

00381

19

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

ANALISIS DE LOS LINAJES FUNDADORES DEL
DNA MITOCONDRIAL EN LOS RESTOS OSEOS DE
POBLADORES PREHISPANICOS DEL SITIO MAYA
DE XCARET, QUINTANA ROO

299367

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A

BIOL. ANGELICA GONZALEZ OLIVER

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO



COORDINACION
POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS
2001

MEXICO, D F





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

LIBERTAD NACIONAL
AUTONOMIA DE
MEXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de septiembre de 2001, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna GONZALEZ OLIVER ANGELICA con número de cuenta 85078060 y número de expediente 3961612, con la tesis titulada: "ANÁLISIS DE LOS LINAJES FUNDADORES DEL DNA MITOCONDRIAL EN LOS RESTOS ÓSEOS DE POBLADORES PREHISPANICOS DEL SITIO MAYA DE XCARET, QUINTANA ROO.", bajo la dirección del DR. ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO.

Presidente:	Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco
Secretario:	Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno
Vocal:	Dr. Juan Pedro Laclette San Román
Vocal:	Dra. María Alicia González Manjarrez
Vocal:	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente:	Dra. Lourdes Márquez Morfín
Suplente:	Dr. Luis Medrano González

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de noviembre de 2001

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

TODO COMENZÓ ASI



RIUS.

DEDICATORIAS

A mi esposo, por su apoyo y comprensión en mi trayectoria académica, por todo lo aprendido junto a él, y por compartir conmigo esta experiencia.

A mis padres, por el apoyo incondicional que me brindan como su hija y como profesionista, por la fortaleza que tienen y por el amor que se profesan.

A mi familia González- Oliver, mis hermanos, mi hermana Clara, y demás miembros que conforman esta familia, por los momentos felices que hemos pasado juntos. A mis sobrinas (o), por ser tan chistosas.

A mis amigos gurús Guadalupe Zavala, Miguel Angel Alcántara y mi tío Jorge González por los momentos que he compartido con ustedes.

A mi suegrita María del Carmen Varela por brindarme su amistad

A la memoria de Adela Cruz

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfonso Torre Blanco director de esta tesis, por ser un excelente y excepcional maestro, por compartir conmigo sus conocimientos en el área de la Bioquímica. Además, le agradezco su confianza en todo momento para la realización de esta tesis y que me haya hecho participe en la investigación en la Antropología Molecular.

A la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno miembro del comité tutorial, por todo el apoyo, las enseñanzas, los consejos que me brindó durante la realización de esta tesis, y por sus valiosas sugerencias en este manuscrito. Le agradezco que desinteresadamente me proporcionó un entrenamiento técnico y la técnica para extraer el DNA antiguo en su laboratorio.

A la Dra. Annie Pardo Semo miembro del comité tutorial, por su gran apoyo desinteresado que me brindo para que continuara con mis estudios de doctorado. Le agradezco sus consejos y la revisión crítica del manuscrito.

Al Dr. Juan Pedro Laclette San Román por el apoyo desinteresado proporcionado para aprender la técnica de secuenciación manual realizada en su laboratorio. Por proporcionarnos el servicio de secuenciación automática que realiza su laboratorio, por aceptar ser miembro del jurado, por la revisión crítica y sus comentarios a este trabajo.

A las Doctoras Lourdes Márquez Morfin miembro del comité tutorial y Alicia González Manjares, y a los Doctores Luis Felipe Jiménez García y Luis Medrano González por aceptar formar parte del jurado, por la revisión crítica y todas sus sugerencias a este manuscrito.

A la Dra. Lourdes Márquez Morfin y al Antropólogo José Concepción Jiménez por su disposición de proporcionar los restos óseos analizados en este trabajo

Un agradecimiento especial a Alfonso, Guadalupe, Remedios, Lisi, Andrea, Juan, Isabel y Miguel Angel, quienes donaron su sangre para ser analizada. En especial a mi amigo Miguel Angel por sus valiosas enseñanzas.

Agradezco a la M. en C. Patricia de la Torre por su asesoramiento técnico en la secuenciación manual.

Agradezco al próximo Doctor en Ciencias Martín García por realizar la secuenciación automatizada.

Agradezco a el PAEP por el apoyo económico otorgado al presente proyecto de tesis clave 101310.

Agradezco a CONACyT por haberme otorgado la Cátedra Patrimonial de Excelencia Nivel II, para la realización de mis estudios de Posgrado.

A mis compañeros del laboratorio de Bioquímica Remedios, Jorge, Sandra. Al Antropólogo Físico Juan Alberto Román por su disposición a participar en nuestros seminarios y disposición en el préstamo de bibliografía, y en especial a Isabel y Javier quiénes han compartido con Alfonso y conmigo la realización de sus respectivas tesis en la misma área.

A Pedro Ostoia, Celia Caballero, Anita Contreras y Pavel Petrossian del Instituto de Investigaciones Biomédicas con quienes frecuentemente comparto gratos momentos en la comida.

A mis amigos que siempre han estado ahí Carolina Castillo, Lorena López, Javier Sánchez y a Jabel Ramírez que reencontré En especial a mi amiga Palmira Silva, que extraño por estar físicamente lejos.

ÍNDICE

I	RESUMEN.....	1
II	INTRODUCCIÓN.....	4
III	ANTECEDENTES DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	7
	1.1 Los Mayas.....	7
	1.2 Descripción del Sitio: Xcaret, Quintana Roo, México.....	9
	1.3 Aspectos Históricos de Xcaret.....	10
	1.4 Arqueología del Sitio.....	10
	1.4.1 Grupo B.....	11
	1.5 Entierros en Xcaret.....	13
	1.6 La Costa Oriental de Quintana Roo.....	16
	1.7 Características Físicas y Serológicas de los Mayas.....	17
III.2.	Antropología Molecular	18
	2.1 Historia de la identificación del DNA antiguo.....	19
	2.2 La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Antropología Molecular.....	20
	2.3 Secuencias de DNA antiguo vía PCR.....	21
	2.4 Características Fisicoquímicas del DNA antiguo.....	22
	2.5 Problemas y Consideraciones para la Extracción del DNA antiguo.....	23
	2.6 Posibles Fuentes de Artefactos.....	25
	2.7 Autenticidad de las Secuencias Amplificadas.....	25
III.3.	Genoma Mitocondrial en Humanos	27
	3.1 Ventajas del mtDNA en los Estudios Filogenéticos y Evolutivos.....	28

3.2 Detección de Polimorfismos en el mtDNA por medio de Enzimas de Restricción.....	29
---	----

III.4. Linajes Fundadores del mtDNA en Poblaciones Contemporáneas de América.....	31
4.1 Análisis de la Región Hipervariable I.....	32
4.2 Distribución de los Linajes Fundadores del mtDNA en América y Asia.....	33
4.3 Linajes Fundadores del mtDNA en Poblaciones Antiguas de América.....	35
4.4 Quinto Linaje Fundador del mtDNA.....	38
4.5 Haplotipos Compuestos.....	39

III.5. Justificación.....	41
----------------------------------	-----------

IV OBJETIVOS.....	42
--------------------------	-----------

V METODOLOGÍA

5.1 Selección y Limpieza de las Muestras.....	43
5.2 Medidas Preventivas.....	44
5.3 Extracción de DNA de Restos Óseos.....	44
5.4 Purificación del DNA Extraído de Restos Óseos.....	45
5.5 Extracción de DNA de Individuos Contemporáneos.....	47
5.6 Amplificación de Segmentos Específicos por PCR.....	47
5.7 Análisis Electroforético.....	49
5.8 Análisis de Restricción.....	49
5.9 Purificación de Productos de PCR para Secuenciación.....	51
5.10 Secuenciación del mtDNA.....	51
5.11 Electroforesis de un Gel de Secuencia.....	52
5.12 Análisis de las Secuencias.....	52
5.13 Diagrama de Flujo de la Metodología.....	54

VI RESULTADOS

6.1 Datos Generales de los Individuos Mayas de Xcaret.....	55
6.2 Extracción y Purificación de Restos Óseos.....	55
6.3 Extracción de DNA y Linajes Fundadores en Individuos Contemporáneos.....	57
6.4 Análisis de Electroforesis de los Productos de PCR de Mayas Prehispánicos y el Análisis de Restricción.....	58
6.5 Secuenciación del mtDNA.....	58
6.6 Linajes Fundadores del mtDNA en Individuos Mayas Prehispánicos.....	61

VII DISCUSIÓN.....	62
---------------------------	-----------

VIII CONCLUSIONES.....	68
-------------------------------	-----------

IX BIBLIOGRAFÍA.....	69
-----------------------------	-----------

APÉNDICE DE FIGURAS.....	78
---------------------------------	-----------

Figura 1. Mapa del Área Maya.....	79
Figura 2. Zona Arqueológica de Xcaret, Quintana Roo.....	80
Figura 3. Plano Arquitectónico del Grupo B en Xcaret.....	81
Figura 4. Genoma Mitocondrial Humano.....	82
Figura 5. Extracción de DNA Total.....	83
Figura 6. DNA Purificado.....	84
Figura 7. Productos de Amplificación del Marcador Genético Deleción de 9 bp 8,272-8,289.....	85
Figura 8. Productos de Amplificación y de Restricción del Marcador Genético Hae III-663.....	86
Figura 9. Productos de Amplificación y de Restricción del Marcador Genético Hinc II-13,259.....	87

APÉNDICE DE TABLAS	88
Tabla 1. Datos Generales de la Población Maya de Xcaret, Quintana Roo.....	89
Tabla 2. Haplotipos Fundadores del mtDNA de la Región Hipervariable I.....	93
Tabla 3. Linajes Fundadores del mtDNA en Poblaciones Contemporáneas del Nuevo Mundo.....	94
Tabla 4. Frecuencias de los Linajes Fundadores del mtDNA en Poblaciones Antiguas.....	95
Tabla 5. <i>Primers</i> Usados para Tipificar el mtDNA.....	96
Tabla 6. Tamaño de los Productos de PCR y de los Fragmentos de Restricción para cada Marcador Genético Utilizado.....	97
Tabla 7. Métodos de Extracción Usados para Recuperar el DNA antiguo.....	98
Tabla 8. Frecuencias de los Cuatro Linajes Fundadores del mtDNA en Mayas Antiguos y Contemporáneos.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS.

a.C.	Antes de Cristo
bp	Pares de bases
BSA	Suero albúmina bovino
d.C.	Después de Cristo
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
ddATP	Didesoxiadenina trifosfato
ddCTP	Didesoxicitosina trifosfato
ddGTP	Didesoxiguanina trifosfato
ddTTP	Didesoxitimina trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosforilados
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
ha	Hectárea
hr	Horas
INAH	Instituto Nacional de Antropología e Historia
M	Molar
min	Minutos
mM	Milimolar
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
N	Normal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RFLPs	Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal

I RESUMEN

En este estudio se analizó la frecuencia con que se presentan los cuatro linajes fundadores del DNA mitocondrial de Nativos Americanos en los Mayas antiguos de Xcaret, la identificación de estos linajes permitió analizar las relaciones genéticas que existen entre grupos Mayas antiguos y contemporáneos.

Se seleccionaron restos óseos de 28 individuos recuperados del grupo arquitectónico B de la zona arqueológica Maya de Xcaret, Quintana Roo. Estos individuos pertenecieron a los períodos Clásico Tardío (600-800 d.C.) y Post-Clásico (900-1521 d.C.). La tipificación de los restos óseos se realizó mediante el análisis de restricción de los productos de amplificación por PCR de las regiones específicas de cada marcador genético y con la electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se llevó a cabo la estandarización de cuatro métodos de extracción y purificación de DNA antiguo; todas las técnicas mostraron ser efectivas en la recuperación de DNA amplificable. El DNA mitocondrial antiguo fue recuperado y amplificado de 25 individuos prehispánicos. Encontramos la presencia de tres linajes fundadores del DNA mitocondrial. Veintiún individuos fueron linaje A (84%), un individuo fue linaje B (4%), y dos fueron linaje C (8%). El linaje D estuvo ausente en la muestra y un individuo no presentó ninguno de los cuatro linajes. De los 7 individuos que corresponden al período Clásico Tardío 5 fueron linaje A y 12 de los 16 individuos del Post-Clásico también presentaron este linaje.

La tipificación realizada con el análisis de restricción fue confirmada por secuenciación directa de los productos de PCR de algunos individuos seleccionados, además, la secuenciación permitió comprobar que la región amplificada era la predicha.

Los resultados muestran que las frecuencias de los linajes del mtDNA presentes en la población Maya antigua de Xcaret contrastan notablemente con las encontradas en la población Maya antigua de Copán, la cual carece de los

linajes A y B, y está tipificada por los linajes C y D. En cambio, las frecuencias presentes en los Mayas antiguos de Xcaret están más cercanamente relacionadas a las frecuencias presentes en Mayas contemporáneos de la península de Yucatán y a las encontradas en otras poblaciones contemporáneas de origen Mesoamericano.

ABSTRACT

Ancient DNA from the bone remains of 25 out of 28 pre-Columbian individuals from the Late Classic-Postclassic Maya site of Xcaret, Quintana Roo, has been recovered and mitochondrial DNA (mtDNA) was amplified by the polymerase chain reaction. The presence of the four founding Amerindian mtDNA lineages was investigated by restriction analysis and by direct sequencing in selected individuals.

The mtDNA lineages A, B and C were found in this population. Eighty four percent of the individuals were lineage A, whereas lineages B and C were present at low frequencies, 4% and 8% respectively. Lineage D was absent from our sample. One individual did not possess any of the above lineages. Six skeletons out of 7 dated from the Late Classic were haplotype A, whereas 11 skeletons out of 16 dated from the Postclassic were also haplotype A.

The distribution of mtDNA lineages in the Xcaret population contrasts sharply with that found in ancient Maya from Copán, which lacks lineages A and B. On the other hand, our results resemble closer the frequencies of mtDNA lineages found in contemporary Maya from the Yucatán Peninsula and in other Native American contemporary populations of Mesoamerican origin.

II INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco tiempo la única fuente de información genética sobre los habitantes originales de Mesoamérica era el estudio de la estructura génica de sus descendientes vivos actuales. El descubrimiento de que se puede extraer el DNA de huesos humanos, de dientes, piel y pelo recobrados de sitios arqueológicos de diferentes edades hizo posible estudiar en forma directa la genética de las poblaciones antiguas (Higuchi et al. 1984., Hagelberg y Clegg 1991., Pääbo 1985). Además, con el surgimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue posible amplificar el DNA antiguo facilitando el análisis genético molecular. La aplicación de la PCR ha hecho posible realizar estudios del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y estudios de secuenciación del DNA antiguo de distintos grupos étnicos (Stone y Stoneking 1993,1998., Lalueza et al. 1997), y del DNA contemporáneo de distintos grupos humanos (Cann, Stoneking y Wilson 1987., Ingman et al. 2000., Torroni et al. 1992., Horai et al. 1993).

El estudio de restos óseos y dientes recuperados de excavaciones arqueológicas es de particular importancia ya que son mucho más abundantes y generalmente están mejor preservados que los restos de otros tejidos; esto los convierte en la muestra ideal para el análisis de poblaciones antiguas (Hagelberg y Clegg 1991., Merriwether, Reed y Ferrel 1997).

Existen muy pocos estudios genéticos de las poblaciones Mayas contemporáneas. Comas (1996), realizó estudios de tipificación sanguínea y morfométricos en individuos Mayas contemporáneos, concluyendo que no existe un tipo físico único en los pueblos Mayas, además mencionó que los Mayas son distintos grupos humanos procedentes de un grupo común por lo que están genéticamente emparentados pero que presentan diferencias que sugieren ser producto del mestizaje con grupos no Mayas que en distintas épocas colonizaron la región.

Durante los últimos diez años las técnicas de biología molecular han sido utilizadas en el estudio de la población del Nuevo Mundo al analizar la variación del mtDNA con endonucleasas de restricción en Nativos Americanos contemporáneos y antiguos para establecer los patrones genéticos de las poblaciones (Schurr et al. 1990., Torroni et al. 1992, 1993., Parr, Carlyle y O'Rourke 1996., Stone y Stoneking 1993,1998., Lalueza et al. 1997). Muchos de éstos análisis han mostrado la presencia de cuatro mutaciones características de las poblaciones nativas de América que definen cuatro haplogrupos o linajes fundadores de las distintas tribus de Amerindios. De estas cuatro mutaciones tres son mutaciones puntuales que generan cambios en el patrón de restricción del mtDNA y una es una delección de 9 bp. Cada mutación está asociada con un linaje específico para los Nativos Americanos.

