ARNT pudiera ser de origen bacteriano ; sin embargo, al comparar el reconocimiento hacia los factores de iniciación y los ribosomas de placenta humana, el efecto inhibitor del Mg^{++} y la dependencia de GTP en la formación del complejo ternario con la placenta indican su origen humano; comportamiento diferente al del ARNT de origen bacteriano (figuras 18C y 18D).

Por lo tanto, no sólo es posible aislar ARNT, sino que la molécula puede preservar las funciones correspondientes al reconocimiento de dos enzimas

diferentes, las aminoacil-ARNt sintetetasas y al factor de iniciación 1, reconocer a los ribosomas y al codón de iniciación, como lo indican las reacciones probadas en este trabajo: aminoacilación, formación del complejo ternario y la unión de este complejo a los ribosomas, para constituir el complejo de iniciación de síntesis de proteínas, no obstante la antigüedad y las condiciones ecológicas a las que estuvo sujeto el material óseo estudiado.

Asimismo, los elementos que se requieren para la formación del complejo de iniciación durante la síntesis de proteínas, complejo que no se forma con la misma eficiencia con los ribosomas de origen bacteriano (cuadro 9).

Estos resultados abren la posibilidad de fundamentar y desarrollar nuevas líneas de investigación dentro de la antropología biológica con restos óseos prehispánicos tales como: la identificación de polimorfismos y variabilidad genética en poblaciones mexicanas antiguas, analizados hasta ahora en poblaciones vivientes (Lisker, 1981; Gorodetzky, 1989). Con el objeto de determinar relaciones de parentesco, patrones de migración (actualmente fundamentados en hipótesis arqueológicas, históricas y lingüísticas) y su relación con algunos grupos étnicos actuales, determinación de sexo (en infantes y adolescentes) y enfermedades genéticas, entre otros (figura 19).

Por otra, parte es importante identificar moléculas funcionales como el Met-ARNti provenientes de material óseo antiguo. Esto significa que se podrían buscar estas moléculas en diferentes tipos de restos como: tejido óseo, tejido momificado y tejido congelado de mayor antigüedad y así realizar estudios como el análisis de las propiedades, estructura, organización y evolución de los genes humanos.

La aplicación de estos estudios, permitirá enriquecer el acervo de conocimientos derivados de las investigaciones realizadas con la metodología clásica de la antropología física, arqueología y paleontología para el estudio de la evolución humana.

Es importante hacer notar que la aplicación de la biología molecular en la antropología es un método adicional, con el cual se pueden obtener datos acerca de la heterogeneidad genética del hombre; pero el ser humano no es sólo un conjunto de alelos, sino forma parte de un grupo, una tribu, una sociedad y de una ecología, por lo que su estudio no se puede desligar de otras disciplinas.

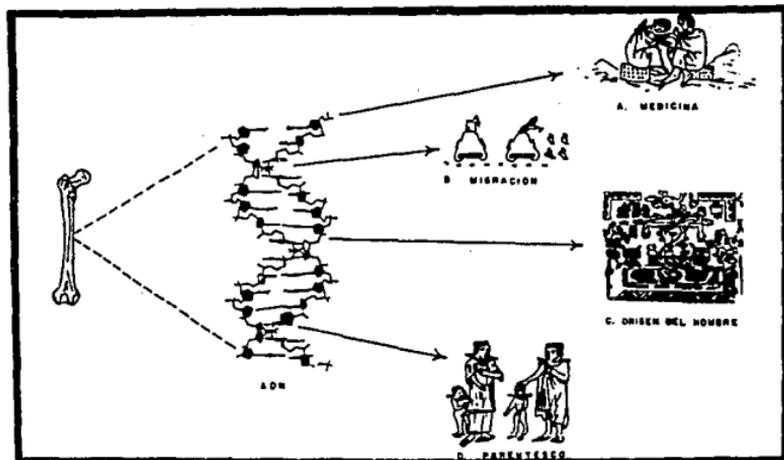


Figura 19. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO CON EL ADN DE RESTOS OSEOS HUMANOS

- A. ENFERMEDADES GENÉTICAS (Código Florentino)
- B. PATRONES DE MIGRACION (Ruta de la Peregrinación o Tira del Museo o Código Florentino)
- C. ORIGEN DE HOMBRE (Origen Mitológico del Hombre. Código Sedden).
- D. RELACIONES DE PARENTESCO. (Familia de Esclavos. Código Florentino).

