

59



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES " I Z T A C A L A "

"DIVERSIDAD GENETICA DEL DNA MITOCONDRIAL EN LA POBLACION MESTIZA MEXICANA."

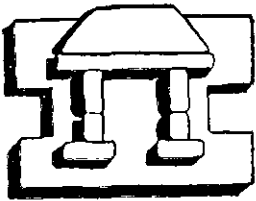
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE B I O L O G O P R E S E N T A :

RICARDO GONZALEZ TRUJILLO

2001

DIRECTOR DE TESIS: JAIME BERUMEN CAMPOS



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

**DIVERSIDAD GENETICA DEL  
DNA MITOCONDRIAL EN LA  
POBLACION MESTIZA  
MEXICANA**

**Gracias a mis padres, a mis  
hermanos y a todos aquellos  
que de alguna forma me  
ayudaron con este trabajo.**

## INDICE

- RESUMEN
- INTRODUCCION
  - HUELLAS DIGITALES DE DNA
  - DNA MITOCONDRIAL
- ANTECEDENTES
- JUSTIFICACION
- OBJETIVOS
- MATERIAL Y METODOS
  - MATERIAL BIOLÓGICO
  - PURIFICACION DE DNA GENOMICO
  - AMPLIFICACION DE DNA
  - RECUPERACION DE DNA DE GELES DE AGAROSA
  - SECUENCIACION DE DNA
  - ANALISIS DE SECUENCIAS
- RESULTADOS
- DISCUSION
- CONCLUSIONES
- ANEXOS
- BIBLIOGRAFIA

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue investigar la diversidad genética de la región *D-LOOP* del DNA mitocondrial en 72 individuos pertenecientes a la población mestiza mexicana para su utilización en pruebas de identificación de individuos. El DNA se obtuvo de sangre periférica. La región hipervariable I (*RHV1*) se amplificó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se secuenció con un método fluorescente en un Analizador Automático de DNA. De los 72 individuos se obtuvieron 45 haplotipos diferentes observándose que la diversidad genética fue de 0.96 y la Probabilidad de Coincidencia al Azar (PCA) fue de  $1.1 \times 10^{-2}$ . De las secuencias observadas solamente 4 ya estaban reportadas. Se compararon estas secuencias con las reportadas para otras poblaciones y se realizó un árbol de relaciones filogenéticas, en donde se observa que la población mexicana guarda una relación genética estrecha con la población asiática.

# **INTRODUCCION**

## HUELLAS DIGITALES DE DNA

Hasta hace poco tiempo la identificación de individuos se realizaba con métodos que requerían del cuerpo físico íntegro del individuo o por lo menos de una gran parte del mismo. No existía método alguno capaz de realizar la identificación en los casos en los que se contaba solamente con alguna pequeña muestra biológica. (como sangre, cabello, hueso, semen, etc.), en individuos quemados o para los casos de paternidad en los que era necesario verificar la relación biológica entre diferentes individuos. Era por tanto, de suma importancia el desarrollo de técnicas adecuadas que permitieran distinguir de una manera rápida y relativamente sencilla entre un individuo y otro. Debido a la falta de información positiva que frecuentemente se obtiene con los métodos convencionales utilizados para la identificación de individuos en casos forenses o de paternidad, así como para el estudio de la diversidad genética, se han desarrollado técnicas moleculares basándose en marcadores de DNA conocidos como "huellas genéticas" (Horai y Hayasaka 1990). El análisis de identificación utilizando la huella genética, considera que la diversidad del DNA presente en los organismos es muy grande, por lo que es improbable que dos individuos de la misma especie tengan la misma secuencia de bases en su DNA y por lo tanto, se basa en los polimorfismos de ciertas regiones variables del material genético.

Para la identificación de personas basándose en el análisis de DNA se pueden utilizar tres tipos de marcadores genéticos: los microsatélites, los minisatélites y los de variación de secuencia. Los microsatélites son secuencias específicas de unidades de DNA (de 2 a 5 pb) repetidas muchas veces alcanzando tamaños de 100 a 300 pb. En los minisatélites los fragmentos que se repiten están formados de 15 pares de bases aproximadamente y se repiten en arreglos que van de 0.5 a 30 kb. En los marcadores de variación de secuencia lo que se observa son las mutaciones nucleotídicas de ciertas regiones específicas del DNA y no el tamaño del fragmento, como en los microsatélites y minisatélites (Valverde y Paredes 1996).





Por ser de herencia materna, el DNAm no se recombina y por lo tanto, todos los individuos que estén relacionados matrilinealmente tienen el mismo DNAm. Por otra parte, también es posible obtener DNAm de cualquier tipo de tejido como son las células somáticas o espermáticas. El DNAm evoluciona muy rápido (su tasa de intercambio de bases es de 5 a 10 veces más rápida en comparación con la del DNA nuclear) por lo que el polimorfismo es alto en las regiones de control. (Vigilant et al. 1989, Horai y Hayasaka 1990, Stoneking et al. 1991, Ward et al. 1991, Shields et al. 1993).

El DNAm se divide en dos regiones, una región larga (15 kb) que codifica para algunas proteínas necesarias en la fosforilación oxidativa y una región polimórfica no codificante de 680 pb aproximadamente, conocida como *región control* o *D-LOOP* (Displacement Loop: Anillo o lugar de desplazamiento, figura 2). En esta región se encuentra el origen de la transcripción y replicación del DNAm (Crews et al. 1979, Horai y Hayasaka 1990, Stoneking et al. 1991). Esta región es altamente polimórfica, se localiza entre las posiciones 16168-280 de la molécula de DNAm y contiene a su vez 2 subregiones, la *Región Hipervariable I* (RHVI, figura 2) la cual comprende de la posición 16173 a la 16410 y la *Región Hipervariable II* (RHVII, figura 2) de la posición 0 a la 191 (Crews et al. 1979, Horai y Hayasaka 1990, Bendall y Sykes 1995).

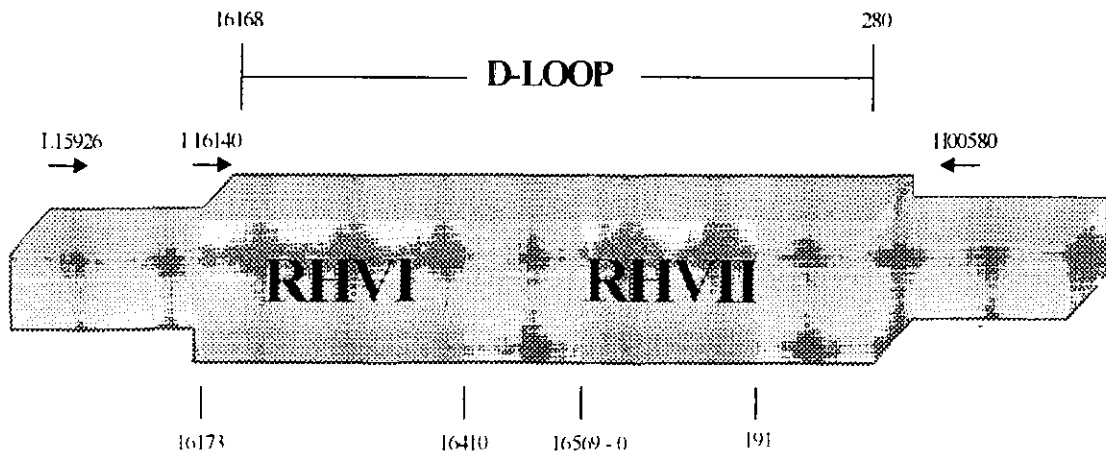


FIGURA 2 - Representación de la Región *D-LOOP* del DNA mitocondrial de células HeLa, en donde se muestran las dos subregiones en las que se divide

El polimorfismo de la región *D-LOOP* del DNAm permite, por tanto, que esta pueda ser utilizada como marcador molecular en pruebas de identificación forense y casos de maternidad, así como en la interpretación de fenómenos poblacionales y diversos estudios en las áreas antropológicas (Stoneking et al. 1991, Holland et al. 1993, Vargas y Enriquez 1996)

Para utilizar el DNAm en casos de identificación en México, es necesario conocer las diferentes variedades que se presentan de la región *D-LOOP* así como su frecuencia y distribución dentro de la población. Con los datos de las frecuencias genéticas se puede calcular la *Probabilidad de Coincidencia al Azar* (PCA) entre dos individuos no relacionados genéticamente por línea materna, es decir, cual es la probabilidad de que dos individuos tomados al azar presenten el mismo patrón genético dentro de esta región. Este cálculo es importante para la interpretación de los análisis de DNA en los casos de inclusión o coincidencia genética.