La gran mayoría de los Nativos Americanos pueden ser reconocidos por uno de los cuatro linajes, lo cual hace que estas mutaciones sean utilizadas frecuentemente como marcadores en estudios de poblaciones americanas contemporáneas o prehispánicas (Stone y Stoneking 1993., Horai et al. 1993., Ward et al 1991).

Un análisis de individuos Mayas contemporáneos de la península de Yucatán demostró la presencia de los cuatro linajes fundadores del mtDNA. Los Mayas contemporáneos son predominantemente linajes A y B con bajas frecuencias de los linajes C y D (Torroni et al. 1992). La frecuencia del linaje A es similar a las encontradas en otras poblaciones nativas americanas contemporáneas de origen Mesoamericano en las cuales los linajes B y C están en bajas frecuencias y el linaje D ausente (Torroni et al. 1994). Un estudio en Mayas prehispánicos de Copán, Honduras mostró únicamente la presencia de los linajes C y D (Merriwether, Rothammer y Ferrell 1995). Esta diferencia en las frecuencias de los linajes mitocondriales sustenta la hipótesis de que las dos poblaciones representan diferentes grupos Mayas dentro de un área culturalmente homogénea.

Para contribuir al entendimiento de este contraste entre las frecuencias de los linajes fundadores del mtDNA presentes en las dos poblaciones Mayas, se analizó la frecuencia de los cuatro linajes fundadores del mtDNA en una población Maya antigua de Xcaret. Los datos obtenidos permitirán determinar la relación genética que estos pobladores ancestrales guardan entre sí y con los Mayas actuales y de esta forma, ayudar a resolver la controversia referida arriba.

La realización de éste y futuros estudios de este tipo contribuirán a responder cómo estuvieron relacionadas las diferentes poblaciones Mayas en distintos períodos de tiempo, incluyendo a los Mayas actuales.

III ANTECEDENTES DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

1.1 Los Mayas.

Los estudios arqueológicos confirman que la cultura Maya fue una de las más avanzadas civilizaciones antiguas de América. Su florecimiento ocurrió entre los años 300 y 800 d.C. (Feindel 1988).

Desde el punto de vista lingüístico las etnias Mayas son conocidas como Mayances, pertenecen a una gran familia lingüística que derivó de una lengua original, hablada en el tercer milenio a.C. en el occidente de Guatemala. Las etnias se distinguen por sus lenguas que son alrededor de 28, y entre ellas destacan la Maya yucateca, chontal, tzeltal, tzotzil, tojolabal, lacandona, kanjobal, chuj, quiché, cakchiquel, kekchí, pokoman y pokomchí (De la Garza 1992).

La trayectoria histórica de la civilización Maya prehispánica se ha dividido en tres grandes períodos:

En el período Pre-Clásico (1500 a.C. a 300 d.C.), se estructuraron los rasgos que caracterizaron a la cultura Maya: la agricultura se convirtió en el fundamento económico, surgieron las primeras aldeas, centros ceremoniales y se iniciaron diversas actividades culturales en torno a la religión (De la Garza 1992).

El período Clásico (300 d.C. a 900 d.C.), constituyó una época de florecimiento en todos los órdenes: se dio un gran desarrollo de la agricultura, un aumento en la tecnología, una intensificación del comercio y se consolidó la jerarquización política, social, sacerdotal y militar. Asimismo, se construyeron grandes centros ceremoniales y ciudades, donde florecieron las ciencias y las artes (De la Garza 1992).

Hacia el siglo X, se presentó un colapso cultural, cuya causa pudo haber sido una crisis económica y socio-política. Por lo que las grandes ciudades clásicas del área Central fueron abandonadas y así se inició el período denominado Post-Clásico (900 d.C. a 1400 d.C., De la Garza 1992).

Varias posibles causas han sido propuestas para este colapso: desastres climatológicos tales como inundaciones, sequías o temblores; enfermedades incluyendo malaria y fiebre amarilla; desintegración del sistema agrícola, guerra civil y externa, sin embargo, ninguna de estas explicaciones ha sido sustentada (Márquez 1991).

Contrariamente a lo que ocurrió en el área Central, donde no volvió a florecer la cultura Maya, en las áreas Norte y Sur se produjo primero una revitalización cultural, ocasionada en algunos centros, por la llegada de grupos extranjeros sobre todo procedentes del Altiplano central (De la Garza 1992).

El período Post-Clásico terminó con la conquista española, la cual puso fin al proceso cultural mesoamericano y los Mayas quedaron sometidos y marginados en sus propios territorios.

Los grupos Mayances se asentaron en un territorio de casi 400,000 km², que abarca los actuales estados mexicanos de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, partes orientales de Tabasco y Chiapas, así como los países centroamericanos de Guatemala y Belice, y porciones occidentales de El Salvador y Honduras (De la Garza 1992).

El área Maya se caracteriza por una gran diversidad geográfica. Tradicionalmente se divide según el relieve: en Tierras Altas y Tierras Bajas. Recientemente Sharer (1994), sugiere que el área Maya está constituida por tres zonas ambientales o ecológicas: 1) Al sur se distinguen las planicies de la Costa Sur (Costa del Pacífico) y el Área Meridional (Tierras Altas). 2) Las Tierras Altas, que cuentan con una elevación general de más de 800 m s.n.m. y un clima templado y frío, presentan la mayor diversidad ambiental de toda el área. Éstas se subdividen en: las Tierras Altas Volcánicas en el sur de Chiapas y Guatemala, una zona que drena hacia el sur, sureste y suroeste. Y las Tierras Altas Metamórficas, al norte del eje volcánico, drenan hacia el río Usumacinta, el río Belice y el río Motagua, hacia el norte y el este. 3) Las Tierras Bajas que se subdividen en tres. Las Tierras Bajas del Sur, Las Tierras Bajas Centrales que presentan un clima tropical húmedo o subhúmedo y

una exuberante vegetación selvática perennifolia. Geográficamente las Tierras Bajas Centrales abarcan la cuenca del Usumacinta Bajo y Medio, el Petén guatemalteco y el territorio beliceño. Algunos autores incluyeron en esta región la cuenca del río Motagua Bajo y el noroeste de Honduras. Las Tierras Bajas del Norte abarcan la mitad norte de la península de Yucatán (Sharer 1994. pp19-43, Figura 1). El clima es tropical con lluvias en verano, y seco el resto del año. La precipitación pluvial es escasa, pero como el suelo está formado por rocas calizas que permiten gran infiltración, se han producido diversos tipos de depósitos subterráneos como los cenotes. La vegetación consiste de selva baja caducifolia (De la Garza 1992).

1.2 Descripción del Sitio:

Xcaret, Quintana Roo, México.

El sitio arqueológico de Xcaret se localiza en la costa oriental de Quintana Roo. A 20° 35' 4" de latitud norte y 87° 06' de longitud oeste. El poblado más cercano es Playa del Carmen a 6 km al norte (Con 1991a).

Xcaret está caracterizado por formaciones coralinas fósiles formadas durante el Pleistoceno que sobresalen entre 50 cm y 1 m sobre el nivel del mar. Las condiciones físicas de Xcaret permitieron la formación de un suelo poco profundo, con escasa capacidad húmica, que no lo hace muy adecuado para el cultivo. El abastecimiento de agua se da por medio de los cenotes, que son cavernas con entradas y provistas de techo. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano. La cubierta vegetal está clasificada como Selva Mediana Subperennifolia, además existen zonas con altos árboles, con matorrales espinosos, mangle y dunas. Las especies más conocidas y de gran utilidad son el chicozapote, el cedro, la caoba. Entre las palmas las más utilizadas son el "chit" y el "huano" utilizado para techar las casas. La fauna se caracterizaba por el faisán, la codorniz, el pavo de monte, la perdiz, la tortuga, el jaguar, el tapir, el manatí y algunos patos silvestres. La riqueza de especies que poblaban las

selvas, manglares y costas, ha sido afectada por la acción humana (Con 1991a).

1.3 Aspectos Históricos de Xcaret.

Se desconoce el origen del nombre Xcaret y se piensa que puede ser una derivación o corrupción de la palabra "caleta". El nombre de Xcaret aparece en 1926, cuando la expedición dirigida por Gregory Mason y H. J. Spiden descubrieron el sitio (Con 1991a).

En los años cuarenta Andrews E. H. IV visitó el sitio junto con Hewen. Andrews regresó en 1956 y realizó las primeras exploraciones, que fueron continuadas por Andrews A. P. muchos años después. Andrews dio una nomenclatura de letras para denominar grupos constructivos y números romanos para las estructuras (Con 1991a).

Se ha identificado a Xcaret con el antiguo puerto prehispánico y colonial de Polé, debido a que es el único punto donde se podía ver la isla de Cozumel y que es una caleta adecuada para albergar embarcaciones. Polé fue conocido como el punto de embarque a la isla de Cozumel y principalmente como el puerto de donde salían las peregrinaciones que se dirigían al santuario de la diosa Ixchel en la misma isla (Con 1991a).

El puerto de Polé permaneció como el principal punto de embarcación para Cozumel durante el período colonial. Un estudio sobre mapas que datan desde 1766 a la fecha, ha permitido determinar la localización de Polé en el sitio de Xcaret. El descubrimiento de ruinas de una capilla española en medio de las ruinas prehispánicas y otros restos coloniales en Xcaret proveen evidencia de que hubo un asentamiento colonial (Andrews IV y Andrews 1975).

1.4 Arqueología del Sitio.

Xcaret se encuentra hacia el sur de Playa del Carmen y hacia el norte de la bahía de La Ina (Con 1991a)

Los principales grupos constructivos de Xcaret se distribuyen paralelos a la costa hacia el noreste y son nueve -A, B, C, D, E, F, G, H y K-. Cuentan con un total de 34 estructuras que cubren un área aproximada de 500 x 800 m. En un principio solo los grupos A y K habían sido excavados y consolidados, así como el templo superior y la muralla (Con 1991a, Figura 2).. La mayoría de las estructuras arquitectónicas, con algunas excepciones, se asocian con restos cerámicos del período Post-Clásico Tardío (1250 d.C. a 1520 d.C., Andrews IV y Andrews 1975).

Las excavaciones arqueológicas de Xcaret a cargo de Ma. José Con, iniciaron en 1986, la primera temporada consistió en el recorrido y mapeo de 70 ha que forman parte de la propiedad de los desarrollistas y donde se encuentra la zona de Xcaret y parte de la zona habitacional. Durante la segunda temporada, en 1987, se concluyó con la excavación y consolidación del Grupo A y parte de la muralla que separa a la zona de Xcaret del mar. En la tercera temporada, en 1989, se exploraron y consolidaron tres estructuras del Grupo B, y se realizó la exploración parcial y consolidación del Grupo G, que es una capilla española del siglo XVI. La cuarta temporada en 1990, consistió en la exploración casi en su totalidad y en la consolidación del Grupo B de donde se recuperaron 35 entierros. En 1991, durante la quinta temporada, se exploró y consolidó en su totalidad el Grupo D, una estructura del Grupo E y tres cimientos asociados a ella (Con 1991b).

1.4.1 Grupo B.

La arqueóloga María José Con en 1990 localizó y exploró 35 entierros procedentes de diversas estructuras prehispánicas del grupo B del sitio de Xcaret, pertenecientes a los períodos Clásico y Post-Clásico. Estas muestras óseas están constituidas por esqueletos femeninos y masculinos de diversas edades, desde recién nacidos hasta adultos.

El grupo B se encuentra sumamente saqueado y está localizado a unos 200 m al noroeste de la caleta y aproximadamente a unos 100 m al norte del grupo A. Andrews y Andrews (1975), mencionaron que consta de siete estructuras y que tanto la disposición como las dimensiones de este grupo lo hacen diferente a los demás grupos. Las siete estructuras mencionadas por dichos autores no son observables con claridad. Sin embargo, se aprecia que este grupo consta de una serie de plataformas bajas, no definibles muy claramente en cuanto a sus límites, que alternan con estructuras muy destruidas (Con 1991a). De las siete estructuras, cinco son grandes plataformas que varían de 65 a 200 cm en altura, aproximadamente de 5 a 16 m de ancho y de 10 a 21 m en longitud, dimensiones anormalmente largas para Xcaret (Andrews IV y Andrews 1975). Durante las excavaciones de Con (1991a), se pudieron identificar tres edificios adicionales a los reportados por Andrews y Andrews (1975), por lo que el grupo B está integrado por 10 estructuras arquitectónicas rodeadas por muros de adosamiento.

En ningún edificio queda el templo superior (Con 1991a), ya que se colapsaron y, por el tipo de piedras, prácticamente se excluye la posibilidad de un techo de mampostería. Una impresión preliminar del grupo sugiere que las estructuras IV-VII tenían techos de paja y la estructura III soportaba una estructura de piedra. En el centro y en la esquina suroeste de la plaza hay dos pequeños altares, uno con un techo abovedado -estructura II- y el otro con un techo de vigas y mortero -estructura I-. Ambos parecen haber sido construidos después de las plataformas circundantes (Andrews IV y Andrews 1975). Con (1991), sugiere que el grupo B es un conjunto residencial extenso, cuyas construcciones rodean dos edificaciones centrales con altar. Se plantea que varias estructuras son de tipo habitacional, incluyendo otro tipo de estructuras domésticas como corrales, almacenes y otras áreas de actividad, tal y como se usa en la actualidad. Seguramente también fueron utilizados como huertos para obtener productos complementarios a su dieta. Dada la pobreza del suelo y la necesidad de rotación del terreno es poco probable que estos lotes hayan sido

utilizados solo para el cultivo. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que algunos de ellos sirvieran exclusivamente para este fin (Con 1991a).

La mayoría de los 35 entierros del grupo B se recuperaron de los patios y cerca de los muros (Figura 3). En el presente trabajo se analizaron los restos óseos de 28 individuos recuperados de los entierros antes mencionados.

De los materiales recuperados durante las excavaciones, se encuentran objetos obtenidos por el comercio como cerámica, jade, obsidiana, cristal de roca, pirita, metal, etc. procedentes de El Chayal y Guatemala (Con 1991b).

1.5 Entierros en Xcaret.

Las creencias Mayas sobre la muerte comparten ciertas características generales que se mencionan a continuación:

- Creencia en una existencia después de la muerte.
- Creencia en la complementariedad entre la vida y la muerte.
- Creencia en una comunicación entre los vivos y los muertos, quienes ejercen ciertos poderes sobre los vivos.
- Consideración de los restos mortales como reliquias, lugares de contacto y de comunicación con los antepasados.

Los entierros sencillos o en cista asociados con las unidades habitacionales han sido las formas más comunes de disposición funeraria en todos los tiempos.

Éstos generalmente se localizan debajo de los pisos de las plataformas residenciales o de los adoratorios asociados y algunos entierros son múltiples, sobre todo los del Post-Clásico en donde predomina la deposición del cadáver en posición extendida. La mayoría de los difuntos sepultados en las áreas domésticas se presentan en el contexto con escasas ofrendas o ninguna, los materiales y objetos colocados junto al difunto durante el acto de su deposición son comúnmente referidos como ofrenda. La identificación y evaluación de éstos, es importante para la interpretación social (Tiesler 1999).

Los entierros prehispánicos pueden ser directos o indirectos, primarios o secundarios, con ofrenda funeraria o sin ella. Hay enterramientos de un solo individuo o de varios, o bien puede tratarse de inhumaciones simultáneas en un mismo bulto funerario. También se considera la posición y orientación dadas al cadáver al hacer la inhumación, pues eso explica prácticas rituales o simples costumbres cotidianas (Romano 1974).

Se entiende por entierro directo el realizado en un agujero de forma regular o desigual, somero o profundo, sin más pretensión que la de permitir el depósito del cadáver dentro de esa sencilla tumba. La categoría de enterramiento indirecto corresponde a todas aquellas construcciones hechas con fines o propósitos funerarios monumentales. Otro tipo de enterramientos indirectos fueron realizados en cuevas, grutas o cavernas naturales (Romano 1974).