REFERENCIAS

- Adams, J.M. 1980. The organization and expression of immunoglobulin. *Immunol. Today* 1: 10-17.
- Ali, S. Muller, C.R. and Epplen, J.T. 1986. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Human Genet.* 74: 239-243.
- Allison, M.J., Castro, N. and Hosseini, A. 1976. ABO blood groups in Peruvian mummies. An evolution of techniques. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 44: 55-62.
- Armour, J.A.L., Povey, S. Jeremiah, S. and Jeffreys, A.J. 1990. Systematic cloning of human minisatellites from ordered array charomid libraries. *Genomics* 8: 501-512.
- Ascenzi, A., Brumoni, M. Citro, G. and Zito, R. 1985. Immunological detection of hemoglobin bones of ancient Roman Times and Iron an Eneolithic Ages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7170-7171.
- Ayala, F.G. 1983. Genetic polymorphic from electrophoresis to DNA sequences. *Experientia* 951: 951-953.
- Balazs, I., Purello, M., Rubenstein, P., Aldadef, B. and Siniscalco, M. 1982. Highly polymorphic DNA site D1481 maps to the region of Burkitt lymphoma translocation and is closely linked to the heavy chain μ immunoglobulin locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 7395-7399.
- Beaudet, A.L. 1985. Bibliography of cloned human and other selected DNAs. *Amer. J. Hum. Genet.* 37: 386-40.
- Bell, G.I. Selby, H.J. and Rutter, W.J. 1982. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of a simple randomly repeating sequences. *Nature* 295: 7395-7399.
- Birhoim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1518.
- Birdsell, J. B., Simmons, R. T. and Graydon, J. J. 1979. Microdifferentiation in blood group frequencies among twenty-eight aboriginal tribal isolates in Western Australia. *Occ. Pap. Hum. Biol.* 2: 1-38.
- Blake, N. M. 1979. Genetic variation of the red cell enzyme systems in Australian aborigine populations. *Occ. Pap. Hum. Biol.* 2: 39-82.
- Boedtker, H. 1968. Dependence of the sedimentation coefficient on molecular weight of RNA after reaction with formaldehyde. *J. Mol. Biol.* 35:61-70.
- Bonné-Tamir, B., Johnson, M.J., Natali, A., Wallace, D.C. and Cavalli-Sforza, L.L. 1985. Human mitochondrial DNA types in two Israeli populations. A comparative study at DNA level. *Amer. J. Human Genet.* 38: 341-351.

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davies, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Human Genet.* 32: 314-331.
- Boyd, W.C. and Matoon, W. 1943 *Blood groups and transfusion*. Springfield, Ill.Ch. C. Thomas 340 pp.
- Britten, R.J. 1968. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* 231: 1393-1398.
- Bruto, E. L. 1992. El deterioro de material óseo en su contexto de enterramiento. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Conservación, Restauración y Museografía. 209 pp.
- Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods. Enzymol.* XII, Part B. Grossman, L. and Moldave, K. (eds). Academic Press, New York, 163 p.
- Candela, F.B. 1936. Blood group reactions in ancient human skeletons. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 21: 249.
- Cann, R.L., Brown, W.M. and Wilson, A.C. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106: 479-499.
- Cann, R.L., Stoneking, M. and Wilson, A.C. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 235: 31-36.
- Capon, D.J., Chen, E.Y., Levinson, A.D. Seeburg, P.H. and Goedel, D.V. 1983. Complete nucleotide sequence of the T24 human bladder carcinoma and its normal homologue. *Nature* 302: 33-37.
- Cavalli-Sforza, L.L. and Edwards, A.W.F. 1964. Analysis of human evolution. In: *Genetics Today*, Proc. XI Intl. Cong. Genetics, The Hague, Pergamon Press, Oxford. 923-933 pp.
- Cavalli-Sforza, L. L., Kidd, J. R. , Buccì, C., Bowcock, Am M. Hewlett, S. S. and Friedlaenders, J. S. 1986. DNA markers and genetic variation in the human species. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 411-432.
- Cavalli-Sforza, L. L., Piazza, A. Menozzi, P. and Mountain, J. 1988. Reconstruction of human evolution: bringing together genetic, archeological and linguistic data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 60002-60006.
- Cockburn, A. and Cockburn, E. (eds). 1980. *Mummies, disease, and ancient culture*. Cambridge: Cambridge University.
- Cohen, S.N., Chang, A.S.Y. and Hsu, L. 1983. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110-2118.