# **ANTECEDENTES**

Se han realizado múltiples estudios de genética de poblaciones en DNAm tanto en muestras recientes como en restos óseos antiguos, ya sea para fines de identificación forense como para el estudio de las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. Vigilant y cols. analizaron en 1989 una fracción de la *RHVI* en 15 individuos de una población pigmea y reportaron una diversidad genética de 0.93 significando esto que la población es muy diversa y que de cada 100 individuos 93 presentarían secuencias diferentes. Stoneking y cols. en 1991 analizaron secuencias de 52 individuos de cinco diferentes grupos étnicos reportando una diversidad de 1.00 y una Probabilidad de Coincidencia al Azar (PCA) con rangos de 1.8% a 4.4%, esto es, que de cada 100 individuos existe entre un 1.8% y un 4.4% de probabilidades de que 2 individuos tomados al azar tengan el mismo tipo de DNA para esa región. En ese mismo año Ward y cols. estudiaron un segmento de 210 pb de la *RHVI* en 63 individuos reportando una diversidad genética 0.95; Se han realizado muchos trabajos utilizando el DNAm, sin embargo los autores no reportan datos de diversidad ya que estos estudios son enfocados más a las tasas y probabilidades de mutaciones nucleotídicas con fines evolutivos y de relaciones filogenéticas que al estudio de la diversidad poblacional con fines de identificación de individuos.

# **JUSTIFICACION**

En México no hay estudios de diversidad poblacional de la región D-LOOP del DNAm por lo que se desconoce cuál es la probabilidad de que dos individuos tomados al azar dentro de la población tengan el mismo patrón genético de DNAm. Debido a las ventajas que representa el uso del DNAm como marcador molecular en diversas áreas (forenses, demográficas y antropológicas), es necesario la realización de un estudio de diversidad poblacional con este marcador. Con la obtención de los tipos de DNAm (haplotipos) más frecuentes en un grupo mestizo, será posible la creación de una base de datos de referencia, que nos permita aplicar este marcador en estudios poblacionales posteriores, además, de que esta información puede ser de gran ayuda cuando se utilice el DNAm en estudios de identificación de individuos.

## OBJETIVO GENERAL

Investigar la diversidad genética de la región D-LOOP del DNA mitocondrial en una muestra de la población mestiza mexicana

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Amplificar y secuenciar la región D-LOOP del DNA mitocondrial de 72 individuos representantes de la población mestiza mexicana.
- Calcular la diversidad poblacional de las secuencias analizadas así como la frecuencia alélica y la P.C.A.
- Comparar estos resultados con los encontrados en otras poblaciones y revisar si las secuencias encontradas en este estudio ya han sido reportadas.
- Realizar un árbol de relaciones filogenéticas de las muestras obtenidas en este estudio y otro árbol junto con muestras reportadas en otras poblacionales.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **MATERIAL BIOLÓGICO.**

Para el proceso de selección de los individuos, se realizó una lista de los estudiantes pertenecientes a la Escuela Médico Militar, en donde hubiera individuos nacidos en México, de padres mexicanos y sin relación materna entre sí (anexo 1). Una vez teniendo esta lista se tomaron de manera aleatoria 72 individuos (30 mujeres, 42 hombres). A cada individuo se le extrajo una muestra sanguínea de 10 ml para la purificación de DNA.

## **PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO.**

Se colectó el paquete de glóbulos blancos de 10 ml de sangre periférica obteniéndose aproximadamente 700  $\mu$ l de DNA. Los 10 ml se centrifugaron a 2500 rpm durante 7 min, y se extrajo el paquete de glóbulos blancos. Se adicionaron 10 volúmenes de solución de extracción mezclando suavemente. Se adicionaron 10 mg/ml de solución de RNAsa y 20  $\mu$ g /ml de Proteínasa K. Se incubó a 65 °C durante 20 minutos y se agregó un volumen de fenol saturado, se agitó suavemente en forma vertical y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionó un volumen de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24,1), se agitó suavemente en forma vertical para después centrifugar a 2000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se agregaron 600  $\mu$ l de NaCl 5M y un volumen de isopropanol. Se mezcló suavemente por inversión hasta la formación de la hebra de DNA. La hebra se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml con una punta eppendorf de plástico. Se lavó con 1 ml de etanol al 70 % y mezcló suavemente por inversión. Se centrifugó a 2 000 rpm durante 1 min; se desechó el sobrenadante y se repitió la operación con el lavado dos veces más. Una vez eliminado el exceso de etanol, el pellet (o pastilla ) se resuspendió en agua destilada y estéril.

El DNA obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría. Las lecturas espectrofotométricas tomadas fueron a 260 nm para los ácidos nucleicos y a 280 nm para las proteínas, esto con el fin de conocer el grado de pureza del material genético y se prepararon

alícuotas a 50 ng/μl de cada muestra. Estas alícuotas contienen todo el material genético, tanto el DNA nuclear como el DNA mitocondrial, así que para la separación del DNA<sub>m</sub> se utilizaron oligonucleótidos específicos para la región que se requería amplificar.

## AMPLIFICACIÓN DEL DNA.

Para la amplificación de la región *D-LOOP* del ADN mitocondrial se usó la técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando la enzima *Taq DNA polimerasa*. Para flanquear esta región se utilizaron los oligonucleótidos L15926 y H00580 a una concentración final de 1 μM y 2.0 μM respectivamente (figura 2 y tabla 1).

TABLA 1. - Posición y secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de amplificación por PCR y de secuencia

REGION	NOMBRE DEL PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	NUMERO DE BASES	POSICION
<i>D-LOOP</i>	L15926 *	TCAAGGCTTACACCAGTCTTGTAACC	27	15900-15927
<i>D-LOOP</i>	H00580*	TTGAGGAGGTAAGCTACATA	20	579-599
<i>III</i>	L16140 *	TACTTGACCACCTGTAGTAC	20	16140-16160

\* Las designaciones corresponden a las terminaciones 3' de acuerdo a la secuencia reportada por Anderson et al. en 1981. H y L corresponden al tipo de cadena de DNA. H (heavy) corresponde a la cadena pesada y L (light) a la cadena ligera.

La reacción de PCR se realizó utilizando la siguiente mezcla: 2.5 μl de Buffer de PCR 10 X (Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2.5 μl de dNTPs (2 mM), 1.0 μl de MgCl<sub>2</sub> (50

volumen final de 25  $\mu$ l. Las condiciones de ciclaje de PCR para la amplificación de la región *D-LOOP* completa se muestran en el siguiente cuadro:

TEMP (°C)	TIEMPO	NUMERO DE CICLOS
94	2 min.	1
94	45 Seg.	32
60	1 min.	32
72	2 min.	32
72	10 min.	1
4	Indefinido	-

Al producto de la PCR obtenido se le agregó buffer de carga y se corrió en geles de agarosa al 1.5% a 105 mV durante 30 min. Posteriormente se tiñó el gel en bromuro de etidio (con una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) y se observaron en un transiluminador de luz UV.

#### **RECUPERACIÓN DE DNA DE GELES DE AGAROSA.**

Una vez que el DNA fue analizado en el gel, se cortó la banda del DNA y se colocó en un tubo eppendorf, a éste se le agregaron 3  $\mu$ l de resina Quiaex II (Quiagen o QxII), 120  $\mu$ l de Quiaex I (QxI) y se incubó a 50-55°C hasta que se disolvió la agarosa. A continuación se centrifugó en una picofuga (6 000 rpm aprox.) durante 3 min., eliminando después el sobrenadante y se le agregaron al pellet 180  $\mu$ l de QxI, nuevamente se centrifugó y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó dos veces con 180  $\mu$ l de PE, se centrifugó en la picofuga durante 3 min, y se eliminó el sobrenadante. El pellet se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Se centrifugó a 6 000 rpm/3-5 min, y el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo.

## SECUENCIACIÓN DE DNA

Para este método se utilizó el "Kit" comercial "*Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*" de Perkin-Elmer. La reacción y las condiciones de la PCR para secuenciar la *RHVT* se realizaron siguiendo el método de los "dideoxynucleotides" en PCR, el cual consiste en utilizar nucleótidos marcados con diferentes moléculas fluorescentes derivadas de la rodamina, estas reacciones se realizaron como se indican en el instructivo del "Kit". A partir del DNA recuperado se utilizaron para cada reacción 1 - 2  $\mu$ l del oligonucleótido L16140 (10  $\mu$ M), 1 - 3  $\mu$ l de DNA y 2  $\mu$ l de Terminator Ready Reaction Mix. Las condiciones del ciclaje para la PCR de secuencia en el "GeneAmp 9600" se muestran en el siguiente cuadro:

TEMP °C	TIEMPO	CICLOS
96	+ seg	25
50	+ seg	25
60	+ min	25

Para iniciar la limpieza del producto de la PCR se rehidrataron las columnas de Sephadex G-50 con 0.8 ml de H<sub>2</sub>O durante 2 hrs drenando después el H<sub>2</sub>O por centrifugación a 3 000 rpm durante 3 min. La muestra se resuspendió con 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O para llevar a 20  $\mu$ l. Se colocó la muestra en el centro de las columnas y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min, esto con el propósito de eliminar los residuos de la misma reacción de PCR (pe. los oligonucleótidos y los nucleótidos). Lo que se recuperó se liofilizó a 3 000 rpm durante 30 min, a 30 °C. Se resuspendió con 15  $\mu$ l de "Template Suspension Reagent" y se calentó a 100 °C durante 2 min, poniéndola después en hielo. Una vez hecho esto, la muestra de DNA está lista para introducirse en el secuenciador automático de DNA (ABI-PRISM 310, Genetic Analyzer, Perkin-Elmer).

## ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Una vez obtenidas las secuencias se localizaron las mutaciones (cambios de una bases por otra con respecto a la secuencia de referencia la cual pertenece a una línea celular de carcinoma epitelial de cervix humano proveniente de Inglaterra denominada *HeLa*) y se analizaron con el propósito de agrupar las secuencias idénticas en grupos, denominándosele *haplotipo* a cada secuencia diferente. Se calculó la frecuencia de cada haplotipo, la frecuencia de cada mutación aislada, así como la Diversidad Genética. Para calcular la diversidad genética ( $h$ ) en una población con base a los tipos mitocondriales se utilizó la fórmula:

$$h = (1 - \sum x^2) n / (n-1)$$

en donde  $n$  es el tamaño de la muestra y  $x$  es la frecuencia relativa de cada tipo de DNA mitocondrial (Berumen et al 1994). Seguido se realizó una matriz en donde se compararon las diferencias nucleotídicas existentes entre las 72 secuencias. Basándose en estos datos se calculó la PCA entre dos individuos no relacionados genéticamente con la fórmula:

$$PCA = e^{-x}$$

en donde  $x$  es la media del número de diferencias nucleotídicas obtenidas de la comparación de todas las secuencias (Iniss et al. 1990).

Los cálculos obtenidos en este estudio se compararon con los reportados previamente para otras poblaciones y las secuencias del DNAm encontradas en este estudio se compararon con las reportadas previamente en el GENBANK correspondientes para otras poblaciones (ver anexo 2). Para comparar y alinear todas las secuencias se utilizó el programa de computación CLUSTAL V "Multiple Sequence Alignments" de Higgins (1991) y para la obtención de los árboles de relaciones filogenéticas se analizaron las secuencias en el programa PHILLIP (1995) "Genes in

populations” de J. Feldstein. Para la obtención de un árbol que nos mostrara las relaciones genéticas que hay entre las muestras colectadas en este ensayo, se corrieron los haplotipos encontrados, obteniéndose varios árboles según fueron necesarios hasta la obtención de un árbol para este grupo de individuos pertenecientes a la población mestiza mexicana. Seguido se realizó otro árbol que incluye estas muestras junto con las consultadas en el GENBANK con el propósito de obtener así un árbol de relaciones genéticas para la población mundial. Cabe señalar que debido al gran tamaño de las muestras que se requerían para la obtención de este último árbol (351 contando las obtenidas del GENBANK y las de México) fue necesario correr árboles de cada región y de ahí se tomaron muestras de una materia aleatoria con el propósito de que estas muestras representen a las ramas principales de cada región. Para el árbol final se utilizaron 125 secuencias (18 de África, 30 de individuos Caucásicos, 26 pertenecientes al Círculo Polar, 23 de Asia y 28 secuencias de México obtenidas en el presente estudio). Una vez reducido el número de muestras se procedió a correr el árbol que fuera representativo de las diferentes regiones geográficas utilizando los programas de relaciones filogenéticas mencionados con anterioridad.

# **RESULTADOS**



Una vez purificado y cuantificado el DNA se realizaron las PCR para la amplificación de la región *D-LOOP*. obteniéndose fragmentos de 760 pb (figura 3).

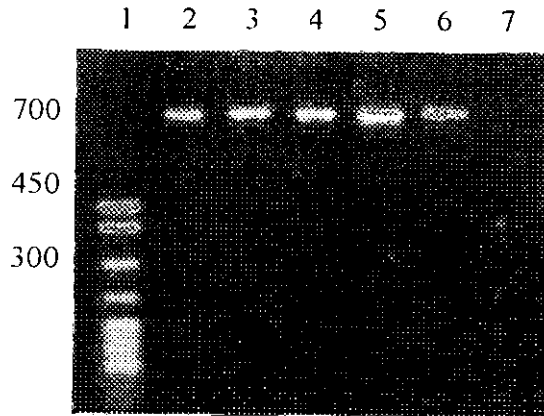


FIGURA 3.- La región *D-LOOP* del DNAm se corrió en los carriles 2, 3, 4, 5 y 6. El carril 1 corresponde al marcador molecular y en el carril 7 se corrió la muestra control sin DNA.

Para cada una de las muestras se secuenciaron 236 pb pertenecientes a la *RHVI*. éstos fragmentos van del sitio 16173 al sitio 16140 según la secuencia de referencia reportada por Anderson et al en 1981 (figura 4).

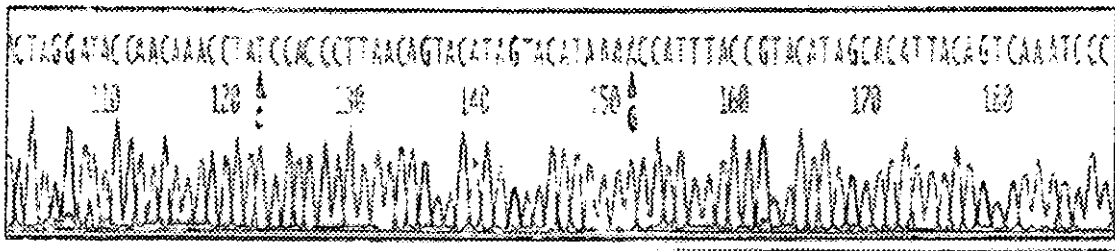


FIGURA 4.- Fragmento de una secuencia obtenida en el presente estudio, en donde se observan con un triángulo los nucleótidos y los lugares en donde ocurrieron las mutaciones con respecto a la secuencia de referencia (Anderson et al 1981)

En los 72 individuos explorados se encontraron 45 haplotipos diferentes observándose cambios en 45 posiciones de la *RH17* del DNAm (tabla 2). De los 45 haplotipos obtenidos, el más frecuente en la población estudiada fue el haplotipo H3 (tabla 2), con una frecuencia de 15.27 % (11/76). Le siguen los haplotipos H34 y H18 con una frecuencia de 6.94 % (5/72) y 5.55 % (4/72) respectivamente. La frecuencia de los haplotipos restantes se muestra en la tabla 2.

El número de posiciones variables por haplotipo varió de 8 nucleótidos en el haplotipo H4 hasta solo una posición variable, en los haplotipos H8, H19 y H44 (tabla 2). En esta muestra estudiada sólo se encontró un individuo con la secuencia idéntica al patrón de referencia (H27). Los sitios nucleotídicos en donde fue más frecuente encontrar cambios fueron los nucleótidos 16223 con 64/72 (20.5 %) mutaciones (T-C), el sitio 16362 con 53 (16.9%) mutaciones (C-T), el sitio 16319 con 46 (14.7 %) mutaciones (A-G), el sitio 16290 con 39 (12.5 %) de mutaciones (T-C) y el sitio 16325 con 20 (6.4 %) de mutaciones (C-T). En los sitios restantes se presentan menos de 10 mutaciones por sitio. La diversidad genética encontrada para la población muestreada fue de 0.96.

Con las secuencias de los 72 individuos se realizó una matriz y se comparó cada una de ellas con el resto de las demás secuencias para investigar las diferencias en el número de nucleótidos por pares de secuencias, obteniéndose 2556 comparaciones. El número de diferencias entre todas las secuencias comparadas varió desde 0 hasta 13 diferencias nucleotídicas por par, encontrándose la mayor frecuencia en 3 nucleótidos (372 pares de secuencias), el resto para cada una de las frecuencias se presenta en la tabla 3. Se encontró que la distribución de las frecuencias de estos datos corresponden a una distribución de Poisson como se observa en la figura 5.

Con los datos observados en la tabla 3 se utilizó la fórmula de distribución de Poisson para calcular la P.C.A. (usando  $\lambda$ =la media del número de mutaciones de los 2556 pares de secuencias), la cual fue de 4.3. Con estos resultados se observó que la probabilidad de que un par de individuos no relacionados sea idéntica en esta región genética es de  $1.2 \times 10^{-3}$  (tabla 4), así tenemos que 12 de cada 1000 individuos tienen secuencia idéntica, es decir, lo cual indica que la



probabilidad de que dos individuos tomados al azar dentro de la población mexicana presenten una secuencia idéntica dentro de esta región, es de 1 cada 83 individuos.