Los enterramientos pueden ser también primarios o secundarios, entendiendo que los primarios son todos aquellos que, en el momento de la exploración, muestran *in situ* esqueletos completos y en correcta relación anatómica todas sus partes; aunque también se consideran enterramientos primarios aquellas inhumaciones de uno o varios segmentos de un cadáver cuyas partes óseas, al hacerse la excavación arqueológica, aparecen en relación anatómica. Los entierros secundarios son los que no muestran relación anatómica adecuada, o sea, aquellos entierros que fueron primarios, pero cuyos restos óseos fueron removidos totalmente, quedando agrupados de manera irregular. Los osarios son, desde este punto de vista, enterramientos secundarios (Romano 1974).

En el presente estudio se trabajó con 28 individuos provenientes de 24 de los 35 entierros recuperados del grupo B en Xcaret; de éstos, 16 fueron primarios directos, 2 fueron primarios indirectos, 2 secundarios, 2 osarios secundarios y 2 secundarios indirectos, algunos de estos entierros están conformados por más de un individuo (Tabla 1). En este grupo predominaron los

entierros primarios, varios de ellos se localizaron en estructuras de tipo habitacional, por lo que es probable que se trataran de entierros familiares.

Una de las razones para explicar la presencia de los entierros secundarios del tipo osario está relacionado con una de las costumbres funerarias actuales entre la población contemporánea de descendencia Maya, la cual consiste precisamente en exhumar los cadáveres después de cierto tiempo (esto varía de un lugar a otro de la Península yucateca, de dos a cinco años) para colocarlos en grandes tumbas de piedra. Los esqueletos son apilados en tales sitios hasta quedar llenos. Según los relatos de Stephens, esta costumbre es bastante antigua aunque no se puede saber si esta práctica formaba parte de las costumbres funerarias indígenas prehispánicas o de una adaptación de alguna costumbre española. Ya que en algunas provincias Vascongadas cuando el espacio dedicado a las tumbas se saturaba, los restos se exhumaban y eran depositados en grandes osarios (Márquez et al. 1982).

Entre las poblaciones prehispánicas los entierros en osarios son una costumbre común y extendida (Romano 1974), y entre la sociedad Maya esta práctica era frecuente (Márquez et al. 1982).

La cronología del sitio y el estudio de los objetos asociados a los entierros en Xcaret indican que de los 28 individuos que se analizaron en esta tesis, 7 corresponden al período Clásico Tardío (600 d.C. a 800 d.C.), y 16 al Post-Clásico (900 d.C. a 1521 d.C.), en cinco individuos no fue posible determinar la ubicación cronológica debido a que faltó la información correspondiente a su asociación con restos cerámicos (Tiesler 1999).

El estudio osteológico, basado en la medición y la observación macroscópica, complementada con la microscopia de lupa con aumento de 40x, permitió identificar que 4 individuos son infantiles y 22 son adultos. El problema del deterioro osteológico impidió la asignación del rango de edad en 2 individuos (Tiesler 1999)

La identificación del sexo de colecciones esqueléticas se efectúa con base en las características métricas y los atributos observables del individuo.

Además la experiencia del investigador y la familiaridad con las características poblacionales regionales son indispensables para la correcta identificación del sexo. El análisis morfométrico identificó el sexo de algunos individuos de los 28 estudiados de la población de Xcaret: 6 individuos son mujeres y 10 son hombres. Doce individuos presentaban atributos morfológicos que no permitieron clasificarlos claramente, por lo que se desconoce el sexo de estos (Tiesler 1999).

La información sobre el número y tipo de entierros, localización, cronología, edad y asociación con ofrenda se sintetiza en la Tabla 1.

1.6 La Costa Oriental de Quintana Roo.

El aporte de los datos arqueológicos de Playa del Carmen, Xelhá, Ixil y Cobá comprueban que hubo ocupación desde el Pre-Clásico tanto en los sitios costeros como en el interior de Quintana Roo. Durante el Clásico existían pocos asentamientos en la costa; al parecer la mayor ocupación se daba en el interior (Vargas 1988). Sin embargo a principios del período Post-Clásico se detectan varios cambios en los asentamientos costeros, entre otros, un incremento en la población (Márquez et al. 1982).

Durante el período Clásico, los grandes centros en el norte de la península de Yucatán controlaban las rutas comerciales a través de una extensa red de caminos construidos -calzadas y sacbés- por donde se intercambiaban los productos y mercancías entre las zonas Petén-Belice y noroccidente de la Península. Una hipótesis para explicar el desarrollo tardío de los centros costeros propone que la caída de los grandes centros del período Clásico Tardío en el norte de Yucatán, entre ellos Cobá, ocasionó una falta de seguridad en el transporte de las mercancías y de los productos en el interior de la Península. Lo anterior debió crear la necesidad de ampliar la parte marítima de las rutas comerciales, haciéndola más larga pero segura (Márquez et al. 1982).

La consolidación de una nueva tendencia mercantilista de control social, indudablemente tuvo un impacto en la costa oriental y probablemente contribuyó al incremento de la población en el área. Es entonces cuando la red comercial costera adquirió gran importancia y sitios como el Meco, Cozumel, Xcaret, Tulum y otros llegan a su máximo desarrollo y forman parte de un sistema tributario bajo la posible dominación de Tulum en estrecha relación con Mayapán (Márquez et al. 1982). Estos cambios en la estructura social se asociaron a importantes movimientos de población del interior de la península de Yucatán hacia las zonas costeras. Además, en las fuentes históricas se narran migraciones de algunos grupos no mayas (toltecas, olmecas, xicalancas, nonoalcas, itzaes, xiues, quichés, cakchiqueles etc.) En la península de Yucatán se conoce que los xiues ocupaban Uxmal y los itzaes Chichén Itzá (Vargas 1988).

1.7 Características Físicas y Serológicas de los Mayas.

Los Mayas contemporáneos se caracterizan por ser individuos de baja estatura 1.52 m en promedio para el sexo masculino y 1.428 m para el femenino, con brazos largos en relación con la talla; de hombros anchos, braquicéfalos; de pelo negro y rígido; ojos castaño oscuro (Steggerda 1932 citado en: Comas 1996).

En el material osteológico precolombino de la zona Maya se han encontrado muy pocos restos humanos en buen estado de conservación, de las excavaciones arqueológicas sólo se han recuperado restos frágiles, que se desintegran con facilidad. La causa de esto se ha atribuido a la temperatura, humedad y composición química del terreno (Comas 1996).

Se han realizado análisis osteométricos sobre la talla, deformación craneana, mutilación dentaria y costumbres funerarias de las poblaciones Mayas prehispánicas de la península de Yucatán (Comas 1996., Márquez 1987., Tiesler 1999). Es necesario mencionar que este tipo de trabajos son escasos y algunos resultados no son claros. Por ejemplo, cuando se comparan

los resultados de distintos autores relacionados con la estatura entre los Mayas, un grupo de autores detecta un descenso de la estatura masculina después del período Pre-Clásico hasta la actualidad (Sterwart 1953., Saúl 1972., Haviland 1967., Tomados de Márquez 1987). Sin embargo, para Tiesler (1999), no hay evidencias convincentes de un decremento en la estatura de los Mayas, al menos en la abundante muestra masculina que estudió.

Comas (1996), estudió individuos contemporáneos Mayas de las tierras altas y bajas llegando a las siguientes conclusiones: a) En el sistema de grupos sanguíneos ABO se detectó el grupo O en una alta frecuencia, que oscila entre 86.5% y 100%. b) En el sistema Rh-hr todos los grupos Mayas presentan el grupo sanguíneo Rh+. c) En el grupo sanguíneo MN se observa una alta frecuencia del grupo M y baja del N. Otros estudios con los antígenos P, V, Lewis y el factor Diego etc., muestran una variabilidad en las distintas poblaciones que pertenecen a la familia Maya. Comas (1996), propuso que no existe un tipo somático único con caracteres definibles de los pueblos que pertenecen a la familia Maya.

De acuerdo a los estudios realizados con métodos osteométricos por diferentes autores en poblaciones Mayas contemporáneas y prehispánicas y con los estudios realizados en la tipificación sanguínea en contemporáneos, se concluye, que no existe un patrón físico homogéneo entre las poblaciones Mayas. Se necesitan más estudios morfométricos y genéticos de las poblaciones prehispánicas y de las poblaciones contemporáneas, que permitan en un futuro poder establecer relaciones genéticas más claras entre las poblaciones.

III.2 Antropología Molecular.

La Paleontología y la Arqueología son disciplinas que tradicionalmente están relacionadas con la historia del hombre. Con el surgimiento de la Antropología Molecular, que implica el análisis genético de restos humanos

antiguos, se tiene la oportunidad de estudiar la evolución y origen del hombre, las poblaciones humanas y enfermedades asociadas con bacterias y virus, y la mutación de ciertos genes para establecer su tasa de cambio (Haeseler, Sajantilla y Pääbo 1995., Poinar 1999). Cada genoma está constituido de más de tres mil millones de pares de bases, varias de las cuales experimentan mutaciones en cada generación y la manera en cómo estas mutaciones se acumulan en las poblaciones, está determinado por cómo las poblaciones se expanden, contraen, dividen y mezclan. De esta forma el estudio de la variación genética produce información con respecto a nuestra historia (Haeseler, Sajantilla y Pääbo 1995).

2.1 Historia de la Identificación del DNA antiguo.

Higuchi et al. (1984), publicaron la primer secuencia de un espécimen con 120 años de antigüedad obtenida por clonación del mtDNA, extraído de la piel de *quagga*. Los autores demostraron, contrariamente al punto de vista de entonces, que *quagga* está más relacionado con las cebras que con el caballo doméstico.

Svante Pääbo (1985), logró clonar secuencias de DNA nuclear recuperado de una momia egipcia antigua con una antigüedad de 2,400 años.

Con estos dos trabajos pioneros se demostró que el DNA nuclear y el mtDNA persistían por milenios, pero también se pusieron de manifiesto las dificultades que se presentan cuando se trabaja con DNA antiguo (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989).

La clonación del DNA antiguo en bacterias se enfrenta a los abundantes daños que están en el DNA produciendo: 1) una baja eficiencia de la clonación, ya que la mayoría de las moléculas vector son ligadas a moléculas dañadas cuyas modificaciones impiden la replicación en las bacterias y 2) que algunas moléculas dañadas sean reparadas en las bacterias, frecuentemente por procesos que son propensos a error y entonces tienden a distorsionar la información obtenida de la secuencia clonada (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989).

En conclusión los primeros problemas con DNA antiguo fueron: a) el número elevado de moléculas dañadas y/o modificadas que alteraba los resultados y b) no se podían verificar y reproducir éstos (Höss, Handt y Pääbo 1994).

Erika Hagelberg et al. (1989) lograron extraer DNA de huesos antiguos, que se encontraba en los osteoblastos y los osteoclastos. Observó que el DNA recuperado de huesos está menos degradado que el DNA recuperado de tejidos blandos. Por lo que los huesos han sido considerados como uno de los mejores reservorios para el DNA antiguo. Además, los huesos son muy abundantes en las excavaciones arqueológicas lo que los convierte en el materia ideal para estudiar poblaciones antiguas.

2.2 La Reacción en Cadena de la Polimerasa en Antropología Molecular.

La PCR amplifica selectivamente segmentos de DNA hasta la obtención de cantidades que permiten la secuenciación directa. La amplificación es realizada con dos *primers* sintéticos, una DNA polimerasa termoestable y los cuatro desoxirribonucleótidos, entre otros compuestos (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989). Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos que son: 1) Desnaturalización del DNA, en el cual se separan las dos cadenas complementarias del DNA molde 2) Alineación, en el que se realiza el apareamiento específico entre los *primers* y las cadenas sencillas del segmento de DNA desnaturalizado y 3) Extensión, en el que la DNA polimerasa adiciona nucleótidos a los *primers* apareados haciendo crecer la nueva cadena de DNA que es complementaria al DNA molde. Ciclos repetidos como el anterior conducen a la síntesis exponencial del segmento de DNA molde (Saldaña et al 1993).

La PCR es una herramienta ideal para amplificar un número pequeño de moléculas de DNA intactas en un extracto de tejido antiguo, sin la interferencia de la gran mayoría de moléculas dañadas. La PCR es un sistema *in vitro* sin

capacidad de reparar o reparar erróneamente. Por el contrario, durante la amplificación enzimática, muchas moléculas dañadas no pueden ser replicadas, ya sea por entrecruzamientos intra o intermoleculares, o son replicadas en desventaja debido a muchas de las lesiones. Entonces las moléculas intactas pueden amplificarse preferencialmente (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989).

Otra ventaja de la PCR al permitir la secuenciación directa de los productos de PCR es que una sola reacción de secuencia representa el consenso del evento inicial de amplificación de muchas moléculas molde antiguas. Esto es más confiable que un clon molecular derivado de una sola molécula de un extracto de tejido (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989).

2.3 Secuencias de DNA antiguo vía PCR.

La PCR y la secuenciación directa han hecho posible recuperar secuencias de DNA de material antiguo.

Uno de muchos ejemplos que ponen de manifiesto la aplicación de la PCR en la determinación de las secuencias antiguas es el siguiente:

La relación entre los humanos modernos y los Neandertales es uno de los principales problemas en la historia de la evolución humana. En Europa estos dos grupos coexistieron en tiempo por casi 10,000 años y en espacio ya que compartieron algunas áreas geográficas. Durante mucho tiempo se ha especulado si los Neandertales fueron completamente reemplazados por los humanos modernos sin contribuir con algún gen. Recientemente esta hipótesis ha sido sustentada con la secuencia obtenida del *Neandertal tipo* encontrado en Alemania. La secuencia del mtDNA del Neandertal difiere en 27 substituciones de la secuencia de referencia de un europeo moderno del norte, además presentó varias diferencias con las secuencias humanas Africanas, Asiáticas y Europeas. Por lo que se sugiere que el linaje que dio origen a los Neandertales divergió antes de que el más reciente ancestro común del pool genético mitocondrial divergiera. Se sugiere que los Neandertales no contribuyeron con sus genes mitocondriales a los humanos modernos (Krings et al. 1997., Poinar

1999). Se considera que es necesario que más restos de Neandertales sean examinados antes de concluir sobre su relación con los homínidos.

2.4 Características Fisicoquímicas del DNA antiguo.

Todos los estudios que examinan el daño en el DNA antiguo han mostrado que se encuentra altamente modificado. Esto se manifiesta por una reducción en el tamaño a sólo unos cientos de bases. Mucha de la fragmentación ocurre durante las primeras horas después de la muerte, antes de que el tejido se seque completamente. Otros tipos de lesiones surgen por los radicales de oxígeno que reaccionan con las bases y azúcares en la cadena del DNA. Estas reacciones causan modificaciones y pérdidas de base tales como los sitios sin bases, oxidación de pirimidinas, ruptura de la cadena y entrecruzamiento entre las moléculas del DNA. Muchos de estos daños pueden ser atribuidos a procesos oxidativos. Algunas pirimidinas, en particular la timina, son más sensibles a los daños oxidativos que las purinas. La modificación química del DNA antiguo es generalmente tan extensa que sólo puede esperarse que mucho menos del 1 % de las moléculas del DNA extraídas de los especímenes arqueológicos no estén dañadas y puedan servir como molde en una amplificación (Pääbo 1993., Pääbo, Higuchi y Wilson 1989., Handt et al. 1994).

Independientemente de las condiciones de preservación del espécimen o la edad, el tamaño de los fragmentos de DNA recuperados es similar. No existe una correlación clara entre la edad de la muestra y la longitud de los fragmentos. Svante Pääbo examinó el DNA de los restos de un puerco de cuatro años de antigüedad, de un lobo marsupial de 100 años, de un perezoso de 13,000 años y de varias momias humanas, encontrando en todos un tamaño de fragmentos de 100-200 bp, aunque se han encontrado fragmentos de hasta 400 bp (Pääbo 1989). En contraste, los tejidos frescos poseen fragmentos de DNA mayores a 10,000 bases de longitud (Pääbo 1993)

2.5 Problemas y Consideraciones para la Extracción del DNA antiguo.

Sin la menor duda el problema mas importante cuando se trabaja con tejidos humanos antiguos es la probable contaminación con DNA humano moderno (Hagelberg y Clegg 1991).