- Cooper, D.N. and Schidke, J. 1986. Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA. *Human Genet.* 73: 1-11.
- Comas, J. 1976. *Manual de Antropología Física*. Instituto de Investigaciones Antropológicas, U.N.A.M., 710 pp.
- Córdova, S.M., Lisker, R. and Loria, A. 1967. Studies in several genetic hematological traits of the Mexican population. XII. Distribution of blood group antigen in twelve Indian tribes. *Am. J. Phys. Anthropol.* 26: 55-66.
- Cox, D.W., Woo, S.L.C. and Mansfield, T. 1985. DNA restriction fragments associated with α -1 antitrypsin indicate a single origin for deficiency allele PiZ. *Nature* 316: 79-81.
- Crystal, R.G., Elson, N.A. and Anderson, W.P. 1974. Initiation of globin synthesis assay. *Methods Enzymol.* 30: 101-123.
- Curry, G.B. 1988. in *Molecular evolution and the fossil record*. Broadhead, T.W., (ed) Knoxville, T.N. 20-33pp.
- Dávalos Hurtado, E. 1970. Prehispanic osteopathology. In: *Handbook of Middle American Indians*. Physical Anthropology (ed) T. D. Stewart University of Texas Press, Austin 9: 68-81.
- Denaro, M., Blanch, H., Johnson, M.J., Chen, K.H., Wilmsen, E., Cavalli-Sforza, L.L. and Wallace, D.C. 1981. Ethnic variation in Hpa endonuclease cleavage patterns of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 5768-5762.
- Derman, E., Krauter, K., Weinberg, W.C., Ray, M. and Darnell, J.E. Jr. 1981. Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. *Cell* 23: 731-739.
- Doran, G.H., Dickel, D.N., Ballinger, W.E. Jr, Agee, O.P., Lapais, P.J. and Hauswirth, W.W. 1986. Anatomical, cellular and molecular analysis of 8,000-year-old human brain tissue from the Windover archeological site. *Nature* 323: 803-806.
- Dretzen, G., Bellard, M., Sassone-Corsi, P. and Chambon, P. 1981. A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 112: 295-298.
- Economou, E.P., Bergen, A.W., Warren, A.C. and Antonarakis, S.E. 1990. The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 2951-2954.
- Foo, I., Solc, W.L., Auferheids, A.C. 1992. PCR libraries of ancient DNA using a generalized PCR methods. *Biotech.* 12: 811-817.

- Fowler, S.J., Gill, P., Werrett, D.J. and Higgs, D.R. 1988. Individual specific DNA fingerprints from hypervariable region probe: Alpha globin 3'HVR. *Human Genet.* 79: 142-146.
- Garrels, J.J. 1979. Changes in protein synthesis during myogenesis in a clonal cell line. *Dev. Biol.* 73: 731-739.
- Genovés, S. 1962. Introducción al diagnóstico de la edad y del sexo en restos óseos prehistóricos. Instituto de Historia. U.N.A.M., México, 137 pp.
- Genovés, S. 1966. La proporcionalidad de los huesos largos y su relación con la estatura en restos mesoamericanos. Cuadernos , Serie Antropológica núm. 19, Instituto de Investigaciones Históricas. U.N.A.M., 34 PP.
- Gill, P., Jeffreys, A. J. and Werrett, D. J. 1985. Forensic applications of DNA " Fingerprints ". *Nature* 318: 577-579.
- Gorodetsky, C. 1988. Variación genética del MHC en la población mexicana. *HLA No. 1: 6-20.*
- Golenberg, E.M. Gianniasi, D.E., Clegg, M.T., Smiley, C.J., Durbin, M., Henderson, D. and Zurawski, G. 1990. Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species. *Nature* 344: 485.
- Golenberg, E.M. 1991. Amplification and analysis of Miocene plant fossil DNA. *Philos.-Trans.-R.-Soc.-Lond. [Biol]* 333: 419-427.
- Goulinoff, P., Pääbo, S. and Wilson, A.C. 1991. Molecular characterization of ancient maize: potentials and pitfalls. In : *Corn and Culture in the Prehistoric New World* (ed. Johannessen and C.A. Hastof). Boulder, Co.: Westview Press.
- Goodburn, S.E.Y., Higgs, D.R., Clegg, J.B. and Weatherall, D.J. 1983. Molecular basis of length polymorphism in the human globin gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:5022-5026.
- Hagelberg, E., Sykes, B. and Hedges, R. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342: 485.
- Hagelberg, E., Gray, I.C. and Jeffreys, A.J. 1991a. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427-429.
- Hagelberg, E., Bell, L.S., Allen, T, Boyde, A. and Jones, S.J. 1991b. Analysis of ancient bone DNA: technique and application *Philos.-Trans.-R-Soc.-Lond. [Biol]*. 333: 399-407.
- Haenni, D. Landet, V. Sakka, M., Begue, A. and Stehelin, M. 1990. Amplification of mitochondrial DNA fragments from ancient human teeth and bones. *C.R. Acad. Sci. [III]* 310:365-370.
- Hansen, H.E. and Gutler, H. 1983. HLA types mummified Eskimo bodies from the 15th century. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 61: 447-452.