TABLA 3 -Frecuencia de diferencias nucleotídicas

DIFERENCIAS NUCLEOTÍDICAS	FRECUENCIA	"n"
0	86	3.36
1	252	9.85
2	347	13.57
3	372	14.55
4	314	12.28
5	329	12.87
6	348	13.61
7	229	8.95
8	120	4.69
9	89	3.48
10	36	1.40
11	24	0.93
12	8	0.31
13	2	0.07
TOTAL	2556	100

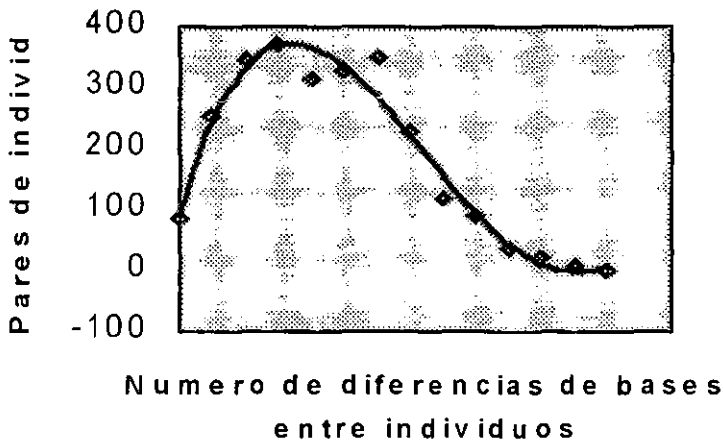


Figura 5 - Diferencias mitocondriales obtenidas de los 2556 pares de individuos, en donde se muestran los individuos observados. La curva está basada en una distribución Poisson con una media de 4.3

## COMPARACION DE LOS HAPLOTIPOS ENCONTRADOS EN ESTE ESTUDIO CON LOS REPORTADOS EN LA LITERATURA.

De los 45 haplotipos observados en este estudio, solamente 5 de ellos ya han sido reportados previamente. Los haplotipos H11, H14, H24 y H28 fueron reportados para la población europea y el haplotipo H21 pertenece a un individuo asiático. Cabe señalar que el haplotipo H28 resultó ser exactamente igual a la secuencia de referencia.

Del GENBANK se obtuvieron 96 secuencias que representan a la región caucasoide (Eu), la cual incluye muestras de individuos de Inglaterra), 77 secuencias provenientes del continente Asiático (As), 47 secuencias de Africa (Af) y 86 secuencias representando a varias poblaciones establecidas en las cercanías al Círculo Polar (Cpol), dentro de las cuales hay individuos pertenecientes a Siberia, Groenlandia, Alaska, Canadá y Norte América (anexo 2). Estas muestras se sumaron a los haplotipos encontrados en México (Mx) obteniéndose un total de 351 secuencias, las cuales se corrieron en el programa computacional de relaciones filogenéticas PHILLIP "Genes in populations" de Joe Felsenstein (1995). Debido al gran número de secuencias no fue posible obtener un árbol que contuviera a todas las muestras obtenidas, por lo que se corrieron por separado árboles para cada una de las regiones geográficas y de ahí se tomaron de manera aleatoria muestras que representaran a las ramas principales de cada árbol. Se procedió a correr el árbol una vez que el número de muestras se redujo de 351 a 125 secuencias, (18 de Africa, 30 de individuos Caucásicos, 26 pertenecientes al círculo Polar, 23 de Asia y 28 secuencias de México obtenidas en el presente estudio). Con estas muestras se obtuvo un árbol para todo el mundo, en el se observan 5 ramas principales, las cuales corresponden a las 5 regiones geográficas mencionadas anteriormente (figura 6).

Los individuos del círculo polar se agrupan en dos subramas principales la primera es una rama cerrada sin mezcla con las demás poblaciones y la segunda presenta mezcla con individuos caucásicos. Los individuos Africanos se agruparon en dos subramas diferentes, una se mezcla con el círculo polar como se mencionó anteriormente y la otra rama se mezcla con individuos

caucásicos. La mayoría de los individuos caucásicos se presentan en un solo grupo sin mezcla con los demás y el resto de los individuos se encuentran diseminados en los grupos mencionados con anterioridad. Los individuos pertenecientes a México se observan como una rama cerrada y sin mezcla con los demás grupos, observándose una estrecha relación con la población asiática, la cual también se presenta como una población cerrada y sin mezcla con las demás poblaciones.

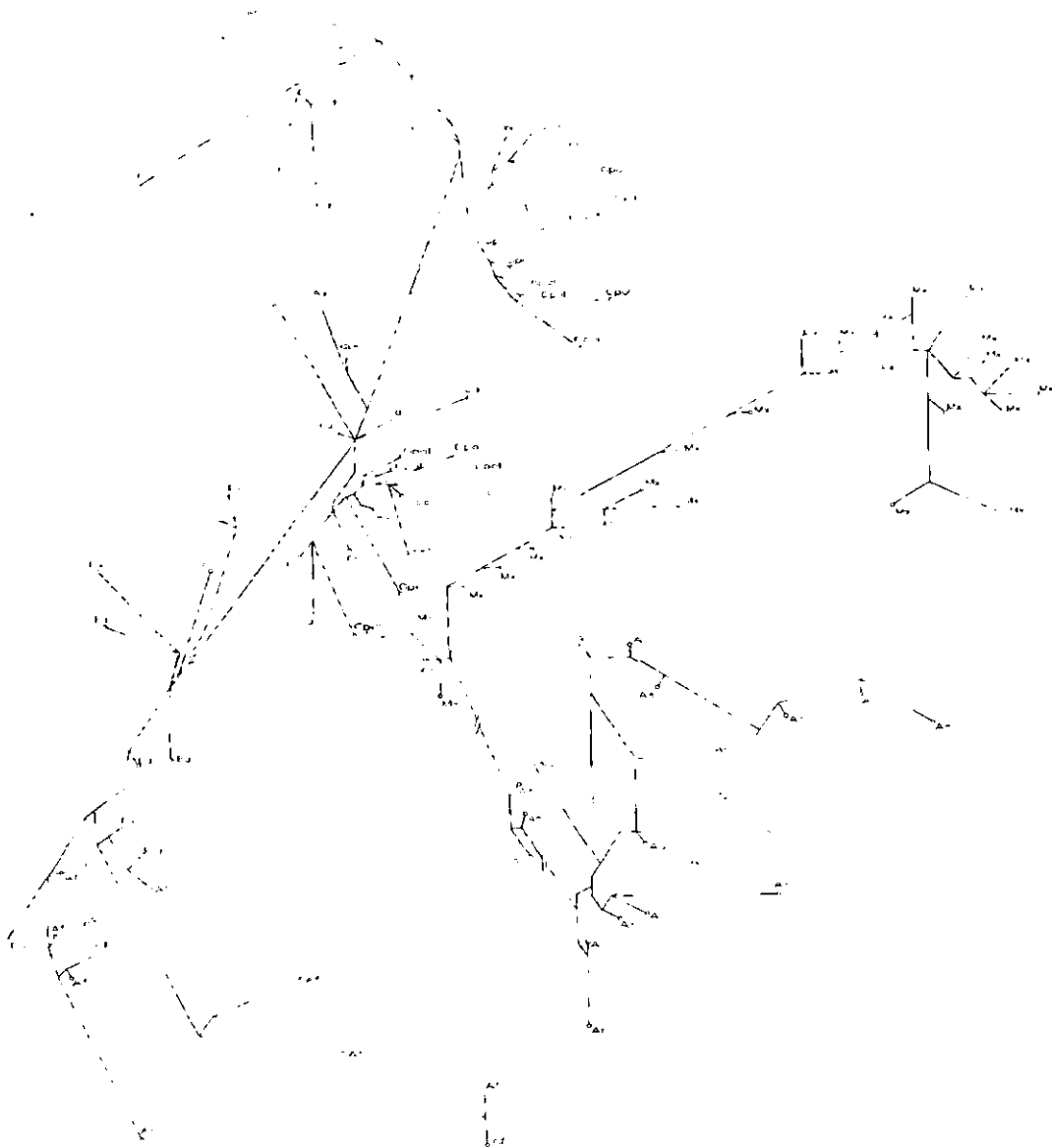


FIGURA 6 - Arbol de relaciones geneticas de DNAm existentes entre los 45 haplotipos obtenidos en el presente estudio y las diferentes poblaciones consultadas (cuyas secuencias fueron obtenidas del GENE BANK). Para la obtencion de las distancias geneticas entre secuencias se utilizo el programa "Genes in populations" de PHILLIP (1995)

# **DISCUSSION**



Este es el primer reporte donde se analiza la diversidad genética de la RHVI del *D-DLOP* del DNA mitocondrial en una población mestiza mexicana. Anteriormente se había realizado un trabajo de secuenciación de esta región mitocondrial para una población de Yucatán, sin embargo el autor no reporta datos de diversidad ni reporta las secuencias encontradas. En la población estudiada se encontraron 45 haplotipos diferentes que corresponden al 62% de las muestras exploradas, un porcentaje similar de haplotipos diferentes se han encontrado en estudios similares para otras partes del mundo (tabla 4). De los 45 haplotipos obtenidos en este estudio, 5 ya han sido reportados previamente en Europa y Asia y se consideran haplotipos de origen caucásico y corresponden al 13% los individuos explorados (tabla 2). Los 40 haplotipos restantes reportados en este trabajo no han sido reportados, aunque son similares a otros reportados previamente de un 97% a un 99%, lo cual indica que difieren de la secuencia reportada desde 1 hasta 7 bases.

El que un haplotipo tenga una frecuencia mayor a los otros, como el haplotipo H3, puede deberse a que esa secuencia sea de las más antiguas del país, y por tanto su presencia y distribución sea mayor, sin embargo no podemos saber con exactitud si es que hay o no, un origen geográfico común, ya que estas secuencias no corresponden a la misma zona geográfica actual y a que el linaje de las muestras no siempre corresponde al estado de la república en el que se muestrearon.