La contaminación con DNA moderno puede provenir de varias fuentes: de las células que continuamente se descaman de la piel, pelo y de la mucosa de la boca transmitida a través de la saliva de los arqueólogos que recuperan las muestras, de los antropólogos que las estudian, o de los investigadores que las analizan a nivel molecular. Se recomienda que las muestras que serán sujetas a análisis molecular: nunca deben soplarse para eliminar el polvo o la tierra, que no se hable sobre ellas y se manipulen siempre con guantes (Hagelberg 1994). Además se sugiere trabajar con especímenes recuperados de una excavación reciente. El material no debe lavarse, ya que se ha observado en huesos que fueron lavados y almacenados en bolsas de plástico, que después de un tiempo, presentan sobre ellos moho. Tomando en cuenta estas condiciones se reduce la probabilidad de una contaminación con DNA contemporáneo en las muestras. Pero la contaminación con DNA moderno también puede provenir por contaminación en los reactivos y material a utilizar durante el procedimiento de la extracción o durante la preparación de la reacción de PCR. Sobra decir que, si este fuera el caso, los resultados serían erróneos (Handt et al. 1994). Para evitar este tipo de contaminación se ha sugerido llevar a cabo las medidas preventivas que se mencionan posteriormente.

Casi todos los autores han encontrado que muchos de los extractos de DNA antiguo contienen un poderoso inhibidor de la PCR. Esto ha sido demostrado incluyendo una alícuota de DNA antiguo en los tubos de amplificación que contienen DNA moderno, donde se observa una gran disminución del producto amplificado, incluso en algunos casos no hay producto de amplificación. En varios casos el efecto inhibitorio puede ser suprimido o

disminuido añadiendo albúmina sérica bovina en el coctel de amplificación al unirse a las impurezas que inhiben a la polimerasa o también por dilución del extracto ya que también se diluye el inhibidor (Pääbo 1993., Hagelberg 1994).

Estos inhibidores co-precipitan con el DNA extraído y no son removidos por métodos convencionales, tales como extracción con solventes orgánicos o precipitación con etanol. La inhibición de la PCR se correlaciona con la presencia de un material que migra rápidamente en geles de agarosa y que tiene un color amarillo-café bajo la iluminación normal. Estos contaminantes se pueden eliminar con técnicas de purificación basadas en la afinidad del DNA por la sílica.

Erika Hagelberg (1994), ha mostrado que del hueso se puede recuperar DNA de la muestra, DNA proveniente de microorganismos, carbohidratos, algunas proteínas e impurezas parecidas al ácido húmico. Cuando se corren de 5 a 10 μ l de DNA en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se visualiza con luz ultravioleta, algunas veces se observa una fluorescencia azul, probablemente proveniente de derivados del suelo como el ácido húmico. Éste es una mezcla heterogénea de moléculas grandes, aromáticas, con grupos reactivos carboxilo e hidroxilo que muestra un patrón de fluorescencia característico.

Según Pääbo (1989), el DNA extraído de muestras antiguas presenta un contaminante de color café, probablemente formado por los llamados productos de Maillard de azúcares reductores.

Tuross (1994), en los extractos del DNA antiguo detectó la presencia de ácido fúlvico y de ácido húmico. De acuerdo al autor, éstos pueden ser eliminados con diferentes técnicas de purificación (columna superosa 6, kit "magic" de Promega, precipitaciones con etanol etc). Sin embargo, ninguna de las técnicas utilizadas logró remover el efecto inhibitorio de la PCR cuando existía una alta concentración de los contaminantes.

Además cuando se trabaja con el DNA antiguo la reproducibilidad de los resultados puede representar un problema, ya que algunas de las muestras de

las cuales se extrae el DNA son únicas, por lo que un experimento no puede ser fácilmente repetido por el mismo investigador o por otros grupos.

2.6 Posibles Fuentes de Artefactos.

La extraordinaria capacidad de amplificación de la PCR a partir de una sola, o un pequeño número de moléculas, que es lo que hace posible la amplificación del DNA antiguo, implica también la fuente más frecuente y peligrosa de artefactos en este tipo de estudios. La presencia de una pequeñísima cantidad de moléculas de DNA humano contemporáneo en los extractos de DNA humano antiguo podría competir ventajosamente durante la amplificación, ya que la mayor parte de las moléculas antiguas se encontrarán dañadas de alguna manera.

Durante la amplificación enzimática, muchas moléculas de DNA dañadas pueden ser replicadas en desventaja porque las lesiones disminuyen la actividad de la DNA polimerasa. Algunas moléculas dañadas con lesiones menores, como las bases desaminadas, pueden generar errores sin retardar la amplificación.

Estos errores, así como los introducidos por la polimerasa en los sitios no dañados, pueden estar presentes en la población final de moléculas producida por la PCR. Sin embargo aunque cada error es específico a una molécula, su contribución al resultado final puede ser menor o, en algunos casos, irrelevante, si no se produce al inicio de la reacción (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989).

Durante la amplificación del DNA antiguo pueden ocurrir errores que enmascaran la presencia de sitios de restricción. Este tipo de error se puede detectar solamente realizando duplicados de cada amplificación o secuenciando los productos de amplificación (Höss et al. 1996).

2.7 Autenticidad de las Secuencias Amplificadas.

Se han establecido algunos "criterios de autenticidad" que es necesario considerar cuando se trabaja con material antiguo A) Realizar extractos control

paralelos a los extractos de los especímenes antiguos, para detectar alguna contaminación introducida por los reactivos y/o las manipulaciones. B) Realizar al menos dos extracciones independientes del mismo individuo, preferentemente de diferentes partes de éste, para disminuir el riesgo de contaminación de una mala manipulación de la muestra o del extracto. Las secuencias resultantes deben ser inambiguas e idénticas para el mtDNA ya que la mayoría de los organismos portan solo un tipo de genoma C) Debe cumplirse la relación inversa entre la eficiencia de amplificación y el tamaño del producto amplificado, es decir “si se amplifican segmentos cortos la eficiencia de amplificación es mayor que si se amplifican segmentos grandes”. Esta condición restringe a trabajar el DNA antiguo con secuencias cortas, si se desea obtener productos de amplificación largos es necesario amplificar segmentos superpuestos. La relación inversa ha sido observada para el DNA antiguo pero no para el DNA moderno. D) Las secuencias obtenidas deben tener una ubicación filogenética coherente con el marcador y la especie objetos de la amplificación; por ejemplo, cuando se secuencia un lobo marsupial la secuencia que se espera obtener debe ser parecida a las secuencias de los marsupiales. Por lo tanto cuando una secuencia de una especie extinta se ubica en un lugar inesperado dentro de una filogenia está puede ser interpretada como una posible contaminación.

Desafortunadamente este criterio filogenético no puede ser aplicado cuando el DNA humano antiguo es estudiado, ya que la principal fuente de contaminación es DNA de otro humano (Pääbo, Gifford y Wilson 1988). En algunos casos se puede reducir este problema si se estudia la variación presente en la región geográfica de interés. Las secuencias antiguas pueden entonces ser comparadas a la variación moderna e identificarse secuencias contaminadas que no se ajustan a la variación esperada.

Además se han establecido algunas medidas preventivas que minimizan la posible contaminación con DNA moderno dentro del laboratorio. A) Una estricta separación espacial de los lugares donde se realiza la extracción y el

análisis del producto de amplificación por PCR para reducir el riesgo de acarreo de los productos de amplificación a los extractos y reactivos y B) utilizar una bata limpia y tapaboca, equipo y reactivos exclusivamente para este estudio, el material a utilizar puede ser esterilizado con radiación UV o hipoclorito de sodio al 5% y esterilizar con calor el agua y las soluciones etc. Es obvio que ninguno de estos controles ni las medidas preventivas ayudan si el espécimen está previamente contaminado con DNA moderno por alguna manipulación.

Todos estos criterios de autenticidad y medidas preventivas anteriormente mencionados pueden evitar y minimizar el riesgo de formular falsas conclusiones (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989., Höss, Handt y Pääbo 1994., Handt et al. 1994).

III.3 Genoma Mitocondrial en Humanos.

El DNA mitocondrial en humanos es una molécula de DNA circular con aproximadamente 16,569 nucleótidos de longitud. Su secuencia ha revelado una organización muy compacta. Cerca del 90 % del genoma es una región codificante que consiste de genes conservados. Existen 37 genes en la molécula del mtDNA. Los genes codifican para 13 proteínas, 2 RNAs ribosomales y 22 RNAs de transferencia. Las proteínas codificadas por los genes son el citocromo B, las subunidades I-VI de la NADH deshidrogenasa, las subunidades I-III del citocromo oxidasa y 2 subunidades de la ATP sintasa. Los genes mitocondriales no tienen intrones (Moritz, Dowling y Brown 1987). El resto del genoma consiste de una región no codificante de aproximadamente 1,100 bp denominada región control, ubicada entre los genes del tRNA para prolina y fenilalanina, y pequeños segmentos intergénicos no codificantes. La principal región no codificante contiene el origen de replicación de una cadena, el origen de transcripción de ambas cadenas y el asa de desplazamiento (D loop) de ~680 bp (Horai et al. 1991). La replicación del mtDNA es unidireccional y altamente asimétrica (Moritz, Dowling y Brown 1987, Figura 4).

3.1 Ventajas del DNA mitocondrial en los Estudios Filogenéticos y Evolutivos.

El DNA mitocondrial presenta varias ventajas que están siendo explotadas en estudios filogenéticos y evolutivos; entre ellas están su pequeño tamaño, una alta velocidad de evolución y una forma materna de herencia (Ward et al. 1991., Hutchinson et al. 1974). Carece de recombinación permitiendo la determinación de divergencias filogenéticas entre los linajes, sin las ambigüedades causadas por el entrecruzamiento meiótico (Bailliet et al. 1994). En raras ocasiones ocurre recombinación en el mtDNA a una tasa baja en mamíferos. En humanos esta recombinación varía entre los individuos y entre los tejidos, siendo más frecuente en condiciones de stress oxidativo (Kajander et al. 2000., Dowton y Campbell 2001). La alta tasa de mutación permite una discriminación entre poblaciones cercanamente relacionadas (Torrioni et al. 1992). El mtDNA acumula los cambios de bases a una tasa 5-10 veces más rápida que el DNA nuclear de copia única (Bailliet et al. 1994), por lo cual es usado para hacer inferencias sobre la estructura e historia de las poblaciones (Hartl y Clark 1997. pp 187-189). El alto número de mitocondrias en las células de los mamíferos -aproximadamente de 1,000 a 10,000 por célula- significa que hay una mayor probabilidad de detectar DNA mitocondrial aún en muestras muy degradadas, como es frecuentemente el caso en los restos humanos. También los genes mitocondriales han sido extensamente utilizados para estudiar a las poblaciones por la simplicidad de la amplificación enzimática con *primers* universales y por la creencia de que las frecuencias de los genes están gobernadas principalmente por mutación y deriva génica (William et al. 1995). Además de las ventajas anteriores es importante añadir que el genoma mitocondrial humano ha sido secuenciado en su totalidad (Anderson et al. 1981). Esta primer secuencia del mtDNA humano es utilizada frecuentemente como un patrón de comparación en los estudios que analizan la variabilidad del genoma mitocondrial humano, por lo que se le ha denominado secuencia estándar.

Los principales problemas con el mtDNA son: 1.- La ausencia de recombinación del mtDNA hace que la construcción de árboles genéticos a partir de secuencias mitocondriales refleje una sola parte de la historia del proceso genealógico. Por lo anterior, los datos obtenidos a partir de secuencias mitocondriales no son tan informativos para la elaboración de árboles filogenéticos sobre poblaciones o especies como lo son los datos proporcionados por varios genes nucleares y 2.- Muchos de los estudios realizados con el mtDNA han sido utilizando la región control. Esta región es altamente variable, especialmente en sitios particulares donde las substituciones múltiples frecuentemente ocurren (Hartl y Clark 1997. pp 361-365), por lo que se debe considerar la probabilidad de que las mutaciones encontradas ahí se deban a eventos independientes y no a una herencia común.

3.2 Detección de Polimorfismos en el mtDNA por medio de Enzimas de Restricción.

Las endonucleasas de restricción cortan el DNA en sitios específicos definidos por secuencias de 4, 6, o rara vez más, nucleótidos (sitios de restricción). Mutaciones en estas secuencias pueden anular un sitio de corte, mientras que otras pueden generar un nuevo sitio de restricción. Los fragmentos resultantes de la restricción del DNA de un individuo se pueden separar de acuerdo a su tamaño por electroforesis. La variación del tamaño de los fragmentos resultantes en diferentes individuos de una población es llamada polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Hoy en día hay más de 2,000 sondas que son útiles para detectar polimorfismos. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa es utilizada para conocer los sitios polimórficos permitiendo que la secuenciación de los segmentos de interés sea más rápida y sensitiva (Cavalli- Sforza, Menozzi y Piazza 1996).

La utilización del mtDNA para establecer la filogenia de los grupos humanos modernos ha generado una controversia que continúa hasta la fecha

Cann et al. (1987), determinaron la variación de sitios de restricción en el mtDNA de 147 humanos de 5 grupos humanos con 12 endonucleasas de restricción que mostraron en promedio 370 sitios de restricción por individuo, un total de 195 sitios polimórficos y 133 distintos haplotipos del mtDNA con los cuales se creó un árbol filogenético. Se encontró un clado en el cual la rama más antigua apuntaba a un grupo de gente de origen africano. Asumiendo una tasa de divergencia del 2 al 4 % para el mtDNA; se estimó que un ancestro común a todos los haplotipos observados debió existir en África hace 140,000 a 280,000 años.

Los estudios iniciales de Cann et al. (1987), han sido criticados tanto por el tratamiento estadístico de los datos, como por el hecho de basar la reconstrucción del árbol filogenético en el análisis del mtDNA que, según algunos autores sería como utilizar un solo gen, lo cual haría al estudio sujeto de grandes errores estocásticos. Sin embargo, vale la pena añadir que otros estudios realizados por algunos de sus críticos como (Nei y Roychoudhury 1993), utilizando genes nucleares, han dado resultados similares.

Recientemente Ingman y colegas (2000), analizaron la secuencia completa del genoma mitocondrial de 53 individuos de diferentes zonas geográficas, raza y afiliación lingüística, encontrando un árbol filogenético en donde tres de las ramas basales conducen exclusivamente a África, por lo que aporta evidencia de que *Homo sapiens* se originó ahí. La cuarta rama contiene algunos individuos africanos y todos los individuos no-africanos, indicando que los primeros están cercanamente relacionados con Europeos y Asiáticos. Existe un fuerte soporte estadístico para la topología del árbol. Además estiman que la divergencia entre africanos y no-africanos ocurrió hace $52,000 \pm 27,500$ años (Ingman et al 2000).

III.4 Linajes Fundadores del mtDNA en Poblaciones Contemporáneas de América.

Durante los últimos diez años las técnicas de biología molecular han sido utilizadas en el estudio del poblamiento del Nuevo Mundo al analizar la variación del mtDNA en Nativos Americanos contemporáneos y antiguos.

Wallace et al. (1985), analizando el mtDNA con endonucleasas de restricción demostraron que todos los Nativos Americanos estaban cercanamente relacionados entre sí y con la población asiática, ya que presentaron algunos RFLPs característicos de asiáticos pero con una diferente frecuencia.

Schurr et al. (1990), propusieron que toda la variación del mtDNA de los Nativos Americanos puede provenir de sólo cuatro linajes fundadores identificados por utilizar 14 enzimas de restricción en el mtDNA de individuos pertenecientes a las tribus Ticuna (América del Sur), Mayas (América del Norte) y Pima (América del Norte). Además concluyeron que todos los Amerindios contemporáneos son descendientes de estos cuatro linajes.