- Harris, H. and Hopkins, D.A. 1972. Average heterozygosity per locus in man: an estimate based on the incidence of enzyme polymorphisms. *Ann. Human Genet.* 36: 9-19.
- Harrison, R.G., Connolly, R.C. and Abdalla, A. 1969. Kinship of Smenkhare and Tutankhamen affirmed by serological micro method. *Nature* 224: 325-326.
- Haydon, P.M. and Biukstra, J. 1991. Amplification and analysis of HLA-DQA1 and D4S175 in ancient Peruvian mummies. *Am. J. Hum. Genet.* 49 (4 suppl.): 460.
- Helentjaris, T. 1988. *Maize Genetics Coop. New Letter* 62: 104-105.
- Higuchi, R.G. and Wilson, A.C. 1984. Recovery of DNA of extinct species. *Fed. Proc.* 43: 1557.
- Higuchi, R.G. Bowman, B., Freiberger, M., Rayder, O.A. and Wilson, A.C. 1984. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284.
- Higuchi, R.G., Wrischnick, L.A., Oakes, E., Tonge, G.M. and Wilson A.C. 1987. Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of post mortem change. *J. Mol. Evol.* 25:283-287.
- Hofker, M.H. Wapenaar, M.C., Goor, N., Baker, B., Van Omsen, G.J.B. and Pearson, P.O. 1985. Isolation of probes detecting restriction fragment length polymorphism from X chromosome specific libraries: potential use for diagnosis of Duchenne's muscular dystrophy. *Human Genet.* 70: 148-156.
- Horai, B. and Matsunaga, E. 1986. Mitochondrial DNA polymorphism Japanese II. Analysis with restriction enzymes of four or five base pair recognition. *Human Genet.* 72: 105-117.
- Horai, S., Kondo, R., Murayama, and Hayashi, S. 1991. Mitochondrial DNA sequences differences in contemporary and ancient humans. *Am. J. Hum. Genet.* 49 (4 suppl.): 461.
- Horne, P. R. T. and Kawasaki, S. O. 1984. The prince of the plomo: A palopathological study. *Bull. Acad. Med. New York.* 60: 925-936.
- Hoysbida, H. and Miyata, T. 1983. Unusual evolutionary conservation and frequent segment exchange in Class I genes of the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 2671-2671.
- Houde, P. and Braun, M.J. 1988. Museum collections as a source of DNA for studies of avian phylogeny. *The Auk* 105: 773-775.
- Mummel, S. and Herrmann, B. 1991. Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften* 78:266-267.
- Hutchinson, F. 1985. Chemical changes induced by ionizing radiation. *Progress Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 32: 115-154.

Huttner, K.M., Scangos, G. A. and Ruddle, F. H. 1979. DNA mediated gene transfer of a circular plasmid into murine cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 5820-5824.

Jaen, M.T. y López Alonso, S. 1974. Algunas características físicas de la población prehispánica de México. Antropología Física. Epoca Prehispánica de México. 113 pp.

Jaen, M.T. y Serrano, C. 1974. Osteopatología. Antropología Física. Epoca Prehispánica, panorama histórica cultural. SEP/INAH, México, núm. 3 155-178.

Jarman, A., Nicholls, R.D., Weatherall, D.J., Clegg, J.B. and Higgs, D.R. 1983. Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human α -globin cluster. EMBO J. 5:1857-1863.

Jeffreys, A.J. 1979. DNA sequence variants in the $G\gamma$, $A\gamma$ - δ - β and β -globin genes of man. Cell 18: 1-10.

Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, L.S.L. 1985a. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature 14: 67-73.

Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, L.S.L. 1985b Individual specific fingerprints of human DNA. Nature 316: 76-79.

Jeffreys, A.J., Broofield, J.F.G. and Semeonoff, R. 1985c. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature 317: 818-819.

Johnson, B.H., Olson, C.B. and Goodman, M. 1985. Isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from tissue of the woolly mammoth *Mammuthus primigenius*. Biochem. Physiol. (B) 81: 1045-1051.

Jukes, T.R. and King, J.L. 1979. Evolutionary nucleotide replacements in DNA. Nature 281: 605-606.