Al compararse el número de haplotipos obtenidos en este estudio con los reportados para otras poblaciones se observa que un estudio multirregional (véase tabla 4), presenta el mayor número de haplotipos con 52 (100%), seguido de Africa con 11 haplotipos (73%). México ocupa el 5to lugar con 45 haplotipos (62%), los demás resultados se presentan en la tabla 4. Como el número de individuos varía de una población a otra, el número de haplotipos se debe al tamaño de la muestra y no necesariamente a una mayor diversidad poblacional. Al comparar estos datos con los reportados para otras poblaciones se observa que la mayor diversidad es para un estudio multirregional con un valor de 1.00 (Stoncking et al 1991), encontrándose México en el segundo lugar. Los demás datos se muestran en la tabla 4.

El resultado obtenido para México es confiable tomando en cuenta que el número de individuos muestreados es mayor al de las demás poblaciones con las que se comparó, a excepción de la Asiática y Europea. Debido a que es el primer trabajo de diversidad mitocondrial en México no se encontró método estadístico alguno para asegurar que el número de individuos aquí estudiados es representativo de la población mexicana. Debido a lo anterior se requiere de la realización de otros estudios similares para esta población, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos y poder calcular así el número mínimo ideal de individuos que se requieren para un estudio de este tipo. Aún así, los resultados en este estudio se cree que son confiables debido a que el número de muestra aquí analizada es mayor al de otros trabajos reportados en otras poblaciones (Tabla 4). Con estos datos pudiera parecer que la población mexicana tiene un número de mutaciones elevado, solamente superado por Asia y un estudio multirregional. Sin embargo hay que considerar que lo reportado en Asia se basa en el estudio de 293 individuos (Horai y Hayasaka 1996).

**Tabla 4.- Resultados de diversidad genética <sup>1</sup>**

REGIÓN GEOGRÁFICA	n	DIVERSIDAD GENÉTICA	POSICIONES VARIABLES	HAPLOTIPOS O LINAJES	% DE HAPL.	P C A (%)	REFERENCIA
Asia	293	-	83	207	70.6	-	Horai y Hayasaka 1996
Círculo Polar <sup>2</sup>	56	-	27	33	58.9	-	Shields <i>et al.</i> , 1993
Pob. Nat de A. <sup>3</sup>	65	-	40	42	64.6	-	Forroni <i>et al.</i> , 1993
Pob. Nat de A. <sup>3</sup>	63	0.95	26	28	44.4	6.1	Ward <i>et al.</i> , 1991
Multirregional <sup>4</sup>	52	1.00	57	52	100	4.4	Stoneking <i>et al.</i> , 1991
Europa	87	-	-	-	-	-	Di Rienzo <i>et al.</i> , 1991
Africa	15	0.93	18	11	73	0.13	Vigilant <i>et al.</i> , 1991
México <sup>5</sup>	72	0.96	45	45	62	0.012	Berumen y González 2000

<sup>1</sup> En esta tabla se presentan los datos reportados para diferentes zonas geográficas.

<sup>2</sup> Comprende muestras tomadas de Alaska, Siberia, Groenlandia y Norte América.

<sup>3</sup> Poblaciones nativas de América del Norte.

<sup>4</sup> Comprende muestras tomadas de África, Asia, Europa, Japón y México.

<sup>5</sup> Estos datos corresponden a el presente estudio

Con respecto al número de mutaciones por sitio dentro de la secuencia sólo se puede señalar que estos sitios presentan una tasa de mutación mayor a los demás sin saber la causa de estas diferencias en cuanto a las tasas de mutación. Para estudios posteriores de antropología y evolución esta información es importante, ya que obteniendo las tasas de mutación por sitio dentro de esta región mitocondrial, se pueden realizar árboles de relaciones filogenéticas calculando tiempos de divergencia genética entre dos o más muestras. Al compararse el número de mutaciones obtenidos con los reportados para otras poblaciones (tabla 4) se observa que Asia presenta el mayor número de mutaciones (83), seguido de un estudio multirregional y México, con 57 y 45 mutaciones respectivamente. El resto de los datos se muestran en la tabla 4.

La diversidad poblacional de México no se puede comparar con la de otras poblaciones ya que el número de individuos muestreados varía de un estudio a otro, por lo que en el presente estudio solo se reportan los valores (tabla 4). El resultado obtenido para México es confiable tomando en cuenta que el número de individuos muestreados es mayor al de las demás poblaciones con las que se comparó, excepto al estudio en Asia y Europa, pero aún con lo anterior, se observa que la población mexicana presenta una diversidad intrapoblacional alta con un 0.96.

La PCA observada para México en el presente estudio, al igual que la diversidad genética, no se puede comparar con la de otras poblaciones ya que el número de individuos muestreados varía de un estudio a otro, por lo que en el presente estudio solo se reportan los valores (tabla 4).

El que el 91 % de las secuencias muestreadas para México en el presente estudio no estén reportadas por otros autores, puede tener varias explicaciones. La razón principal radica en que éste es el único estudio que se ha realizado en México de diversidad genética utilizando el DNA mitocondrial como marcador molecular, por lo que es de esperarse que se encuentren haplotipos diferentes a los reportados para otras regiones geográficas. Se puede deber también en gran medida a lo reducido del muestreo y otra razón, aunque poco probable, pudiera ser el que quizás ya paso suficiente tiempo de divergencia evolutiva entre las secuencias y por tanto ya ocurrieron tantas mutaciones que ahora estos haplotipos son diferentes. Sin embargo esto es solo una sugerencia, ya que tendría que haber suficientes pruebas de evolución mitocondrial y de

migraciones humanas, que afirmaran cabalmente cuales son las poblaciones que dieron origen a la población mexicana. El que se encuentren haplotipos en México ya reportados para otras poblaciones se puede deber a las migraciones de la familia de cada individuo, y esto se sustenta por los apellidos de los mismos (anexo 1).

Se obtuvo un árbol de relaciones filogenéticas para la población mexicana, y aunque se observaron ramas bien definidas no se observa que éstas guarden una relación con respecto a los lugares de procedencia de las muestras. Esto se cree que se deba a que los ancestros de los individuos (padres, abuelos, etc.) no pertenecían a los lugares en donde nacieron las personas que se muestrearon para este estudio, es decir, que los ancestros emigraron de diferentes estados de la república mexicana y por lo tanto, los tipos de DNA mitocondrial pertenecen al lugar de origen y no al lugar del muestreo. Desgraciadamente para este estudio no se tienen los datos de ancestría de los individuos, por lo cual, no hay manera de explicar las relaciones de parentesco existentes entre estas personas. Debido a lo anterior no se muestra el árbol filogenético obtenido para la población mexicana.

En la figura 6 se muestra el árbol obtenido para la población humana de diferentes regiones geográficas en el cual se observan 5 ramas principales. En este árbol en general sí se observa una correspondencia de las muestras con respecto a su lugar de procedencia, sin embargo es difícil explicar los orígenes de estas relaciones debido a que las muestras obtenidas del GENBANK solo indican el continente al que pertenecen pero no a la región específica de su procedencia. El que en una de las ramas en donde se agrupan los individuos del círculo polar se encuentren individuos caucásicos se puede deber a que las muestras caucásicas fueron tomadas muy al norte de Europa perteneciendo por tanto al círculo polar o a migraciones de los ancestros de estos individuos.

Según el mapa se infiere que los individuos africanos se presentan como dos poblaciones diferentes, una de ellas se presenta relacionada con individuos del Círculo Polar y la otra presenta una estrecha relación con los individuos caucásicos. Estas relaciones se cree que se deban a que en las poblaciones muestreadas hay descendientes de individuos del hemisferio norte que migraron hacia el continente africano o viceversa.

Las muestras obtenidas del continente europeo se observan como dos poblaciones diferentes, ya que una está relacionada con la población africana y la otra está íntimamente relacionada con las muestras pertenecientes al círculo polar. Las muestras relacionadas con África se deben posiblemente a que los individuos europeos fueron muestreados al sur del continente por lo que guardan cierta cercanía geográfica, y podría suponerse que genética, con el continente africano. El que otro grupo de muestras guarden relación con el círculo polar se puede deber a que quizás éstas sean nativas del norte de Europa por lo que también pertenecen al círculo polar, a que los ancestros de estos individuos migraron hacia el norte o a que ancestros del norte emigraron hacia el sur.

Las muestras provenientes de Asia se presentan como una población sin mezcla con excepción de algunos individuos encontrados en el grupo del círculo polar. Esto se puede deber a que las muestras fueron tomadas de una región muy al norte de Asia perteneciendo por tanto al hemisferio norte o a migraciones hacia el sur de Asia de ancestros del círculo polar.

La rama perteneciente a la población mexicana, a pesar de presentar una diversidad intrapoblacional grande, sugiere que es una población sin mezcla con otras poblaciones, es decir, que las mutaciones que se presentan dentro de los individuos solo son características de la población mexicana. El que un individuo mexicano presentara una secuencia igual a la de referencia, se debe a que este individuo descendiente de Europa, explicándose esto por los apellidos del mismo. Se observa que la población mexicana está más relacionada con Asia que con el resto de las poblaciones. Se cree que esto se deba a que estas dos poblaciones tienen un ancestro común, y de ser así, esta información puede ser tomada para apoyar ciertas teorías de migración humana.