Torroni et al. (1992), analizaron el mtDNA de 167 pobladores pertenecientes a tribus tanto del grupo Nadene como de indios Americanos. El análisis de restricción dio como resultado 50 haplotipos en los Nativos Americanos. Un haplotipo es un mtDNA caracterizado por un conjunto de mutaciones que se detectan como RFLPs. Las relaciones evolutivas entre los haplotipos se infirieron usando un análisis de parsimonia, y en el árbol filogenético resultante, estos 50 haplotipos se agruparon en cuatro grandes grupos (haplogrupos o linajes). Los haplotipos agrupados en cada linaje comparten un marcador común. Los linajes o haplogrupos fueron denominados A, B, C y D. El linaje A está definido por una transición de A por G en el nucleótido 663 de la secuencia de referencia del mtDNA (Anderson et al. 1981), lo cual crea la aparición de un sitio de reconocimiento de la enzima Hae III. El linaje B es característico por una delección de 9 bp cuya secuencia es CCCCTCTA y que en la secuencia de referencia en humanos está contenida

como dos copias en tándem entre los nucleótidos 8,272 - 8,289. Esta delección es debida a la pérdida de una de las dos copias de la secuencia de 9 bp, que se encuentra entre el gen de la citocromo oxidasa II y el tRNA para lisina. Todos los Amerindios que son linaje B presentan, además, un sitio de reconocimiento para la enzima Hae III en la posición 16,517. El linaje C está definido por una transición de A por G en el nucleótido 13,263 lo cual elimina el sitio de reconocimiento para la enzima Hinc II-13,259 y crea un sitio para Alu I-13,262. El linaje D está definido por una transversión de C por A en el nucleótido 5,178 ocasionando la pérdida del sitio Alu I-5,176 (Torrioni et al. 1992, 1993a, Figura 3).

Los cuatro linajes fundadores han sido encontrados en poblaciones Asiáticas en menor frecuencia. El linaje A y B son específicos para poblaciones Asiáticas y poblaciones descendientes de éstas, como los isleños del Pacífico y los Amerindios. Los linajes C y D son específicos de Asiáticos cuando están acompañados por la ganancia de los sitios Dde I-10,394 y Alu I-10,397 (Merriwether, Reed y Ferrell 1997). Los linajes A, B y C no han sido observados en Africanos y Caucásicos. El linaje D ha sido observado con menor frecuencia en Africanos pero no en asociación con la ganancia de los sitios Dde I en la base 10,394 y Alu I bp 10,397 (Torrioni et al. 1992).

Casi todos los Nativos Americanos pueden ser reconocidos por uno de los cuatro linajes, lo cual hace que estas mutaciones sean utilizadas frecuentemente como marcadores en estudios de poblaciones americanas contemporáneas o precolombinas (Stone y Stoneking 1993., Horai et al. 1993., Ward et al. 1991).

4.1 Análisis de la Secuencia de la Región Hipervariable I.

La región control del mtDNA humano acumula mutaciones a una tasa más rápida que otras regiones del genoma. No toda la región control presenta la misma tasa de cambio, pues contiene dos subregiones que son altamente variables denominadas región hipervariable I y II (HVI y II), separadas por una

región que tiene una tasa de cambio menor. En la región control se forma el asa de desplazamiento (D-Loop), la cual contiene la región hipervariable I (HVI), adyacente al gen del tRNA para prolina. La HVI acumula mutaciones a una tasa muy rápida por lo que permite la discriminación entre individuos cercanamente relacionados, por este motivo distintos autores la han utilizado en los estudios del mtDNA de Nativos Americanos (Ward et al. 1991., Horai et al. 1993., Torroni et al. 1993a., Stone y Stoneking 1998).

La secuencia de la HVI ha sido utilizada para caracterizar los haplotipos de los Amerindios. Cuatro grupos de investigación han empleado y secuenciado la HVI, permitiendo que se comparen los resultados obtenidos por cada grupo (Ward et al. 1991., Ginther et al. 1993., Horai et al. 1993a., Torroni et al. 1993). Existe un acuerdo entre estos autores en proponer que la gran mayoría de los linajes de los Amerindios pueden ser agrupados en tres o cuatro grupos, cada grupo puede ser caracterizado por una o dos transiciones específicas. De acuerdo a Bailliet et al. (1994), el análisis comparativo de los resultados de los anteriores autores indica la presencia de un quinto haplogrupo. La Tabla 2 muestra las mutaciones que definen a los haplogrupos mitocondriales de la región HVI. La numeración usada en la tabla (primera columna) corresponde a la de Horai et al. (1993), en la última columna de la tabla están indicados los haplotipos equivalentes identificados por otros autores.

4.2 Distribución de los Linajes Fundadores del DNA mitocondrial en América y Asia.

Greenberg en 1987 dividió todos los lenguajes del Nuevo Mundo en tres familias: Esquimales-Aleutianos, Nadene y Amerindios, además propuso que todos los lenguajes de los Amerindios pueden ser subdivididos en 11 principales grupos lingüísticos (Torroni et al. 1994).

En la Tabla 3 se muestran las frecuencias de los cuatro linajes fundadores del mtDNA determinadas en varias poblaciones contemporáneas nativas de América, además se especifica el número de individuos analizados,

el porcentaje de los cuatro linajes fundadores, el porcentaje de los individuos de cada población que no poseen ninguno de los cuatro linajes fundadores y que han sido agrupados en un grupo que se ha denominado en la literatura de distintas formas como: "otro", "E" y "N". Todos los haplotipos del grupo "otro" se presentan en una frecuencia muy baja en los Nativos Americanos. Por último en la tabla se muestran las referencias de los autores que realizaron los estudios.

En términos generales se aprecia en la (Tabla 3) que los Nadene son menos variables que los Amerindios. Que algunas tribus de México como son los Mixe, Mixtecos, y Zapotecos carecen del haplogrupo D, pero los dos primeros grupos étnicos muestran una alta frecuencia de los linajes A y B. En individuos Mayas de la península de Yucatán están presentes los cuatro linajes fundadores, en donde se determinó que el linaje con la mayor frecuencia es el A con 51.85%, luego le sigue el B con 22.22%, después el C con 14.81% y por último el D con 7.40 %. Los estudios realizados en algunas poblaciones contemporáneas de origen Mesoamericano sugieren, en términos generales, que el linaje más frecuente es el A, luego le sigue el B, después le sigue el C y el menos frecuente es el D.

Las frecuencias de estos mismos linajes en el continente Americano presentan una gran variabilidad en los distintos sitios geográficos, sin embargo Merriwether et al. (1995), han sugerido que el linaje A muestra una clara tendencia de decrecer su frecuencia de norte a sur, mientras el linaje B presenta una tendencia contraria. Aunque las frecuencias de los linajes C y D muestran mayor irregularidad, se ha sugerido que el linaje D es más frecuente en el sur que en el norte y el linaje C, en términos generales, sigue el mismo patrón (Lalueza et al. 1997).

Los haplogrupos A, B, C y D también están presentes en el este de Asia y han sido identificados entre Coreanos, Malayos, Chinos, Taiwaneses y Tibetanos pero con frecuencias más bajas que las que presentan las poblaciones del Nuevo Mundo (Lorenz y Smith 1996).

La delección de 9 bp que define el linaje B es menos frecuente en Norteamérica y más frecuente en Sudamérica. La delección de 9 bp está presente en el sudeste de Asia y en las islas del Pacífico y está ausente en Siberia. Se ha sugerido un modelo que plantea que la delección surgió en el norte de Asia, Mongolia o Siberia y se dispersó en dos migraciones separadas: una migración atravesó por el estrecho de Bering hacia Alaska y posteriormente se distribuyó en el Nuevo Mundo y la segunda migración atravesó por el sur de Asia y se dirigió a las islas del Pacífico (Melanesia, Micronesia y Polinesia). Estas dos migraciones procedentes de una región en común que se distribuyeron fuera de Asia y de Siberia intentan explicar la distribución de la delección de 9 bp en los dos continentes (Merriwether et al. 1995., 1997).

Torrioni et al. (1993b), muestran que en las poblaciones Siberianas y en aborígenes Australianos está ausente el linaje B, posiblemente, esta ausencia se debe a un evento migratorio que solo llevaba tres de los linajes, distinto del que se dirigió a las Americas con los cuatro linajes.

Por otro lado la región V del mtDNA donde ocurre la delección de 9 bp, es considerada un sitio "hot spot", por lo que se piensa que ésta pudo haber ocurrido varias veces de una manera independiente. Se ha observado la presencia de tres repetidos en tándem de la secuencia de 9 bp en Esquimales, Africanos de la Costa de Marfil y Siberianos. Estos datos sugieren una explicación distinta para las dos distribuciones de la delección de 9 bp en el Nuevo Mundo, en Asia y Oceanía. Esto es, que la delección de 9 bp ha surgido separadamente en el Nuevo Mundo y en Asia extendiéndose independientemente en cada continente (Torrioni et al. 1992).

4.3 Linajes Fundadores del mtDNA en Poblaciones Antiguas de América.

Stone y Stoneking (1998), analizaron la variación del mtDNA en una población precolombina con una antigüedad de 1,300 años del cementerio Norris Farms formada por 152 individuos. El análisis de restricción determinó

que 102 individuos (67.1%) fueran asignados a uno de los cuatro linajes fundadores A, B, C y D, apoyando la hipótesis de que estos linajes están involucrados en la colonización original del Nuevo Mundo. Seis individuos (3.9%) que no poseen ninguno de los 4 marcadores fueron asignados a un grupo denominado "otros" y las restantes 44 muestras (29%) no contuvieron suficiente DNA para el estudio. El análisis de la secuenciación de la región hipervariable I de la región control de 52 individuos, demostró la presencia de los cuatro haplogrupos de la región D-Loop. Doce individuos se clasificaron como linaje A, 7 fueron linaje B, 25 linaje C, 5 linaje D (Stone y Stoneking 1993., 1998, Tabla 4).

Parr y O'Rourke (1996), analizaron 47 Amerindios de la cultura Fremont de la región pantanosa del Gran Lago Salado, esta población tiene una antigüedad entre 400-1,350 años. No se encontró el linaje A, el cual predomina en Amerindios contemporáneos, el linaje B estuvo presente en una alta frecuencia del 60%, y los linajes C y D estuvieron presentes en bajas frecuencias. Dos individuos no poseen ninguno de los linajes fundadores por lo que fueron agrupados como haplogrupo N (Tabla 4).

Merriwether et al. (1997), estudiaron individuos de la ciudad Maya de Copán, de Honduras. En esta población se encontraron solo los linajes C y D. Los Mayas contemporáneos de México son predominantemente linajes A y B, con bajas frecuencias de C y D. Los autores sugieren que la discrepancia en las frecuencias entre los Mayas antiguos y contemporáneos puede deberse al número pequeño de individuos estudiados de la población antigua o a mezcla de la población contemporánea con grupos nativos no Mayas de los alrededores pero también estas dos diferentes frecuencias pueden estar reflejando que las dos poblaciones representan diferentes grupos lingüísticos Mayas, indicando el nivel de variación dentro de la cultura Maya (Tabla 4) La realización de más estudios en otras poblaciones Mayas es necesaria para dilucidar ésta hipótesis (Merriwether, Reed y Ferrel 1997)

Lalueza et al. (1997), estudiaron 75 individuos de la Tierra del Fuego-Patagonia en América del Sur pertenecientes a tribus extintas entre los siglos XIX y XX. El análisis con las endonucleasas de restricción y la secuenciación de la región control, demostró la ausencia de los linajes A y B y la presencia de los linajes C y D con las frecuencias de 38% y 60% respectivamente. Los autores proponen que estos resultados junto con la disminución del linaje A hacia el sur del continente Americano y la ausencia del linaje B por arriba de los 55° al norte de América y Asia, indican que los primeros Paleoindios que migraron hacia América del Sur carecían de los linajes A y B (Tabla 4).

Ribeiro-Dos-Santos A et al. (1996), analizaron la región hipervariable I en 18 esqueletos de Amerindios Pre-Colombinos de la región del Amazonas en Brasil con una antigüedad entre 500-4,000 años. 11 individuos (61% de la muestra) pertenecen a uno de los cuatro haplogrupos D-Loop descritos por Horai et al. (1993). Tres muestras presentan la transición de C por T en las posiciones 16,223 y 16,278 formando un quinto haplogrupo, el cual ha sido previamente descrito en poblaciones indígenas contemporáneas por Ward et al. (1991). Y cuatro muestras forman un grupo heterogéneo. Los autores proponen asumiendo que la muestra es representativa de individuos precolombinos de América del Sur, que el porcentaje de haplotipos (39%) que no pertenecen a los cuatro haplogrupos D-Loop descritos por Horai es mayor en ésta población que en las poblaciones indígenas contemporáneas. Lo cual les ha permitido sugerir en relación al efecto de cuello de botella ocurrido durante la migración de Asia a las Américas, que el efecto de despoblación comenzó por la colonización europea en el siglo XVI contribuyendo a la reducción en la variabilidad genética de los Amerindios

Nosotros consideramos que los resultados de este grupo de investigación deben tomarse en cuenta con cierta limitación, ya que los autores asignan a que linaje fundador pertenecen los individuos por basarse únicamente en las mutaciones presentes en la región hipervariable I.

4.4 Quinto Linaje Fundador del mtDNA.

En los Nativos Americanos los haplotipos que se han agrupado bajo el nombre de "otros", "haplogrupo E" y "linaje N" no poseen ninguno de los 4 marcadores específicos. Se ha detectado que algunos de estos haplotipos son muy frecuentes en asiáticos (75%, Cann, Stoneking y Wilson 1987., Baillinger et al. 1992), y en siberianos (27%, Torroni et al. 1993b). Por lo tanto es evidente la posibilidad de un ancestro asiático para algunos de estos haplotipos (Bailliet et al. 1994).

La presencia de un quinto linaje en las Américas es sustentada por un linaje encontrado en dos individuos prehispánicos de la población Norris Farms. El linaje 24 no posee ninguno de los cuatro marcadores característicos de los haplogrupos A-D definidos por Schurr et al. (1990). Este linaje no parece ser el resultado de una contaminación. El linaje posee mutaciones en el nucleótido 16,223 y en el 16,278, esta última mutación Bailliet et al. (1994), sugieren como característica de un quinto linaje en los Nativos Americanos. Los autores proponen que este quinto linaje corresponde al grupo I en los Nuu-Chah-Nulth y Yakima que son caracterizados por una transición en el 16,278 de la región HVI. Torroni y Wallace (1995), dudan de la evidencia del quinto linaje, indicando que la ausencia de alguno de los marcadores característicos puede ser el resultado de mezcla o de una segunda mutación que rompe el sitio de restricción, por lo que no se trata de un haplotipo Asiático adicional que llegó al Nuevo Mundo.

Para Stone y Stoneking (1998), fue difícil determinar si el linaje 24 pertenece al mismo haplogrupo de los Nuu-Chah-Nulth o representa un sexto grupo de linajes. Ya que el análisis filogenético algunas veces coloca el linaje 24 dentro de un grupo con los linajes de los Nuu-Chah-Nulth y otras veces lo coloca separado de estos. Todos los linajes de los Nativos Americanos analizados muestran mutaciones en el nucleótido 16,223 y 16,278 pero el linaje 24 de Norris Farms además presenta mutaciones en los nucleótidos 16,093 y 16,357. Todas estas mutaciones están presentes en algunos linajes de Mongoles (Stone y Stoneking 1998).

También en el análisis de la región HVI de Amerindios Pre-Colombinos de Brazil se encontraron cuatro haplotipos que presentaban la transición de C por T en el nucleótido 16,223 y en el 16,278. Estas transiciones han sido detectadas en bajas frecuencias entre negros, caucásicos y asiáticos. Entre los Amerindios las mutaciones han sido detectadas en la tribu Pima en asociación con el haplogrupo I, en la tribu Krahó en asociación con el haplogrupo III (Ribeiro-Dos-Santos et al. 1996).

Distintos estudios realizados parecen sugerirnos la presencia de un quinto linaje fundador que llegó a América con los otros cuatro linajes fundadores del mtDNA. Probablemente este quinto linaje esté presente entre los haplotipos que han sido agrupados bajo el nombre de "otros". Para Stone y Stoneking el linaje 24 puede ser el quinto haplotipo fundador, el cual estaba presente en una baja frecuencia, motivo que ha dificultado su plena identificación. Hasta hoy el número de linajes fundadores en América, el número de migraciones hacia el Nuevo Mundo y el tiempo de la colonización de éste es un tema controvertido que está en debate.

4.5 Haplotipos Compuestos.

Los haplotipos compuestos están formados por la coexistencia de dos o más de los haplotipos del A al D en un individuo como son A/B, A/C y A/D, éstos están presentes en bajas frecuencias en poblaciones Amerindias así como en Asiáticos y Siberianos (Bailliet et al. 1994). El mtDNA no sufre recombinación, por lo tanto se piensa que los haplotipos compuestos pueden originarse por mutaciones paralelas que ocurrieron independientemente en el continente asiático y americano. También se puede pensar que los haplotipos compuestos originados por mutaciones paralelas en Asia entraron a América durante la colonización del continente y la baja frecuencia con la que se presentan en los indios americanos puede indicar que están en proceso de perderse por efecto de la deriva génica (Bailliet et al. 1994).