Kan, Y.W. and Dozy, A.M. 1978. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 5631-5653.

Kimura, M. 1977. Preponderance of synonymous changes as evidence of neutral theory of molecular evolution. Nature 267: 275-276.

Kirk, R. L. 1979. Genetic differentiation in Australia and its bearing on the origin of the first Americas : The First Americas: Origins, Affinities and Adaptations, W.S. Laughlin and A. B. Harper (eds) Gustav Fisher, New York, pp 211-237.

- Knowlton, R. G., Brown, U. A., Braman, J. C., Barker, D., Shum, J.W., Murray, C., Takvorian, T., Ritz, J. and Donniss-Keller, H. 1986. Use of highly DNA probes for genotype analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 68: 378-385.
- Knott, T.J., Wallis, S.C., Pease, R.J., Powell, L.M. and Scott, J. 1986. A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B gene. *Nucleic Acids Res.* 14:9215-9216.
- Kozak, M. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. *Microbiol. Rev.* 47(1): 1-45.
- Lawlor, D. A., Dickel, C. D., Hauswirth, W. W. and Perham, P. 1991. Ancient HLA genes from 7,500-year-old archeological remains. *Nature* 349: 785-788.
- Leder, P. 1982. The genetics of antibody diversity. *Sci. Am.* 246: 72-83.
- Lewin, B. 1990. *Genes* IV. 4 ed. Oxford, Oxford University. 857 p.
- Lisker, R. 1981. Estructura genética de la población mexicana. Salvat Mexicana Ediciones. México. 158 pp.
- Litt, M. and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Lomedico, P., Rosenthal, N., Efstratiadis, A., Gilbert, W., Kolodner, R. and Tizard, R. 1979. The structure and evolution of two nonallelic rat proinsuline genes. *Cell* 18: 545-558.
- Lowenstein, J. M., Sarich, V. M. and Richardson, B. J. 1981. Albumin systematics of the extinct mammoth and Tasmanian wolf. *Nature* 291: 409-411.
- Lowry, D.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin- phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- McKusick, V.A. 1986. The gene map of *Homo sapiens*. Status and Perspectives. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 15-27.
- Maitra, U., Stringer, E.A. and Chaudhuri, A. 1982. Initiation factors in protein biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 869-900.
- Maniatis, T.E., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 545 p.
- Manzanilla, L. (ed.). 1986. Unidades habitacionales Mesoamericanas y sus áreas de actividad. Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM, México.
- Márquez, L.M. 1974. Sociedad colonial y enfermedad. Colección Científica, núm 133, INAH, México, 111 pp.

Meijer, M.F., Perizonius, R. and Geraedts, J.P.M. 1991. A simple method for recovery of DNA from ancient bones. *Am. J. Hum. Genet.* 49 (4 suppl): 440.

Meijer, H., Perizonius, W.R.K. and Geraedts, J.P.M. 1992. Recovery and identification of DNA sequences harboured in preserved ancient bones. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183: 367-374.

Miller, M.F. and Wickoff, R.W.G. 1972. Proteins of dinosaurs bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 122: 10.

Millones, M. y Vargas S.R. 1991. El parentesco biológico y sus implicaciones culturales. Estudios de antropología molecular en restos antiguos. *Avances y perspectivas. Jubileo IIEM, UNAM. México, D.F.*

Minty, A. and Newmark, P. 1980. Gene regulation: New, old, and remote controls. *Nature* 288: 210-211.

Miyata, T. Yasunaga, T. and Nishida, T. 1980. Nucleotide sequence divergence and functional constraint in mRNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:7328-7332.

Moldave, K. 1985. Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1109-1149.

Molecular Biology of Homo sapiens. 1986. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. New York Cold Spring Harbor Laboratory. Vol 51.

Mourat, A.E. 1954. Distribution of the human blood groups. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P. Wolff, R. Holm T., Culver, M., Martin, C. Fujimoto, E. Hoff, M. Kumlin, E., and White, R. 1987. Variable number of tandem (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.

Nakamura, Y., Carlson, M., Krapcho, K., Kanamori, M. and White, R. 1988. New approach for isolation of VNTR markers. *Am. J. Genet.* 43: 854-859.

Neel, J. V., Layrisse, M. and Salzano, F. M. 1977. Man in the tropics: the Yanomama Indians In: Population Structure and Human Variation, G.H. Harrison (ed) Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 109-142.

Nei, M. and Roychoudhury, A.K. 1982. Genetic relationship and evolution of human races. *Evol. Biol.* 14: 1-59.