## CONCLUSIONES

- La población mexicana es muy heterogénea, observándose una diversidad poblacional de 0,96
- Debido a el bajo poder de discriminación que el DNAm presentó en el presente estudio, ésta información se puede utilizar como marcador molecular en las áreas forenses sólo en casos de exclusión, debiéndose utilizar con otros marcadores para aumentar así el poder de discriminación.
- La población mexicana esta más emparentada con la asiática que con el resto de las poblaciones comparadas.

## RECOMENDACIONES

Si se quiere obtener información más confiable con respecto a la diversidad y al origen de las poblaciones, se deben realizar muestreos a un mayor numero de individuos, recabar la información acerca de la ancestría de cada individuo, además de reportar el origen de cada población a una escala regional y no solo al nivel de país o continente.

## ANEXO 1.- LISTA DE INDIVIDUOS EXPLORADOS

NOMBRE	SEXO	EDAD	PROCEDENCIA	CLAVE
VALADEZ VALLES ERICK	M	19	BAJA CALIFORNIA SUR	81
SANCHEZ SANTANA JOSE	M	18	BAJA CALIFORNIA SUR	52
PACHECO MARCO ANTONIO	M	20	CAMPECHE	79
RODRIGUEZ SALCEDO GABRIEL	M	20	COLIMA	15
RODRIGUEZ GARCIA HECTOR	M	19	CHIAPAS	3
PEREGRINO PERERA ASTRO	M	20	CHIHUAHUA	61
VELOZ G. FEDERICO	M	21	DURANDO	55
ESTRADA C. CARLOS	M	19	EDO. DE MEXICO	64
THOME ORTIZ LAURA	F	18	EDO. DE MEXICO	8
MILLAN SANCHEZ SANDRA	F	18	EDO. DE MEXICO	38
DURAN GARCIA EDGAR	M	18	EDO. DE MEXICO	40
GUADARRAMA C. MIGUEL	M	19	EL SALVADOR	60
HERNANDEZ E. OVIDIO	M	19	GUANAJUATO	84
NAVARRO ESTRADA GABRIELA	F	21	GUANAJUATO	73
NIETO AGUILAR VERONICA	F	18	GUANAJUATO	20
MONTES BECERRA RUTH	F	21	GUANAJUATO	21
HARO BRAVO LUIS	M	19	GUANAJUATO	23
TOVAR RAMIREZ REYNA	F	20	GUANAJUATO	74
HERNANDEZ PATILLO ALEJANDRA	F	18	GUANAJUATO	7
PATIRO SALAZAR JORGE	M	20	GUANAJUATO	16
VALDEZ BETANCOURT MIGUEL	M	18	GUANAJUATO	69
MOSQUEDA M. JOSE	M	20	GUANAJUATO	72
TORRES R. MAURICIO	M	20	GUANAJUATO	8
SANCHEZ FERNANDEZ G.	F	21	GUANAJUATO	18
GONZALEZ COLUNGA JUAN	M	19	GUANAJUATO	32
NAVARRETE SIERRA CATALINA	F	21	GUANAJUATO	37
FLORES HERRERA NESTOR	M	20	GUANAJUATO	39
TALAVERA H. OMAR	M	18	GUANAJUATO	57
HERRERA GOMEZ MARLI	F	20	GUERRERO	19
DE LA CRUZ HONORATO EDUARDO	M	18	GUERRERO	62
DE JESUS RAMIREZ JANET	F	18	GUERRERO	78
HERNANDEZ FLORES ISABEL	F	19	GUERRERO	86
RUIZ SALGADO KARLA	F	18	GUERRERO	87
NUNEZ CANTU OLIVER	M	19	GUERRERO	33
DE LA FUENTE SEDANO SALVADOR	M	19	JALISCO	85
ROSAS H. MARCO TULIO	M	21	JALISCO	50
ANGELES MARTINEZ ADAN	M	19	MEXICO D.F.	6
APARIERO OSORIO MARGARITA	F	23	MEXICO D.F.	14
TELLEZ GALICIA DANIA	F	21	MEXICO D.F.	17
MUNOZ MONROY OMAR	M	18	MEXICO D.F.	24
VITE TORRES BERENICE	F	19	MEXICO D.F.	68
SOSA JUAREZ ALEJANDRO	M	19	MEXICO D.F.	71
MONSIVAI RIOS RICARDO	M	21	MEXICO D.F.	46
REYES PONCE DE LEON LORENA	F	19	MEXICO D.F.	48
SANTILLAN PEREZ MARIA	F	21	MEXICO D.F.	49
MENDOZA BETANCOURT CLAUDIO	M	18	MICHOACAN	12

ANEXO 1. CONTINUACION

NOMBRE	SEXO	EDAD	PROCEDENCIA	CLAVE
GANDARA CALDERON JULIAN	M	21	MICHOACAN	30
FRIAS AGUIRRE YZA	F	18	MORELOS	28
LOPEZ MONTES CONSUELO	F	19	MORELOS	11
MARTINEZ DUNKER IVAN	M	18	MORELOS	51
ALVARADO G. JOSE LUIS	M	19	OAXACA	65
SOLORZANO GUERRA ARMANDO	M	19	OAXACA	67
MORA MENDOZA ISABEL	F	20	OAXACA	54
NONO NAJERA WILLIAMS	M	18	SAN LUIS POTOSI	63
BANDA LARA MARIO	M	19	SAN LUIS POTOSI	44
ANGULO CASTRO EDGARDO	M	19	SINALOA	43
VARGAS G. BERNARDO	M	21	SINALOA	56
PADILLA GALLEGOS OMAR	M	17	TAMAULIPAS	47
PERES RIVERA MAYRA	F	19	TAMAULIPAS	53
CARRO GARCIA ALEJANDRO	M	18	TLAXCALA	66
CHAVARIN SAN ROMAN JOSE	M	20	VERACRUZ	5
HERRERA RODRIGUEZ GUADALUPE	F	20	VERACRUZ	13
PESTANA TRONCO REYNA	F	18	VERACRUZ	29
FERNANDEZ CORDOBA VERONICA	F	19	VERACRUZ	34
LARRACILLA S. IVANHRE	M	18	VERACRUZ	45
MARTINEZ ROSENDO DAVID	M	19	VERACRUZ	58
CAMPOS R. EUNICE	F	19	VERACRUZ	59
MAY CANUL BRENDY ROSELY	F	18	YUCATAN	9
ARTEAGA COVARRUBIAS RAFAEL	M	18	ZACATECAS	26
DESCONOCIDO	?	?	?	36
DESCONOCIDO	?	?	?	41
DESCONOCIDO	?	?	?	42



**ANEXO 2. CLAVE Y NUMERO DE MUESTRAS DE DNA<sub>m</sub> PERTENECIENTES A REGIONES GEOGRAFICAS EXTRAIDAS DEL GENE BANK<sup>1</sup>.**

ASIA (n=77)		AFRICA (n=47)	C. POLAR <sup>2</sup> (n=26)		CAUCASICO <sup>3</sup> (n=26)	
D84742	M76237	M76250	L20183	L20184	REF <sup>o</sup>	M58092
D82741	M76242	M76293	L20210	L20185	M58083	M58089
D84733	M76243	M76248	L20180	L20186	M58082	M58125
D84750	M28901	M76249	L20211	L20197	M58088	M58121
D84729	M76244	M76258	L20209	M76009	M58064	M58123
D84726	M76245	M76270	L20213	M76010	M58072	M58136
D84730	M76241	M76339	L20206	L20187	M58077	M58091
D84734	M76246	M76254	L20207	L20189	M58086	M58142
D34744	M76238	M76307	M76017	L20208	M58066	M58143
D84748	M76239	M76298	L20195	L20204	M58065	M58110
D84745	M76240	M76261	M76018	L20205	M58068	M58144
D84727	M76236	M76262	L20196	M76006	M58073	M58129
D84732	M76235	M76263	L20193	M76007	M58081	M58140
D84736	M28893	M76259	L20194	L20165	M58074	M58099
D84737	M28909	M76268	L20212	L20202	M58075	M58116
D84738	M28911	M76283	M76001	L20175	M58087	M58117
D84739	M28903	M76267	L20164	L20176	M58061	M58130
D84752	M28905	M76294	M75999	L20173	M58084	M58107
D84753	M76247	M76334	M75998	M76012	M58071	M58113
D84723	M28907	M76291	L20167	L20192	M58076	M58114
D84724	M28899	M76285	M76000	L20181	M58062	M58139
D84728	M28895	M76338	M75995	L20182	M58069	M58098
D84740	M28898	M76253	L20159	M75991	M58067	M58100
D84743	M28910	M76256	L20169	M75992	M58070	M58096
D84746	M28894	M76251	L20160	M75993	M58058	M58090
D84749	M28902	M76252	L20179	M75994	M58059	M58126
D84725	M28904	M76337	L20161	L20200	M58063	M58138
D84735	M28896	M76340	L20174	L20201	M58079	M58108
D84731	M28912	M76336	L20177	M76013	M58060	M58131
D84747	M28906	M76303	L20172	M76016	M58080	M58104
D84751	M28908	M76304	L20188	M76014	M58078	M58132
	M28900	M76257	L20170	M76015	M58085	M58106
	M76320	M76260	L20162	L20190	M58111	M58120
	M76329	M76266	L20157	L20191	M58124	M58128
	M76308	M76272	L20166	L20178	M58133	M58127
	M76292	M76273	L20168	L20199	M58102	M58103
	M76326	M76280	M76004	L20198	M58122	M58094
	M76309	M76277	M76005	M76311	M58109	M58101
	M76314	M76278	M76002		M58118	M76335
	M76315	M76275	M76003		M58093	M76333
	M76331	M76279	L20171		M58097	M76328
	M76342	M76276	M75996		M58115	M76330
	M76313	M76281	L20203		M58119	M76348
	M76346	M76274	M75997		M58141	M76351
	M76355	M76282	L20163		M58112	M76349
	M76360	M76302	L29158		M58135	M76352
		M76271	M76008		M58095	M76353
			M76011		M58137	M58134
					M58105	

<sup>1</sup> Estas muestras se reportaron como pertenecientes a todo el continente, sin especificar región.