De los 1,102 individuos examinados en Siberia y en el Nuevo Mundo solo 11 tienen haplotipos compuestos es decir menos del 1 % (Lorenz y Smith 1996).

III.5 Justificación.

Un análisis de individuos Mayas contemporáneos de la península de Yucatán demuestra la presencia de los cuatro linajes fundadores del mtDNA en esta población. Los Mayas contemporáneos son predominantemente linajes A y B con bajas frecuencias de los linajes C y D. Datos publicados en otras poblaciones nativas americanas contemporáneas de origen Mesoamericano muestran que el linaje A es el más frecuente, los linajes B y C están en bajas frecuencias y el linaje D ausente.

Sin embargo los Mayas prehispánicos de Copán, Honduras, son completamente tipificados por los linajes C y D. Para contribuir al entendimiento de este contraste entre las frecuencias de los linajes fundadores del mtDNA presentes en las dos poblaciones Mayas analizamos la frecuencia de los cuatro linajes fundadores del mtDNA en una población Maya antigua, distinta de las anteriores, para determinar la relación que estos pobladores ancestrales guardan entre sí y con los Mayas actuales y, de esta manera, contribuir a resolver la controversia que existe

Para este estudio se seleccionó una muestra de 28 individuos prehispánicos del periodo Clásico (600 d.C. a 800 d.C.) y Post-Clásico (900 d.C. a 1521 d.C.), del acervo osteológico de la Escuela Nacional de Antropología e Historia del Instituto Nacional de Antropología e Historia; los restos óseos provienen de las excavaciones arqueológicas realizadas por el INAH en el sitio de Xcaret, Quintana Roo.

IV OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto fue analizar la frecuencia con que se presentan los cuatro Linajes Fundadores (Haplogrupos) de Amerindios entre pobladores prehispánicos del área maya de Xcaret, Quintana Roo.

Los objetivos particulares que se plantearon son los siguientes:

- 1.- Estandarizar los métodos de extracción y purificación de DNA de los restos óseos de la población Maya.
- 2.- Caracterizar los linajes A, C y D por análisis de restricción.
- 3.- Caracterizar el linaje B por análisis electroforético.
- 4.- Análisis de secuenciación de los productos de amplificación por PCR para comprobar que la región amplificada es la predicha y para corroborar el resultado obtenido por el análisis de restricción en algunas muestras.

V METODOLOGÍA

5.1 Selección y Limpieza de las Muestras.

Los restos óseos utilizados en este estudio fueron proporcionados por la Dra. Lourdes Márquez Morfín de la Dirección de Antropología Física y el Antropólogo José Concepción Jiménez de la Escuela Nacional de Antropología e Historia, ambas dependencias del INAH.

Se seleccionaron un total de 28 individuos que pertenecen a una colección de restos óseos que se recuperaron del grupo B de Xcaret, Quintana Roo en 1990 por M. J. Con (Con 1991a). La cronología del sitio y el estudio de los objetos asociados a los entierros, indican que corresponden a los períodos Clásico Tardío (600-800 d.C.) y Post-Clásico (900-1521 d.C., Tiesler 1999).

La colección de huesos se encontraba guardada en cajas de cartón de 60x40x20 cm. Los restos óseos habían sido limpiados superficialmente en seco, mediante el uso de brochas y pinceles suaves, marcados con tinta china protegida por una capa de laca y guardados en bolsas de plástico etiquetadas. Seleccionamos 2 huesos de cada individuo, vértebras y/o costillas que no mostraran una reconstrucción con adhesivos especiales como el Mowithal. Estos huesos se utilizaron en la recuperación del DNA antiguo.

En este tipo de estudios uno de los principales problemas es la contaminación con DNA actual, proveniente de quienes han excavado, manejado y estudiado los huesos. Por este motivo todas las muestras fueron exhaustivamente limpiadas con un cepillo previamente lavado con blanqueador doméstico de cloro, enjuagado con agua ultrapura, horneado a 100 °C y esterilizado con luz UV. Posteriormente, se eliminó la capa superficial del hueso raspándola con una navaja estéril nueva. Los huesos ya limpios se irradiaron con luz UV a 254 nm durante aproximadamente 3 minutos en un CL- 1000 Ultraviolet Crosslinker. Las muestras se molieron en un mortero estéril hasta ser reducidas a un polvo fino, a partir del cual se llevó a cabo la extracción del DNA. Todo este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar provista de un filtro

absoluto de 0.3 μm , que proporciona un flujo constante de aire libre de partículas. Estos procedimientos se realizaron en un laboratorio donde no se trabaja con DNA humano y que está ubicado en un piso distinto del laboratorio donde se realizó la extracción del DNA antiguo, con la finalidad de reducir el riesgo de acarreo de los productos de amplificación a las zonas donde se preparan las muestras; esta separación física ha sido propuesta cuando se trabaja con DNA antiguo y existen diferentes grupos de investigación que la realizan (Stone y Stoneking 1998., Pääbo, Higuchi y Wilson 1989., Höss, Handt y Pääbo 1994).

5.2 Medidas Preventivas.

Para prevenir una posible contaminación con DNA moderno dentro del laboratorio. Realizamos las siguientes medidas preventivas. Para todos los procedimientos que se describen aquí siempre se utilizó tubos y puntas con filtro nuevas (os) y estériles. Todo el material de cristalería fue lavado con HCl 1N o solución de hipoclorito de sodio (blanqueador de cloro al 10%), enjuagado con agua ultrapura y autoclaveado a 132 °C por 30 minutos. Se usó cofia, cubreboca, bata limpia y guantes nuevos que fueron frecuentemente cambiados. El Agua ultrapura se obtuvo del desionizador Milli-Q Plus, también se autoclaveó a 132 °C por 30 minutos y se utilizó en la preparación de amortiguadores y otros reactivos que después de su elaboración se esterilizaron, excepto, aquellos que contenían alguna sustancia desnaturalizable. Los reactivos utilizados en las extracciones del DNA antiguo fueron de la marca Sigma Chem. y Gibco BRL grado biología molecular. Los reactivos necesarios para realizar el PCR se adquirieron de Perkin Elmer (PE) Biosystems y Gibco BRL., y los utilizados para realizar la secuenciación, de Amersham Life Science.

5.3 Extracción de DNA de Restos Óseos.

Fue necesario determinar las condiciones específicas que permitieran obtener una preparación óptima de DNA a partir de restos óseos, por lo que se probaron, optimizaron y montaron en nuestro laboratorio distintas metodologías descritas en la bibliografía o estandarizadas por otros autores que habían

mostrado ser efectivas en estudios similares (Muñoz et al. 2001., Krings et al. 1997., Walsh, Metzger y Higuchi 1991., Woodward et al. 1994). El método que más frecuentemente se empleó para extraer el DNA es una modificación del propuesto por Pääbo et al. (1988), que amablemente nos proporcionó la doctora María de Lourdes Muñoz del CINVESTAV. En esta técnica se utilizó 1 gramo de polvo de hueso, se adicionó un amortiguador de lisis con (0.1 M EDTA, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), además, se adicionó fenol, fenol-cloroformo-acetato de sodio 3M, y se precipitó el DNA con etanol absoluto y acetato de sodio.

Con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de DNA antiguo que fuera posible se realizó una re-extracción del polvo de hueso, después de resuspenderlo en 10 ml de buffer de lisis.

5.4 Purificación del DNA Extraído de Restos Óseos.

Uno de los problemas metodológicos más frecuentemente encontrados en los estudios del DNA antiguo es la presencia de sustancias contaminantes en los extractos de DNA obtenidos de los restos óseos que inhiben la reacción en cadena de la polimerasa (Pääbo 1989., Tuross 1994., Hagelberg 1994). Estos inhibidores co-precipitan con el DNA antiguo y no son eliminados por la precipitación con etanol absoluto en la técnica de extracción que anteriormente se mencionó. Por este motivo fue necesario purificar el DNA. Éste se corrió en un gel de agarosa al 1% en un amortiguador de Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) y la banda de alto peso molecular y/o el barrido de DNA degradado que se observó, fueron cortados y purificados con el kit GeneClean de (Bio 101), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se procesaron en paralelo los controles negativos de purificación los cuales contienen bandas de agarosa sin DNA que se purifican con el mismo Kit. El proceso de purificación se realizó en una campana de flujo laminar equipada con un filtro absoluto de 0.3 μm . Las cámaras de electroforesis fueron previamente lavadas con blanqueador doméstico de cloro al 10% e irradiadas con una lámpara de luz UV.

Otro método que se utilizó ampliamente para extraer el DNA antiguo del polvo de hueso fue descrito por Krings et al. (1997). En esta técnica se utilizó aproximadamente 0.4 g de polvo de hueso, se adicionó un amortiguador de lisis con (0.5 M EDTA pH 8.0 y 5 % N`laurilsarcosina), se adicionó Proteinasa K y se incubó el DNA con sílica en presencia de isotiocianato de guanidina 5 M. La técnica se basa en la afinidad del DNA por la sílica.

Con menor frecuencia se utilizaron los siguientes dos métodos: a) la resina Chelex-100, que tiene afinidad por los metales polivalentes, los cuales pueden catalizar el rompimiento del DNA durante la fase de extracción por el calentamiento; el Chelex secuestra los metales permitiendo la recuperación del DNA antiguo. Además, la resina es fácilmente eliminada, por lo que no interfiere con las amplificaciones subsecuentes por PCR. En esta técnica se utiliza de 1 a 10 mg de polvo de hueso (Walsh, Metzger y Higuchi 1991., Woodward et al. 1994). b) el kit Blood and Cell Culture DNA (Qiagen); se siguió el protocolo recomendado por los fabricantes utilizando de 100 a 150 mg de polvo de hueso.

El orden en el cual se utilizaron los métodos para explorar cada muestra fue el anteriormente descrito. Primero se usó la técnica de (Muñoz et al. 2001), cuando no se recuperaba el DNA entonces se probaba el siguiente método y así sucesivamente hasta obtener un DNA amplificable con los distintos marcadores.

Durante el procedimiento siempre se procesaron en paralelo los controles de extracción negativos los cuales contienen todos los reactivos excepto polvo de hueso.

En algunos casos se realizaron 2 o 3 extracciones de un mismo individuo, utilizando la misma o diferentes técnicas.

Se realizaron extracciones a partir de un hueso del individuo para analizar los linajes A, C y D. Se hicieron extracciones de otro hueso para el linaje B.

Todos los procedimientos de extracción se realizaron en una campana de flujo laminar equipada con un filtro absoluto de 0.3 μm . En las extracciones se usaron micropipetas exclusivamente dedicadas a este proceso.

5.5 Extracción de DNA de Individuos Contemporáneos.

Los métodos para extraer DNA a partir de tejidos vivos están bien establecidos (Sambrook, Fritsch y Maniatis 1989. pp 6.34-6.35, E.3-E.4), y se han utilizado con pequeñas variaciones en un sin número de casos.

Con la finalidad de contar con controles positivos durante el proceso de amplificación por PCR, se recuperó DNA de sangre fresca de varias personas, algunas son miembros del laboratorio, utilizando el método propuesto por Sambrook et al. (1989. pp 6.34-6.35).

5.6 Amplificación de Segmentos Específicos por PCR.

Debido a que el DNA extraído de restos humanos arqueológicos se encuentra generalmente degradado en fragmentos de 100 a 200 pares de bases de longitud, se amplificaron segmentos específicos de DNA mitocondrial de longitud menor a 250 pares de bases, que contenían los marcadores Hae III-663., Delección de 9 bp 8,272-8,289., Hinc II-13,259 y Alu I-5,176 para los linajes A, B, C y D respectivamente. En estas amplificaciones se utilizaron los *primers* que se muestran en la Tabla 5. El par de *primers* utilizados para los linaje A y C fueron los propuestos por Stone y Stoneking (1993), los utilizados para el linaje B y D fueron ligeramente modificados de los anteriores autores, nosotros adicionamos dos nucleótidos al *primer* H-8295-8316 y al L-5101-5122 para incrementar la especificidad de la reacción de amplificación al realizar la alineación de los *primers* al molde a una temperatura más alta. Además nosotros diseñamos un juego de *primers* para el linaje C que incrementan la temperatura de alineación y permiten amplificar un fragmento más pequeño.

La mezcla de reacción para la PCR contenía, en un volumen final de 25 μ l: 100 μ M de cada dNTP, 0.1 μ M de cada primer, 2.5 μ l del amortiguador 10 X suministrado por el fabricante (PE Biosystems), 0.1 mg/ml de BSA, 1.5 mM de $MgCl_2$ para los linajes A, B y C o 3.5 mM para el linaje D, 1.5 unidades del fragmento Stoffel de la DNA polimerasa. La cantidad del DNA molde fue variable y se ajustó individualmente para cada muestra.

Las mezclas de reacción para la PCR de algunos productos seleccionados para secuenciarse fueron realizadas en un volumen final de 100 μ l, estas contenían los mismos reactivos en las cantidades necesarias para el volumen realizado, las concentraciones finales son las mismas a las mencionadas para las mezclas realizadas en 25 μ l.

Los programas que se utilizaron en el termociclador Perkin Elmer 2400 para cada linaje son:

	A		B		C		D	
	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo	°C	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94	3'	94	3'	94	3'	94	3'
Desnaturalización	94	30"	94	30"	94	30"	94	30"
Alineación	63	1'	52	1'	57 o 60	1'	55	1'
Elongación	72	1'	72	1'	72	1'	72	1'
No. de ciclos	40		40		40		40	
Elongación Final	72	7'	72	7'	72	7'	72	7'

En cada amplificación por PCR se incluyeron los controles negativos de extracción, los controles negativos de purificación y los controles negativos de PCR que contienen todos los reactivos excepto molde.

Los resultados de la amplificación fueron corroborados en reacciones de amplificación separadas del mismo extracto o de extractos diferentes que se realizaron por duplicado o triplicado del mismo individuo.

Todas las reacciones del PCR se prepararon en una campana de flujo laminar que tiene un filtro absoluto de 0.3 μ m, que se encuentra en un cuarto separado físicamente de donde se manejan los productos de PCR.

5.7 Análisis Electroforético.

Al terminar la PCR los productos de los linajes A, C y D fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 12% en amortiguador de Tris-Borato-EDTA (TBE 1 X) (Sambrook, Fritsch y Maniatis et al. 1989. pp 6.36-6.44), aplicando 12 µl de la mezcla de cada reacción. Los productos del linaje B fueron analizados en un gel de poliacrilamida al 14% con las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se determinó el tamaño de los productos por compararlos con un marcador de tamaño molecular conocido ϕ - X174 cortado con Hae III (Gibco BRL).

A continuación se muestra cuales son las dos copias de 9 bp que están presentes en la secuencia estándar del mtDNA (Anderson et al. 1981), y la secuencia que presenta la delección de 9 pb que definen el linaje B. También se muestran los tamaño esperados de los productos de amplificación.

Secuencia estándar	5'-CACCCCCTCTACCCCCTCTAGAG-3'	= 121 bp.
Secuencia corta	5'-CACCCCCTCTAGAG-3'	= 112 bp.

5.8 Análisis de Restricción.

Doce µl de cada producto de PCR de los linajes A, C y D fueron incubados a 37 °C toda la noche con 5 unidades de la enzima de restricción específica para cada linaje (Hae III, Hinc II y Alu I respectivamente). Posteriormente el producto de la digestión se analizó en un gel de poliacrilamida al 12% como se describió arriba.

A continuación se muestra cual es la secuencia específica que reconoce cada enzima de restricción, la secuencia estándar del mtDNA en humanos (Anderson et al. 1981), la secuencia con la base que cambia o muta lo que origina la presencia o la pérdida de un sitio de reconocimiento para la enzima y el sitio donde corta.

Linaje A

Secuencia reconocida por la enzima Hae III y el sitio de corte:



Secuencia estándar 5'-TAGCCT-3'

Secuencia mutada 5'-TGGCCT-3'

Hae III-663 es una Ganancia.

Linaje C

Secuencia reconocida por Hinc II y el sitio donde corta:



Secuencia estándar: 5'-GTCAACT-3'

Secuencia mutada: 5'-GTCAGCT-3'

Hinc II-13,259 es una pérdida.