Nei, M. and Koehn, R.K. 1983. Evolution of genes and proteins. Sinauer Assoc. Inc. Publ. Sunderland. Massachusetts. 331 p.

Nishimura, S. 1979. Modified Nucleotides in tRNA In: Transfer RNA: Structure, properties and recognition. Schimmel, P. R., Söll, D. and Abelson, (eds). Cold Spring Harbor Laboratory. 59: 29-39.

- Nowicki, Z.M., Sarneka-Keller, M., Pawlicki, R., Kubiak, H. and Korbek, A. 1972. Morphological and chemical analysis of the structure of the fossil dinosaur bone. *Anat. Anz.* 132: 10-23.
- Opdenaker, G., Cabesa-Arvelais, Y., Fiten, P., Dijkman, R., Van Dame, J., Volckaert, G., Billiau, A., Van Elsen, A., Van der Bergue, H. and Cassiman, J.J. 1987. Human elongation factor 1 α : a polymorphic and conserved multigene family with multiple chromosomal localizations. *Human Genet.* 75:339-344.
- Osborne, D., Roberts, B., Payne, P.I. and Sen, S. 1971. Protein synthesis and viability in rye embryos. In: *Mechanisms of Regulation of Plant Growth* (ed. R.L. Bileski, A.R. Ferguson and M.M. Cresswell) pp.803-812. Wellington: Bulletin 12, The Royal Society of New Zealand.
- PEÄbo, S. 1985a. Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies. *J. Archeol. Sci.* 12: 411-417.
- PEÄbo, S. 1985b. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature* 314: 644-645.
- PEÄbo, S. 1986. Molecular genetic investigations of ancient human remains. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 441-446.
- PEÄbo, S., Glifford, J.A. and Wilson, A.C. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7,000-year-old brain. *Nucleic Acids Res.* 16: 9775-9887.
- PEÄbo, S. 1989a. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6196-6200.
- PEÄbo, S., Higuchi, R.G. and Wilson, A.C. 1989b. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archeology. *J. Biol. Chem.* 264: 9707-9712.
- PEÄbo, S., Irwin, D.M. and Wilson, A.C. 1990a. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. *J. Biol. Chem.* 265: 4718-4721.
- PEÄbo, S., Dew, K., Fraizer, B.S. and Ward, R.H. 1990b. Mitochondrial evolution and peopling of the Americas. *Am. J. Phys. Anthropol.* 81: 277.
- Paredes, B. 1990. Unidades habitacionales en Tula, Hgo. Serie Arqueológica. Instituto de Investigaciones Antropológicas. UNAM 248 pp.
- Pawlicki, R., Korbek, A. and Kubiak, H. 1966. Cells, collagen fibrils and vessels in dinosaur bones. *Nature* 211: 655-657.
- Pawlicki, R. 1976. Preparation of fossil bones specimens for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 51: 147-156.
- Pawlicki, R. 1984. Metabolic pathways of the fossil bones. Part II. Vascular canal communication system. *Folia Hystochem.* 22: 33-38.

- Pedro, J. and Chinay, E. 1991. Recovering DNA and proteins from Peruvian mummies. *Am. J. Hum. Genet.* 49 (4 suppl) : 115.
- Poinar, G.O. and Hess, R. 1982. Ultrastructure of 40-million year-old insect tissue. *Science* 215: 1241-1242.
- Prager, E.M., Wilson, A.C. Lowenstein, J.M. and Sarich, V.M. 1980. Mammoth albumin. *Science* 209: 287-289.
- Rich, A., Quigley, G. I. Teeter, M M. Ducruix, A. and Woo, N. 1979. Recent progress in tRNA structural analysis. In: *Transfer RNA: Structure, properties and recognition*. Schimmel, P. R., Söll, D. and Abelson, J. (eds). Cold Spring Harbor Laboratory. 59 : 101-113.
- Rogers, S.O. and Bendich, A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Rogan, P.K. and Salvo, J.J. 1990. Study of nucleic acid isolated from ancient remains. *Year Book Phys. Anthropol.* 33: 195-214.
- Rollo, F., Amici, A., Salvia, R. and Garbuglia, A. 1988. Short but faithful pieces of ancient DNA. *Nature* 35: 774.
- Rollo, F., Venanzi, F.M. and Amici, A. 1991. Nucleic acids in mummified plants seeds: Biochemistry and molecular genetics of pre-Columbian maize. *Genet. Res.* 58: 193-201.
- Romano, A., Villalobos, R.F. y Balcorta, L.A. 1976. Investigaciones en paleohistología antropológica. *Boletín INAH*. No 16 Epoca III. 45-52.
- Rychkov, Y. G. and Sheremetyeva, V. A. 1977. The genetic process in the system of ancient human isolated in North Asia. In: *Population Structure and Human Variation*. G. A. Harrison (ed) Cambridge, Univ. Press, Cambridge, pp. 47-108.
- Salazar-Mallén, M. 1951. Estudios inmunológicos de restos óseos antiguos. *Gaceta Médica de México*. 81: 122-128.
- Salazar-Mallén, M. and Arias, T. 1959. Inheritance of Diego blood group in Mexican Indians. *Science* 130: 164.
- Salser, W. and Issacson, J.S. 1976. Mutation rates in globin genes: The genetic load in Haldane's dilemma. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 19: 205-220.
- Sandison, A. T. 1980. Diseases in Ancient Egypt., in *Mummies disease and ancient*. A Cockburn and E. Cockburn (eds.) Cambridge University Press, England. pp. 29 - 39.
- Schneider, W.C. 1957. Determination of nucleic acids in tissue by pentose analysis. *Methods Enzymol.* III: 680-684.