<sup>2</sup> Muestras tomas de Alaska, Siberia, Groelandia y Norte America.

<sup>3</sup> Muestras pertenecientes al Norte de Europa.

<sup>o</sup> La secuencia de referencia se coloca en esta columna ya que pertenece a la población europea.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anderson S, Bankier A T, Barrell b G, de Bruijn M. H. L., Coulson A R, Drouin J, Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R. and Young I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
2. Bailliet G., Rothhammer F., Carnese F. R., Bravi C. M. and Bianchi N. O. Founder Mitochondrial Haplotypes in Amerindian Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 27-33
3. Bendall K. E. and Sykes B. C. 1995 Length Heteroplasmy in the First Hypervariable segment of the human mtDNA Control region. *Am. J. Hum. Genet.* 57: 248-256
4. Bentlage HA, Janssen AJ, Chomyn A, Attardi G, Walker JE, Schagger H, Sengers RC, Trijbels FJ 1995 Multiple deficiencies of mitochondrial DNA- and nuclear-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase detected with peptide- and subunit-specific antibodies in mitochondrial myopathies. *Biochim Biophys Acta.* Mar 8:1234(1):63-73
5. Berumen C. J. 1993 El análisis del ácido desoxirribonucleico –ADN- en la identificación de individuos. *Ciencia y Desarrollo* 111. Pp. 34-41
6. Berumen C. J., Casas A. L., Hernández M. A., Segura s. E., Medina L. R. y Larriva S. J. 1994 Diversidad genética de tres sondas de DNA en la huella digital de DNA de una población Mexicana. *Rev. Invest. Clin.* 46:457-64.
7. Berumen C. J., Juárez T. E. 1999. Identificación de individuos mediante el análisis del DNA. *Genética y Biomedicina Molecular.* Cap. 14. Ed Limusa. Madrid.
8. Bouzidi MF, Poyau A, Godinot C. 1998 Co-existence of high levels of a cytochrome b mutation and of a tandem 200 bp duplication in the D-loop of muscle human mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* Mar;7(3):385-91
9. Budowle B., Wilson M.R., DiZinno J.A., Stauffer C., Fasano M.A., Holland M.M. and Monson K.L. 1999 Mitochondrial DNA Regions HV1 and HVII Population Data. *Forensic Science International.* June 1999

ESTABLECIMIENTO CALLES  
DE LA UNIVERSIDAD

10. Cann R. L., Stoneking M. and Wilson A. C. 1987 Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Nature*. Vol. 325 (1): 31-36.
11. Cohen J. E. 1990 DNA Fingerprinting for Forensic Identification: Potential Effects on Data Interpretation of Subpopulation Heterogeneity and Band Number Variability. *Am J Hum. Genet.* 46: 358-368
12. Crews S., Ojala D., Posakony J., Nishiguchi and Attardi G. 1979. Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature* 277: 192-198.
13. Frayer, Wolpoff, Thorne, Smith, Pope. 1993 Theories of modern Human Origins: The paleontological test. *American Anthropologist*. Vol. 95, No. 1. Pp.14-50.
14. GENBANK Human Mitochondrial DNA "Cambridge" Sequence. Accession #J0141 View double-stranded version
15. Gill P., Jeffreys A. J. and Werrwtt D. J. 1985 Forensic application of DNA 'fingerprints'. *NATURE* Vo. 318 (12): 577-579
16. Gill P., Ivanov P. L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E. and Sullivan K. 1994 Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 1994 Feb;6(2):130-5
17. Ginther C., Corach D., Penacino G. A., Rey J. A., Carnesse F. R., Hutz M. H., Anderson A., Just J., Salzano F. M. and King M.-C. 1993 Genetic variation among the Mapuche Indians from the Patagonian region of Argentina: Mitochondrial DNA sequence variation and allele frequencies of several nuclear genes. In *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Pena S. D. J., Chakraborty R., Eppelen J. T. and Jeffreys A. J. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. Switzerland. Pp. 211-220
18. Graven L., Passarino G., Semino O., Boursot P., Santachiara-Benerecetti S., Langaney A., Excoffier L. 1995 Evolutionary correlation between control region sequence and restriction polymorphisms in the mitochondrial genome of a large Senegalese Mandenka sample. *Mol Biol Evol* Mar;12(2):334-45

19. Gray M. W., Burger G., Franz L. B. 1999 Mitochondrial Evolution *SCIENCE* 283
20. Handt O., Richards M., Trommsdorff M., Kilger C., Simanainen J., Georgiev O., Bauer K., Stone A., Hedges R., Schaffner W., et al. 1994 Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man *Science* Jun 17;264(5166):1775-8
21. Hauswirth WW, Dickel CD, Rowold DJ, Hauswirth MA 1994 Inter- and intrapopulation studies of ancient humans *Experientia* Jun 15;50(6):585-91
22. Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T. 1992 Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* Dec 15;189(2):979-85
23. Holland M.M. 1993 The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Legal Med* 1993;106(2):85-90
24. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, Weeden VW. 1993 Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sci* May;38(3):542-53
25. Horai S. and Hayasaka K. 1990. Intraspecific Nucleotide Sequence Difference in the Major Noncoding Region of Human Mitochondrial DNA. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 828-842.
26. Howell N, Kubačka I. and Mackey D. A. 1996 How Rapidly Does the Human Mitochondrial Genome Evolve? *Am. J. Hum. Genet.* 59: 501-509.
27. Innis M., Gelfand D., Snisky J. and White T. 1990. PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic press. U.S.A. 458 pp.
28. Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R. K., Holland M. M., Weeden V. W. and Parsons T. J. 1996 Mitochondrial DNA Sequence Heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov Establishes the Authenticity of the Remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genetics*. 12. pp. 417-420.
29. J. A. J. Gowlett 1987 The coming of modern man. *Antiquity*. No. 61 Oxford University Press. England. Pp 210-219.

30. Jeffreys A. J., Wilson V. and Thein S. L. 1985 **Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.** *Nature*. Vol. 314 (7) 67-73
31. Jeffreys A. J. and Pena S. D. J. 1993 **Brief introduction to human DNA fingerprinting.** In *DNA Fingerprinting: State of the Science* Pena S. D. J., Chakraborty R., Epplen J. T. and Jeffreys A. J. Library of Congress Catalog-in-Publication Data. Switzerland. Pp. 1-20
32. Kurosaki K., Matsushita T. and Ueda S. 1993 **Individual DNA identification from ancient human remains.** *Am J Hum Genet* 1993 Sep;53(3):638-43
33. Lee S. D., Shin C. H., Kim K. B., Lee Y. S. and Lee J. B. 1997 **Sequence Variation of mitochondrial DNA control region in Koreans.** *Forensic Sci Int* 1997 Jun 6;87(2):99-116
34. Lisker R. 1981 **Estructura genética de la población Mexicana. Aspectos médicos y antropológicos.** Salvat Biblioteca Médica Mexicana. México 158p.
35. Lisker R., Perez B., Granados J., Babinsky V., De Rubens S. A. and Buentello L. 1986. **Gene Frequencies and Admixture in a Mexico City Population.** *Am. J. Physic. Anthropol.* 71: 203-207
36. Lisker R., Ramirez E., Perez B., Granados J. and Babinsky V. 1990 **Gene Frequencies and Admixture Estimates in Four Mexican Urban Centers.** *Human Biology*. Dec. vol. 62. No. 6. pp. 701-801.
37. Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Guida V., Scozzari R., Bonne-Tamir B., Sykes B. and Torroni A. 1999 **The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs.** *Am J Hum Genet* 1999 Jan;64(1):232-249
38. Maniatis T., Sambrook J. and Fritsch E. F. 1989 **Molecular Cloning. A laboratory manual.** Second Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
39. Melton T., Wilson M., Batzer M. and Stoncking M. 1997 **Extent of heterogeneity in Mitochondrial DNA of European Populations.** *Journal of Forensic Science* 42(3): 437-446