Linaje D

Secuencia reconocida por Alu I y sitio donde corta:



Secuencia estándar: 5'-AAGCTA-3'

Secuencia mutada: 5'-AAGATA-3'

Alu I- 5,176 es una pérdida.

En la Tabla 6 se muestra el tamaño de los productos de PCR y el tamaño de los fragmentos de restricción esperados para cada marcador.

5.9 Purificación de Productos de PCR para Secuenciación.

Los productos de PCR que se secuenciaron fueron corridos en un gel de poliacrilamida al 12 o 14%, la banda deseada fue cortada y purificada por el método descrito por Sambrook et al. (1989. pp 6.46-6.48). Estos productos se secuenciaron con el Kit de Thermo Sequenase (Amersham) como se menciona abajo.

Alternativamente otros productos de PCR en solución fueron purificados por el kit de purificación Concert Rapid PCR (Gibco BRL) y secuenciados en un secuenciador automático.

5.10 Secuenciación del DNA.

La secuenciación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo por el método de terminación de la cadena por didesoxinucleótidos (Sanger, Nicklen y Coulson. 1977). Diez μl de los productos purificados fueron secuenciados con el Kit de Thermo Sequenase. La reacción de marcado consistió en colocar el DNA de los productos purificados en tubos de PCR y adicionarles a cada uno 2 μl del amortiguador de reacción, 1 μl de los mismos *primers* empleados para las amplificaciones por PCR (uno en cada tubo), 1 μl de 7-deaza-dGTP cycle mix, 1 μl dCTP cicle mix, 1 μl dTTP y 0.5 μl $\{\alpha\text{-}^{35}\text{S}\}$ dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) y 2 μl de Thermo Sequenase DNA polimerasa. Los tubos se colocaron en el termociclador modelo PTC-100TM de M. J. Research, Inc. con un programa de la siguiente forma: 95°C/15 s y 60°C/ 30 s durante 60 ciclos. Mientras se realizaba la reacción de marcaje y extendido del *primer*, separadamente en cuatro tubos diferentes se colocaron 4 μl de los didesoxinucleótidos ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP.

Al concluir la reacción de marcado del *primer*, 3.5 μ l de ésta se colocaron en los tubos que contenían a los didesoxinucleótidos y siguiendo las recomendaciones de los fabricantes se realizó la secuenciación.

Las dos cadenas del mtDNA fueron secuenciadas. Los productos de la reacción fueron separados por la electroforesis de secuencia como se describe abajo. Las secuencias manuales fueron realizadas por la autora en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la supervisión del Dr. Juan Pedro Laclette San Román y la M. en C. Patricia De La Torre.

La secuenciación automática se realizó en un secuenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystems) utilizando el kit de secuenciación ABI Prism BigDye terminator (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante, ambas cadenas del mtDNA se secuenciaron. Estos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

5.11 Electroforesis de un Gel de Secuencia.

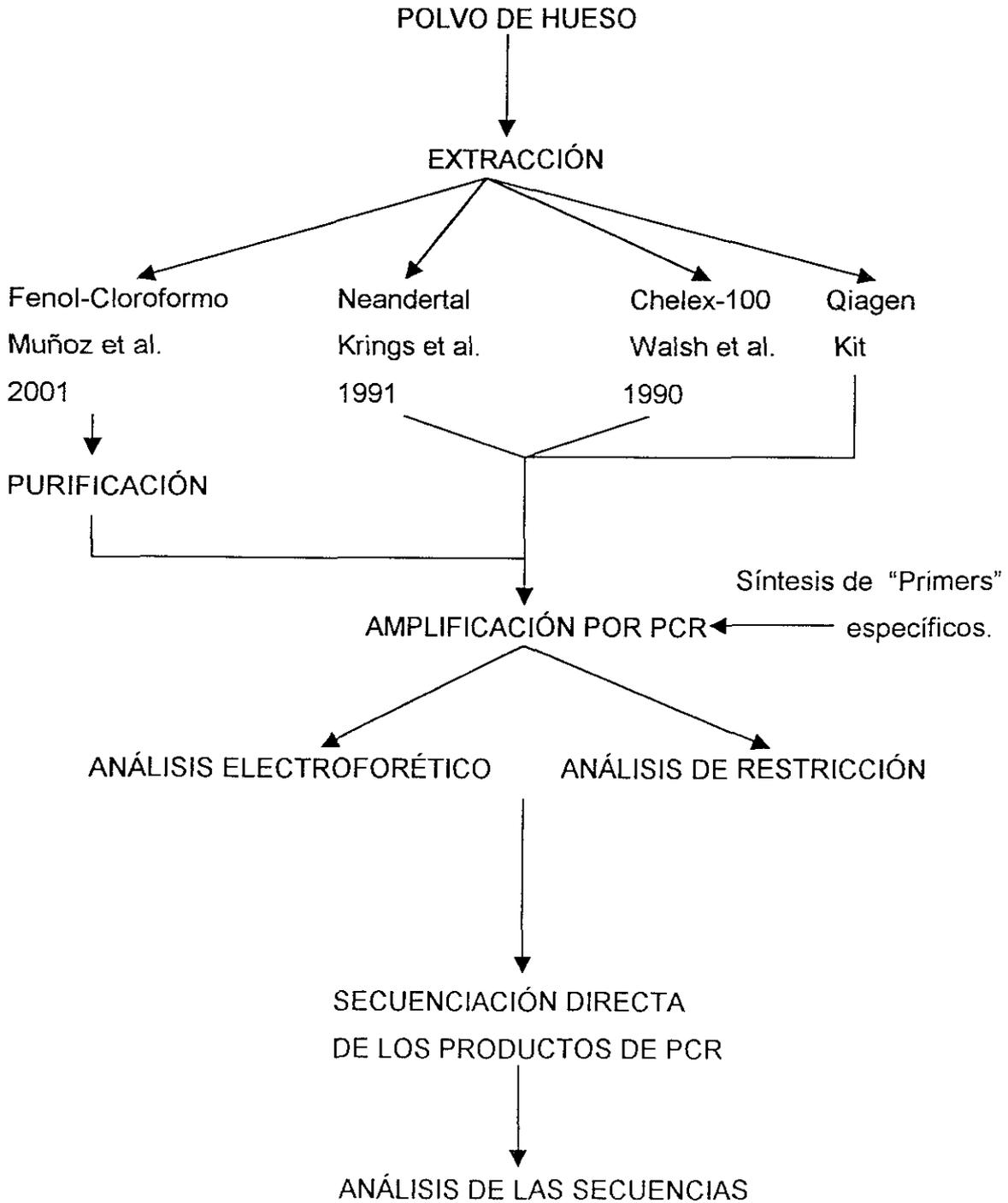
Las muestras de reacción fueron previamente calentadas a 80°C durante 2 minutos y cargadas en un gel de poliacrilamida al 6%, compuesto por 30 g de urea ultrapura, 14 ml de agua, 9.5 ml de acrilamida al 38%, 12 ml de TBE 5X, 550 μ l de persulfato de amonio 50 mg/ml y 20 μ l de temed. Antes de colocar las muestras se efectuó una precorrida de 45 minutos a 1,400 voltios y 40 miliamperios, para calentar el gel a 55°C. Después de la corrida el gel fue fijado, secado y expuesto a autoradiografía para revelar las secuencias.

5.12 Análisis de las Secuencias.

Las secuencias obtenidas fueron editadas y comparadas con la secuencia estándar del mtDNA humano. Además, las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias del GenBank utilizando el programa de computación Blastn, de esta manera, se obtuvo el porcentaje de similitud que presenta cada secuencia con la secuencia estándar del genoma mitocondrial

humano. Posteriormente se calculó la similitud promedio de las secuencias de los individuos para cada marcador genético.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.



VI RESULTADOS

6.1 Datos Generales de los Individuos Mayas de Xcaret.

Se analizaron 28 restos óseos individuales que se recuperaron en 1990 del grupo B de Xcaret, Quintana Roo. El análisis morfométrico de los 28 individuos fue realizado con anterioridad por la antropóloga Tiesler (1999), quien determinó que 4 individuos son infantiles, 22 son adultos y por el problema del deterioro osteológico no asignó un rango de edad en 2 individuos. Además, identificó que 6 individuos son mujeres y 10 son hombres, los restantes doce no presentaban atributos morfológicos que permitieran clasificarlos claramente, por lo que se desconoce el sexo de éstos. La cronología del sitio indica que 7 individuos corresponden al período Clásico Tardío (600-800 d.C.) y 16 al Post-Clásico (900-1521 d.C.), en los restantes 5 individuos no fue posible determinar la ubicación cronológica debido a la carencia de información correspondiente de los parámetros empleados (Tiesler 1999).

6.2 Extracción y Purificación de Restos Óseos.

Para realizar este estudio se optimizaron en el laboratorio 4 diferentes técnicas de extracción y purificación de DNA antiguo. El motivo por el cual se usaron 4 métodos distintos fue debido a la imposibilidad de recuperar el DNA antiguo de todas las muestras utilizando una sola técnica, de hecho, generalmente se realizan varios intentos antes de obtener el DNA.

Para comprobar la reproducibilidad de nuestros métodos, recuperamos DNA del mismo individuo (entierro 35 de Tlatelolco) por tres métodos distintos de extracción: el de Muñoz et al. 2001, Krings et al. 1991, y con el Kit de Qiagen. Con el DNA recuperado se amplificó la región que contiene el marcador Alu I-5,176 y se realizó el análisis de restricción que determinó la presencia del linaje D en el individuo. Éste mismo resultado se obtuvo con los tres métodos utilizados. Posteriormente estos resultados fueron verificados por secuenciación directa (ver abajo).

Utilizando la técnica de Muñoz et al. 2001 en los 28 individuos nosotros logramos extraer y purificar el DNA antiguo de 26, de los cuales logramos amplificar 23 con el marcador genético Hae III-663, 22 con el marcador Hinc II-13,259 y 24 con el marcador Alu I-5,176. De dos individuos no fue posible recuperar el DNA. (Figura 5 y 6). El porcentaje de éxito en la recuperación del DNA antiguo amplificable con esta técnica fue del 93 %.

Utilizando la técnica de Krings et al. (1991), logramos extraer el DNA antiguo en 24 muestras individuales y amplificarlo de 5 muestras con el marcador Hae III-663, de 22 con el marcador de la deleción de 9 bp 8,272-8,289, de 9 con el marcador Hinc II-13,259 y de 1 con Alu I-5,176; no fue necesario explorar los individuos restantes con está técnica pues ya se habían tipificado con la técnica de Muñoz et al. 2001. El porcentaje de éxito en la recuperación del DNA antiguo amplificable con esta técnica fue del 92 %.

Las técnicas del Chelex-100 (Walsh, Metzger y Higuchi 1990), y Qiagen solo se utilizaron en un número limitado de individuos que no habían sido tipificados con las dos técnicas anteriormente mencionadas. Por lo cual no es posible determinar el porcentaje de éxito en la recuperación del DNA antiguo amplificable con estos métodos.

Todas las extracciones que se realizaron para amplificar el DNA con los tres marcadores genéticos: Hae III-663, Hinc II-13,259 y Alu I-5,176 que definen los linajes A, C y D respectivamente, fueron utilizando el mismo hueso de cada individuo. Para la amplificación de la deleción de 9 bp 8,272-8,289 que define el linaje B se usó un hueso distinto al anterior.

Independientemente de la técnica utilizada y del número de extracciones realizadas nosotros pudimos amplificar el DNA con los cuatro marcadores genéticos de 25 individuos de los 28. Debido a que las técnicas empleadas no permiten obtener un resultado positivo con todas las muestras analizadas.

Todos los controles de extracción y de purificación negativos que se realizaron en los experimentos de la Tabla 7 fueron siempre negativos indicando la ausencia de una contaminación con DNA moderno en la muestra. En raras ocasiones tuvimos un control positivo por lo que el experimento entero fue eliminado.

6.3 Extracción de DNA y Linajes Fundadores en Individuos Contemporáneos.

Se extrajo el DNA de sangre fresca de 6 individuos con la técnica de Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989 pp 6.34-6.35), con la finalidad de incluir controles positivos en las amplificaciones con PCR. De cinco personas (excluyéndome) se seleccionaron 2 como los controles a utilizar debido a que presentaron productos de amplificación de mejor calidad. Cuatro de los 6 individuos somos miembros del laboratorio. También se determinó por análisis de restricción el linaje fundador del mtDNA que presentan los individuos.

Linajes fundadores de los individuos contemporáneos.

Muestra	Linaje
Guadalupe	A
Miguel Angel	A
Isabel*	B
Andrea*	A
Alfonso*	Otro
Angélica*	A

* Miembros del laboratorio.

6.4 Análisis de Electroforesis de los Productos de PCR de Mayas Prehispánicas y el Análisis de Restricción.

El análisis electroforético realizado en geles de poliacrilamida al 14% permitió identificar el tamaño de los productos de amplificación de los individuos analizados al compararlos con un marcador de tamaño molecular conocido y determinar la presencia del linaje B en los individuos Mayas prehispánicos (Figura 7).

El análisis de restricción de los productos de amplificación por PCR determinó la presencia de los linajes A, C y D en los individuos Mayas (Figuras 8 y 9).

Inicialmente utilizamos los *primers* diseñados por Stone y Stoneking (1993), para realizar las primeras amplificaciones del DNA antiguo con el marcador Hinc II-13,259. Sin embargo fallamos en obtener el producto de amplificación del DNA extraído de varios individuos que ya habían sido tipificados para el linaje A o D utilizando el mismo extracto. Por este motivo decidimos diseñar los nuevos *primers* que amplifican un fragmento más pequeño para tipificar el linaje C (Figura 9). Usando estos *primers* pudimos amplificar el DNA de individuos que anteriormente habían resultado negativos.

Todos los controles negativos de PCR que se realizaron con las muestras de la Tabla 7 fueron siempre negativos, indicando la ausencia de una contaminación detectable en las muestras. En los rarísimos casos donde el control negativo fue incorrecto se desechó el experimento completo.

6.5 Secuenciación del mtDNA.

Los resultados obtenidos por el análisis de restricción fueron verificados por secuenciación de productos de PCR en 12 individuos seleccionados, ya sea porque mostraron un producto de PCR de buena calidad o porque el resultado obtenido con las enzimas de restricción no era totalmente claro. Además esta

secuenciación directa también se realizó en los productos de PCR de individuos contemporáneos lo que permitió comprobar que la región amplificada era la predicha.

Los productos de PCR de 6 individuos Mayas y de 1 individuo contemporáneo que se purificaron por el método descrito en el Sambrook et al. (1989), se secuenciaron con el Kit de Termo Sequenase.

Los productos de PCR de 6 individuos Mayas y de 2 individuos contemporáneos que se purificaron con el kit de purificación Concert Rapid PCR (Gibco BRL), se secuenciaron en el secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

Se secuenciaron las dos cadenas del mtDNA y todas las secuencias obtenidas de los individuos prehispánicos y contemporáneos fueron comparadas con la base de datos del GenBank utilizando el programa de computación Blastn. Todas las secuencias analizadas mostraron similitud con el genoma del mtDNA humano.

A continuación se muestra un fragmento de la secuencia obtenida de la cadena ligera del mtDNA de los individuos Mayas y contemporáneos analizados, en rojo la base que cambia en los linajes A, C y D y en colores las dos copias de 9 bp del linaje B. Además se menciona el promedio del porcentaje de similitud que presentan las secuencias de los individuos con el mtDNA humano (secuencia estándar), en cada linaje.

Individuos	Marcador Hae III-663	Linaje A
	651	677
Estándar (V00662)	5' -AGGTTTGGTCCTAGCCTTTCTATTAGC-3'	-
25G.....	A
29~9G.....	A
33 ^aA.....N.NN..	-
Contemporáneo 1	..T.....G.....	A

Similitud promedio con respecto al estándar = 92.5% ± 6.45.

Individuos	Marcador Delección 9 bp 8272-8289		Linaje B
	8262	8291	
Estándar (V0062)	5'-CCCTATAGCACCCCCTCTACCCCCTCTAGA-3'		-
3 ^aCCCCCTCTACCCCCTCTA..		-
7 ^aCCCCCTCTACCCCCTCTA..		-
12 ^aCCCCCTCTACCCCCTCTA..		-
16 ^aCCCCCTCTACCCCCTCTA..		-
Contemporáneo 1 ^aCCCCCTCTACCCCCTCTA..		-
Contemporáneo 2 ^aCCCCCTCTAGAGCCCACTGA		B

Similitud promedio con respecto al estándar = 98.5% ± 3.67.