- Schmill, N. and Fritzier, D.A. 1989. Characterization of mesoamerican MHC genes using DNA isolated from precolumbian skeletons. *Clin. Invest. Med.* 12 B65.
- Selander, R.K. and Whittman, T.S. 1983. Protein polymorphism and the genetic structure of populations. In: *Evolution of genes and proteins.* (Ed.) Nei, M. and Kohen, R.K. Sinauer Assoc. Inc. Publishers. pp. 89-114.
- Sensanbaugh, G.F. 1982. *Current Topics in Biological and Medical Research.* Vol. 16 Liss New York. 247-282.
- Serrano, C. y Ramos, R.M. 1984. Perfil bioantropológico de la población prehispánica de San Luis Potosí. *Inst. Inv. Antropol. Antropología Física. Serie Antropológica* 40. UNAM 66p.
- Sholer, G.J.F. and Weiss, J.J. 1960. Mechanisms of the radiation induced degradation of nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 2: 379-385.
- Smouse, P.E., Vitsthum, V.J. and Neel, J.V. 1981. The impact of random and lineal fission on the genetic divergence of small human groups: a case study among the Yanomamas. *Genetics* 98: 179-197.
- Stanley, W.M. 1974. Specific aminoacylation for the methionine-specific tRNA's to eukariotes. *Methods. Enzymol.* 29:530-547.
- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 95: 503-510.
- Sykes, B.C., Ogilvie, D.J. and Wordsworth, B.P. 1985. Lethal osteogenesis imperfecta and a collagen gene deletion. Length polymorphism provides an alternative explanation. *Human Genet.* 70: 35-37.
- Sykes, B.C. 1991. The past comes alive. *Nature* 352:381-382.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Smiley, C.J. 1992. An rbc sequence from a Miocene *Taxodium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 449-451.
- Spirin, A.S. 1958. Spectrophotometric determination of total nucleic acids. *Biochimiyu* 23: 656-662.
- Stastny, P. 1974. HLA - antigens in mummified pre-columbian tissue. *Science* 183: 864-866.
- Stoker, N.G., Cheah, K.S.E., Griffin, J.R. and Solomon, E. 1985. A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen. *Nucleic Acids Res.* 13: 4613-4622.
- Terra, De H. Romero, J. and Steward, T.D. 1949. *Tepexpan Man.* Viking Publications in Anthropology. 21: 132p.
- Thuesen, I. and Engberg, J. 1990. Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone. *J. Archeol. Sci.* 17: 679-689.

Thomas, R.H., Shaffner, W. Wilson, A.C. and Pääbo, S. 1989. DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf. *Nature* 340: 465-467.

Tonegawa, S., Sakano, H., Maki, R., Trauneker, A., Heinrich, G., Roeder, W. and Kurosawa, Y. 1981. Somatic reorganization of immunoglobulin genes during lymphocyte differentiation. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 45: 839-858.

Toral, R. E. 1949. Estudio inmunológico de restos óseos recogidos en la zona arqueológica de Monte Albán. Tesis. Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Químicas. México. 33p.

Van Nest, G., Mc Donald, R.J., Raman, R. K. and Rutter, W. J. 1980. Protein synthesized and secreted during rat pancreatic development (two dimensional gels of developing tissues). *J. Cell Biol.* 89: 794-794.