40. Melton T., Ginter C., Sensabaugh G., Soodyall H. and Stoneking M. 1997 **Extent of heterogeneity in Mitochondrial DNA of Sub-Saharan African Populations.** *Journal of Forensic Science* 42(4): 582-592
41. Merriwether D. A., Clark A. G., Ballinger S. W., Schurr T. G., Soodyall H., Jenkins T., Sherry S. T. and Wallace D. C. **The Structure of Human Mitochondrial DNA Variation.** *J. Mol. Evol.* 33: 543-555
42. Mettler L. E. Gregg T. G. 1978. **Genética de las Poblaciones y Evolución.** Unión Tipográfica Hispano Americana 245 p.
43. MITOMAP: **A Human Mitochondrial Genome Database.** Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA [http://www/gen.emory.edu/mitomap.html](http://www.gen.emory.edu/mitomap.html) 1999.
44. Montoya J. y Attardi G. 1986. **ADN mitocondrial humano.** *Investigación y Ciencia*, Junio, pp. 60-69
45. Mountain J. L., Hebert J. M., Bhattacharyya S., Underhill P. A., Ottolenghi C., Gadgil M. y Cavalli-Sforza L. L. 1995 **Demographic History of India and mtDNA-Sequence Diversity.** *Am. J. Hum. Genet.* 56: 979-992
46. Norby L. D. 1994 **A new human mtDNA polymorphism: tRNA<sup>Gln</sup>/ 4336 (T-C)** *Clinical genetics* 45: 109-110
47. Pai CY, Chou SL, Tang TK, Wei YH, Yang CH. 1997 **Haplotyping of mitochondrial DNA in the D-loop region by PCR: forensic application.** *J Formos Med Assoc* Feb;96(2):73-82
48. Parson W., Parsons T.J., Scheithauer R. and Holland M. M. 1998 **Population Data for 101 Austrian Caucasian Mitochondrial D-Loop Sequences: Application of MtDNA Sequence Analysis to a Forensic Case.** *The International Journal of Legal Medicine.* 111, pp. 124-132
49. Parsons T. J., Muniec D.S., Sullivan K., Woodyatt N., Alliston-Greiner R., Wilson M. R., Berry D. L., Holland K. A., Weeden V. W., Gill P. and Holland M. M. 1997 **A High Observed Substitution Rate in the Human Mitochondrial DNA Control Region.** *Nature Genetics.* 15, pp 363-368.

50. Piercy R, Sullivan KM, Benson N and Gill P 1993 The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification *Int J Legal Med* 1993;106(2):85-90
51. Reinods R., Sensabaugh G 1991. Analysis of genetic markers in forensic DNA samples using the Polimerase Chain Reaction. *Analytical Chemistry* 63 (1): 1-15.
52. Saccone C., Pesole G. and Sbisá E. 1991 The Main Regulatory of Mammalian Mitochondrial DNA: Structure-Funtion Model and Evolutionary Pattern. *J. Mol. Evol.* 33: 83-91
53. Saccone, Pesole, Shisá, Preparata. 1992. Human Evolution. Vol. 7, No. 2, pp.37-46
54. Salamanca F. y Armendarés S. 1996. Estudios sobre Genética Antropológica en México. En *La Antropología Física en México*. Estudios sobre la población antigua y contemporánea. UNAM. pp. 351-359
55. Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Vol. II., cap. 14.
56. Sbisá E., Tanzariello F., Reyes A, Pesole G. and Saccone C. 1997 Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 1997 Dec 31:205(1-2):125-40
57. Seo Y., Stradmann-Bellinghausen B., Rittner C., Takahama K. and Schneider P. M. 1998 Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. *Forensic Sci Int* 1998 Nov 9;97(2-3):155-64
58. Shields G. F., Schmiechen A. M., Frazier B. L., Reed A., Voevoda M. I., Reed J. K. and Ward R. H. 1993. MtDNA Secuences Suggest a Recent Evolutionary Divergence for Beringian and Northern North American Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 549-562.
59. Steighner R.J. and Holland M M 1998 Amplification and Sequencing of Mitochondrial DNA in Forensic Casework *Methods in Molecular Biology: Forensic DNA profiling Protocols*. 98. pp 213-224

- 60 Stone A. C. And Stoneking M. 1993 Ancient DNA from a Pre-Columbian Amerindian Population *American Journal of Physical Anthropology* 92: 463-471
- 61 Stoneking M., Hedgecock D., Higuchi R. G., Vigilant L and Elrich H. A. 1991. Population Variation of Human mtDNA Control Region Sequences Detected by Enzymatic Amplification and Sequence-specific Oligonucleotide Probes. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 370-382.
- 62 Stoneking M., Melton T., Nott J., Barritt S., Roby R., Holland M., Weedn V.W., Gill P., Kimpton C., Aliston-Griener R. and Sullivan K. 1995 Establishing the Identity of Anna Anderson Manahan *Nature Genetics*, 9 (1): 9-10.
63. Szibor R. Michael M. Spitsyn VA. Plate I. Ginter EK. Krause D. 1997 Mitochondrial D-loop 3' (CA)n repeat polymorphism: optimization of analysis and population data. *Electrophoresis* Dec;18(15):2857-60
64. Takeda N. 1997 Cardiomyopathies and mitochondrial DNA mutations. *Mol Cell Biochem* Nov;176(1-2):287-90
65. Templeton A. R. 1993. The "Eve" Hypotheses: A genetic Critique and Reanalysis. *American Anthropologist* 95 (1): 51-72
- 66 Thorne A. G. and Wolpoff M. H. 1992 Evolución multirregional de los humanos. *Investigación y Ciencia*. Junio. pp. 14-20
67. Torroni A., Sukernik R. I., Schurr T. G., Starikovskaya Y. B., Cabell M. F., Crawford M. H., Comuzzie A. G. and Wallace D. 1993 mtDNA Variation of Aboriginal Siberians Reveals Distinct Genetic Affinities with Native Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 591-608
68. Torroni A., Schurr T. G., Cabell M. F., Brown M. D., Neel J. V., Larsen M, Smith D. G., Vullo C. M. and Wallace D. 1993 Asian Affinities and Continental Radiation of the Four Founding Native American mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 563-590
- 69 Torroni A., chen Y., Semino O., Santachiara-Beneceretti A. S., Scott C. R., Lott M. T., Winter M. and Wallace D. C. 1994 mt DNA and Y-Chromosome Polymorphisms in four Native American Populations from Southern Mexico. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 303-318



70. Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC 1994 mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *Am J Hum Genet* 1994 Oct;55(4):760-76
71. Valverde M. E. y Paredes L. O. 1996. El uso de marcadores moleculares en el estudio de la biodiversidad. El caso de los Hongos. *Ciencia y Desarrollo*. 128: 28-37.
72. Vargas S. R. Y Sánchez R. A. 1982. Material genético de restos óseos humanos. *Estudios de Antropología Biológica*. UNAM. pp: 219-242
73. Vargas S. R. y Enriquez M. C. 1996. Estudios de antropología molecular en esqueletos prehispánicos: huellas digitales de ADN. *La Antropología Física en Mexico*. I.I.A. UNAM. pp: 195-214.
74. Vigilant L., Pennington R., Harpending H., Kocher T. D. and Wilson A. C. 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 9350-9354.
75. Ville C. A. 1981. BIOLOGIA. 7a. Ed. Mexico. Pp.797.
76. Wallace D. C. 1994 Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci. USA*. Vol 91. pp. 8739-8746. September 1994
77. Wallace D. C. 1997 Función normal y patológica del ADN mitocondrial. *Investigación y Ciencia*. Octubre. Pp. 12-20.
78. Ward R. H., Frazier B. L., Dew-Jager K. and Paabo S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 8720-8724.
79. Weedn V.W. 1993 Where Did This Come From: Identification of Sample Mix-ups by DNA Testing *Am J Clin Path.* 100 (6): 592-593
80. Weber J. L. and May P. E. 1989. Abundant Class of Human DNA Polimorfisms Which Can Be Typed Using the Polimerase Chain Reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396.

81. Willard. JP Ross. DE Katz. MM Holland 1999 The Use of DNA Analysis in the Identification and Re-association of Remains Recovered from TWA Flight 800 and KAL Flight 801. The 6th Indo Pacific Congress on Legal Medicine and Forensic Sciences. INPALMS-1998-KOBE. Yoshitsugu Tatsuno (ed.). pp. 249-252
82. Wilson A. C. y Cann R. L. 1992 Origen africano reciente de los humanos. *Investigación y Ciencia*. junio. pp. 8-13
83. Wilson M.R., Stoneking M., Holland M.M., DiZinno J.A. and Budowle B. 1993 Guidelines for the Use of Mitochondrial DNA Sequencing in Forensic Science *Crime Lab Digest*, 20 (4):68-77
84. Zischler H. Geisert H. von Haeseler A. Paabo S. 1995 A nuclear 'fossil' of the mitochondrial D-loop and the origin of modern humans. *Nature* Nov 30:378(6556):489-92