Vargas, R. and Castañeda, M. 1983. Age-dependent decrease in the activity of protein-synthesis factors in rat brain. *Mech. Ageing Dev.* 21: 183-191.

Vargas, S. R. 1989. Material genético de restos óseos humanos. *Información Científica y Tecnológica.* 11: 19-21.

Vargas, S.R. y Sánchez, A. R. 1990. Material genético de restos óseos humanos. En: V Volumen de Estudios de Antropología Biológica. Ed. Inst. Inv. Antropol. UNAM y el INAH. SEP. México. pp 219-242.

Vargas, S.R., Sánchez, A.R., González, S. B. y Huicochea, L. 1990. ADN de restos óseos humanos. XVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. San Luis Potosí, S.L.P.

Vargas, S.R., Mendoza, G.T. 1991. Estudios Moleculares en restos óseos humanos de Tlalteloco. VI Coloquio de Antropología Física "Juan Comas". México.

Vassart, G., Georges, M., Monsieur, R., Brocas, H., Lequarre, A.S. and Christophe, D. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 235: 683-684.

Venanzi, F. and Rollo, F. 1990. Mummy RNA last longer. *Nature* 343: 25-26.

Vergnaud, G. 1989. Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 17: 7623-7630.

Vergnaud, G., Mart, D., Apiou, F., Aurias, A., Lathrop, M. and Lauthier, V. 1991. The use of syntenic tandem repeats to isolate new VNTR loci: Cloning hypermutable sequence. *Genomics* 11: 135-144.

Von Endt, D. W. and Ortner, D. J. 1986. Aminoacid analysis of bone from possible case of prehistoric iron deficiency anemia from the American Southwest. *Am. J. Phys. Anthropol.* 59: 377-385.

- Wainscoat, J.I., Hill, H. V. S. Boyce, A. L. Flint, J. A. G. Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. 1986. Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. *Nature* 319: 419-439.
- Wainscoat, J.S., Pilkington, S., Peto, T.E.A., Bell, J.I. and Higgs, D.R. 1987. Allele-specific DNA identity patterns. *Human Genet.* 75: 384-387.
- Wallace, D. C., Garrison, K. and Knowler, W. C. 1985. Dramatic founder effects in Amerindians mitochondrial DNAs. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68: 149-155.
- Wallace, D.C. and Torroni, A. 1992. American Indians prehistory as written in the mitochondrial DNA: A review. *Hum. Biol.* 63: 403-416.
- Wang, G. H. and Lou, C. C. 1981. Isolation and identification of nucleic acid from liver corpse from Chang-sha Han tomb. *Shou Wu Hua yu Sheng Wu Li Chin Chan.* 39:70.
- Weber, J. L. and May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms with can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Genet.* 44: 388-396.
- Weiner, S., Lowenstain, H. A. and Hood, L. 1976. Characterization of 80-million year-old mollusk shell proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73: 2541-2545.
- White, R. and Caskey, C. T. 1988. The human as an experimental system in molecular genetics. *Science* 240: 1483-1488.
- Willard, H.F. 1991. Evolution of Alpha satellite. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1: 509-514.
- Williamson, R. Davies, K. E. Donald, J., Gillian, C., Wallis, S. and Humpries, S. 1984. The implications of genetic variation in human pathology. *Biochemical Society Symposia* 49: 183-188.
- Wrischnick, L. A., Higuchi, R. G., Stoneking, M., Erlich, H. A. Arheim, N. and Wilson, A.C. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Res.* 15: 529-541.
- Wong, Z., Wilson, V., Jeffreys, A. J. and Thein, S. L. 1986. Cloning a selected fragment from a human DNA "fingerprint": Isolation of an extremely polymorphic minisatellite. *Nucleic Acids Res.* 14: 4605-4616.
- Wong, Z., Wilson, V., Patel, S. and Jeffreys, A. J. 1987. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Rev. Genet.* 51: 269-288.
- Wyaman, A. R. and White, R. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 6754-6758.
- Wyaman, A. R., Mulholland, J. and Bolstein, D. 1986. Oligonucleotide repeats involved in the highly polymorphic locus D14S1. *Am. J. Human Genet.* 29: A 226.

Wyman, R. L. and Boyd, W. C. 1937. Blood group determination of American Indians. *Am. Anthropol.* 39: 583-585.

Wyckoff, R. G. W. 1972. The biochemistry of animal fossils. Schienthechnica, Bristol, United Kindom.

Yang, W. K. and Novelli, D. G. 1971. Analysis of isoaccepting tRNA's in mammalian tissues and cells. *Method. Enzymol.* XX, Part C. 44-55.