Individuos	Marcador Hinc II- 13259		Linaje C
	13251	13270	
Estándar (V00662)	5'-CACTTCAAGTCAACTAGGAC-3'		-
4N..A.N.....		-
8	..N.....A.....		-
15 ^aG.....		C
25N..A.N.....		-
32N..A.A.....		-

Similitud promedio con respecto al estándar = 96% ± 2.5.

Individuos	Marcador Alu I- 5176		Linaje D
	5171	5192	
Estándar (V00662)	5'-AAACAAGCTAACATGACTAACA-3'		-
35 TlatelolcoA.....		D
Contemporáneo 1C.....		-

Similitud promedio con estándar = 98% ± 1.41.

^aSecuenciación automática.

Se obtuvieron tres secuencias utilizando el Kit de Thermo Sequenase, del DNA proveniente de 3 extracciones distintas con diferentes técnicas de un mismo individuo de Tlatelolco, en estas secuencias se observa la presencia de una A en el nucleótido 5,178 lo cual define el linaje D. El mismo resultado se obtuvo con el análisis de restricción de los tres extractos.

A continuación se muestran detalladamente, los resultados obtenidos (Tabla 7), con los distintos métodos de extracción que se utilizaron para analizar a los 28 individuos, se observa que en algunos casos se realizaron 2 o 3 extracciones de un mismo individuo utilizando la misma o diferentes técnicas, se presenta el resultado obtenido de cada análisis de amplificación para el linaje B, de los análisis de restricción para los linajes A, C, y D y el de la secuenciación, por último se especifica el linaje fundador que presentaron los individuos.

6.6 Linajes Fundadores del mtDNA en Individuos Mayas Prehispánicos.

Veinticuatro individuos fueron asignados a uno de los 4 linajes fundadores del mtDNA: 21 individuos fueron linaje A (84%), 1 linaje B (4%), y 2 linaje C (8%). El linaje D no estuvo presente en ninguno de los 25 individuos tipificados (0%) y 1 individuo no presentó ninguno de los marcadores genéticos por lo que fue clasificado como *otro* (4%) (Tabla 8).

De acuerdo a la cronología que Tiesler (1999), asigna a los individuos de Xcaret, de los 7 que son del período Clásico Tardío, 5 fueron linaje A y 2 no fueron tipificados. De los 16 que son del período Post-Clásico, 12 fueron linaje A, 1 B, 2 C, 1 no fue tipificado, y el individuo restante fue clasificado como *otro* debido a que no mostró la presencia de ninguno de los 4 linajes. Por último, 3 individuos que fueron tipificados 2 como linaje A y 1 linaje C se desconoce a que período cultural corresponden (Tabla 1).

VII DISCUSIÓN

Los análisis de restricción muestran que los Mayas antiguos de Xcaret, están principalmente tipificados por el linaje A (84%) aunque también se encuentran los linajes C (8%) y B (4%) en bajas frecuencias. La alta frecuencia del linaje A en nuestros datos es consistente con la presencia predominante de este linaje entre muchos grupos étnicos de Nativos Americanos de América del Norte y de América Central. En particular, el linaje A es el más frecuente entre algunas poblaciones contemporáneas de origen Mesoamericano como son la Maya contemporánea, la Mixe y la Mixteca, en las cuales los linajes B y C se encuentran en bajas frecuencias y el linaje D está ausente en las dos últimas (Tabla 8). Por otra parte, la población Maya antigua de Copán está principalmente tipificada por el linaje C con una frecuencia muy baja del linaje D y ausencia de los linajes A y B, lo cual contrasta notablemente con las poblaciones contemporáneas de origen Mesoamericano antes mencionadas y con los Mayas antiguos de Xcaret.

Por otra parte, los resultados muestran una moderada similitud en las frecuencias de los linajes A y B entre la población Maya antigua de Xcaret y la población Maya contemporánea de la península de Yucatán. Estas diferencias podrían deberse a un intercambio genético entre los Mayas posteriores a la Conquista y otras poblaciones, o a factores geográficos, sin embargo, a este respecto es necesario aclarar que no se conoce con precisión la localización geográfica de la población Maya contemporánea, ya que los autores sólo mencionan que se trata de una población Mexicana, de una villa aislada, en la parte central de la península de Yucatán, que habla yucateco (Schurr et al. 1990; Torroni et al. 1992).

Para explorar con mayor profundidad si existió un intercambio genético entre las poblaciones Mayas con otras poblaciones sería útil realizar estudios

comparativos de la secuencia de la región hipervariable I del mtDNA de las poblaciones antiguas y contemporáneas.

Al comparar las frecuencias de los linajes fundadores encontradas en los individuos de Xcaret pertenecientes al período Clásico Tardío con los del Post-Clásico, podemos observar que se parecen mucho. Ambos grupos están tipificados principalmente por el linaje A y las frecuencias de los otros linajes no son diferentes para ese tamaño de muestra. Sin embargo, al comparar los 5 individuos tipificados del Clásico Tardío de Xcaret con los 9 individuos de Copán, que también pertenecen al período Clásico Tardío, se observa que la distribución de frecuencias es completamente distinta. Lo anterior sugiere que la temporalidad no parece ser la responsable de los diferentes linajes presentes en los Mayas antiguos de Copán y de Xcaret.

La ciudad de Copán es una de las más importantes en el período Clásico, geográficamente se encuentra ubicada en el límite entre las Tierras Altas y Bajas. Su cultura se ha relacionado con la tradición de los Mayas de las Tierras Bajas, aunque geográficamente Copán estuvo rodeada de grupos no Mayas, debido a que fue una ciudad fronteriza, lo que probablemente favoreció el flujo génico con las poblaciones no Mayas de los alrededores (Sharer 1994. pp 297-317). Se ha propuesto que la proximidad geográfica tiene mayor influencia en la frecuencia de los linajes que la afiliación lingüística, esto probablemente se debe a migraciones de mujeres entre tribus adyacentes que no están lingüísticamente relacionadas, o que lo están remotamente (Lorenz y Smith 1996). Sin embargo, los Nativos Americanos contemporáneos de diferentes poblaciones no Mayas de América Central también presentan los linajes A y B en altas frecuencias, el linaje D en una muy baja frecuencia y no presentan el linaje C (Tabla 3). (Torróni et al. 1993a., Merriwether et al. 1995., Batista et al. 1995).

Las diferencias en las frecuencias de los linajes del mtDNA entre Mayas antiguos de Copán y de Xcaret podrían explicarse por el efecto de la deriva génica. Si en la colonización de un nuevo territorio participa un número pequeño

de individuos fundadores, esto puede tener un efecto importante en la historia de la población, así como la presencia de otros procesos demográficos que pueden ocurrir en ese mismo período de tiempo, por ejemplo un cuello de botella de la población. Una población inicialmente pequeña que presenta una baja tasa de reproducción, puede permanecer relativamente pequeña por algunas generaciones. Muchos alelos raros son eliminados en este proceso ya sea porque estaban ausentes en los individuos fundadores o porque fueron perdidos en la última generación. Pero si los individuos fundadores fueron pocos o se presentó un cuello de botella en la población, los alelos raros que estaban presentes en el inicio y que sobreviven hasta el final, eventualmente son encontrados en altas frecuencias en esa población, en comparación con otras poblaciones (Cavalli-Sforza, Menozzi y Piazza 1996).

Las diferencias en las frecuencias de los linajes del mtDNA en Mayas antiguos de Copán y de Xcaret pueden deberse al pequeño número de individuos analizados en Copán, de hecho los autores han mencionado que esas frecuencias pueden cambiar cuando más individuos sean estudiados (Merriwether et al. 1997). No obstante, es sorprendente que el linaje A esté ausente, ya que es el más frecuente en la población Maya contemporánea, en la antigua de Xcaret y en otras poblaciones Mesoamericanas. Por lo tanto es probable que las diferentes frecuencias de los linajes fundadores de Nativos Americanos en las poblaciones de Xcaret y de Copán pudieran corresponder a grupos genéticamente diferentes que comparten una misma cultura, sin embargo para apoyar esta hipótesis es necesario analizar un mayor número de individuos de Copán. Además es necesario analizar otros grupos Mayas antiguos y contemporáneos de distintas regiones geográficas que nos permitan en un futuro confirmar o negar la anterior hipótesis.

Los resultados de este estudio mostraron que un individuo no pertenece a ninguno de los cuatro linajes de los Nativos Americanos, este individuo formaba parte de un entierro múltiple con nueve individuos. Los informes de la

arqueóloga Con (1992), y de la antropóloga Tiesler (1999), son claros al describir el contexto arqueológico-antropológico del entierro, el cual informa que todos estos individuos pertenecen al mismo período de tiempo, el Post-Clásico, por lo que asumimos que este individuo es prehispánico. En otras poblaciones prehispánicas de Nativos Americanos también se ha encontrado la presencia de individuos que no poseen ninguno de los 4 linajes A-D (Stone y Stoneking 1993;1998., Parr et al. 1996). Algunos autores postulan que estos hallazgos sustentan la hipótesis de que más de cuatro linajes provenientes de Asia entraron al continente Americano. Stone y Stoneking (1998), basándose en datos derivados de la secuenciación de la región hipervariable I del mtDNA, han propuesto la presencia de un quinto linaje fundador presente en individuos que no presentan ninguno de los marcadores de los 4 linajes fundadores. Otros autores también han propuesto la presencia de más de 4 linajes fundadores (Bailliet et al. 1994, Easton et al. 1996), sin embargo la posición de estos nuevos linajes, en relación a los 4 originales, no es clara. Sin embargo, hay que ser cuidadosos de no asumir la presencia de nuevos linajes fundadores basándose solamente en la existencia de individuos que no presentan alguno de los 4 linajes fundadores A-D, o de agruparlos como un linaje distinto en particular si no se han caracterizado previamente por otros marcadores genéticos.

Las metodologías de extracción y purificación de DNA antiguo a partir de restos óseos que se estandarizaron en nuestro laboratorio mostraron distintos porcentajes de éxito en la recuperación del DNA antiguo debido a que no se exploraron todas las muestras con todas las técnicas. Únicamente el método de Muñoz et al. (2001), se usó en todos los individuos mostrando un alto grado de efectividad, de hecho, permitió recuperar el DNA antiguo de 26 individuos y por lo menos amplificarlo con uno de los tres diferentes marcadores genéticos que definen los linajes A, C y D. Sin embargo, hasta el momento no hemos encontrado una técnica que funcione para todas las muestras, por lo tanto frecuentemente hay que recurrir a varias técnicas para obtener DNA amplificable. Por último, debido a que en términos generales todas estas

técnicas mostraron ser efectivas en la recuperación de DNA amplificable, incluso en un individuo de Tlatlelolco que pertenece a otra población distinta del presente estudio, las metodologías son utilizadas por nuestro grupo de trabajo en otros estudios.

En el presente trabajo, el análisis de la secuenciación directa de los productos de PCR de algunos individuos permitió comprobar que se estaba amplificando la región de interés, así como corroborar los resultados previamente obtenidos por el análisis de restricción. Solamente en algunos individuos obtuvimos un resultado confuso con el análisis de restricción en primera instancia, por ejemplo los individuos 2 y 15, ver los resultados del análisis del linaje C (Tabla 7). En estos casos el resultado correcto fue definido después de realizar varias replicaciones de diferentes extractos o por el resultado obtenido de la secuenciación directa.

Es necesario aclarar, que en los resultados, únicamente se mostró una parte de la secuencia de la región que se amplificó, ya que en ese fragmento se puede observar la ausencia o la presencia de las mutaciones puntuales o de las 9 bp en tándem, que definen cada linaje fundador. El análisis del resto de las secuencias mostró que son regiones conservadas, por lo tanto, no existen cambios en la secuencia de nucleótidos con respecto a la secuencia estándar. Sin embargo, en algunas secuencias del DNA de los individuos prehispánicos se presentan compresiones, posiblemente por los daños presentes en el DNA antiguo o por artefactos de la misma técnica.

Cuando se trabaja con DNA antiguo humano el problema principal es la contaminación con DNA humano moderno. Formalmente es casi imposible descartar esta contaminación, sin embargo, deben tomarse muchas precauciones para reducir o minimizar la probabilidad de que esta ocurra. En el presente trabajo se han realizados varias medidas preventivas para evitar la contaminación con DNA humano moderno, incluyendo la limpieza y preparación de los huesos en un laboratorio diferente donde no se trabaja con productos de

PCR de DNA humano. Además se tuvo cuidado de cumplir varios de los “criterios de autenticidad” citados en la literatura (Pääbo, Higuchi y Wilson 1989., Handt et al. 1994).

Diseñamos un par de nuevos *primers* que permitieron la amplificación de fragmentos más pequeños de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa, esto permitió tipificar el linaje C en individuos que anteriormente no se habían tipificados. Este hecho sugiere que en realidad trabajamos con DNA antiguo, debido a que se está cumpliendo la relación inversa entre la eficiencia de amplificación y el tamaño del producto amplificado (Pääbo, Gifford y Wilson 1988), esta relación inversa ha sido observada para el DNA antiguo, pero no para el DNA moderno.

Además, en nuestro laboratorio, utilizando técnicas moleculares similares, hemos identificado el sexo masculino en al menos 30 individuos infantiles de una población de Tlatelolco. La mayoría de los resultados de este análisis molecular han sido obtenidos por mujeres, lo cual descarta una contaminación con DNA contemporáneo originada en el laboratorio por quienes manejaron las muestras.

VIII CONCLUSIONES

- * Los linajes fundadores A, B, y C del mtDNA están presentes en la población Maya prehispánica de Xcaret, Quintana Roo, con una frecuencia del 84%, 4% y 8% respectivamente.

- * El linaje fundador D del mtDNA está ausente en los 25 individuos tipificados de la población Maya prehispánica de Xcaret, Quintana Roo.

- * Un individuo no pertenece a ninguno de los 4 linajes fundadores y se clasificó en un grupo llamado *otro*.

- * Fue posible la recuperación de DNA amplificable en esta población Maya con todos los métodos empleados.

- * El linaje A es el más frecuente en la población antigua de Xcaret y en una población Maya contemporánea de la península de Yucatán.

- * Las frecuencias de los linajes fundadores A-D en la población antigua de Copán son diferentes de las de la población antigua de Xcaret y de la población de Mayas contemporáneos de Yucatán, aunque la validez de esta conclusión está limitada por el número pequeño de individuos analizados en Copán.

- * Se sugiere que los Mayas antiguos de Copán y de Xcaret fueron grupos genéticamente distintos dentro de un área culturalmente homogénea.

IX BIBLIOGRAFÍA

- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., Bruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R. y Young I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290:457-465.
- Andrews IV E. W. y Andrews A. P. 1975. A preliminary study of the ruins of Xcaret, Quintana Roo, Mexico. With notes on other archaeological remains on the central east coast of the Yucatan peninsula. Middle American Research Institute. No. 40. Tulane University. New Orleans. pp 9-49.
- Bailliet G., Rothhammer F., Carnese F. R., Bravi C. M. y Bianchi N. O. 1994. Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 54:27-33.
- Ballinger S. W., Schurr T. G., Torroni A., Gan Y. Y., Hodge J. A., Hassan K., Chen K. H. y Wallace D. C. 1992. Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient Mongoloid migrations. *Genetics*. 130:139-152.
- Batista O., Kolman C. J. y Bermingham E. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panamá. *Hum. Mol. Genet.* 4:921-929.
- Cann R. L., Stoneking M. y Wilson A. C. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*. 325:31-36.
- Cavalli-Sforza L. L., Menozzi P. y Piazza A. 1996. The history and geography of human genes. Princeton Univ Press. New Jersey. pp 7-16.

- Comas J. 1996. Características físicas de la familia lingüística Maya. En: Cuadernos del Instituto de Investigaciones Históricas. UNAM. 20:5- 95.
- Con M. J. 1991a. Trabajos recientes en Xcaret Quintana Roo. Estudios de cultura Maya XVIII. UNAM. México D.F. pp 67-129.
- Con Uribe Ma. J. 1991b. Proyecto Xcaret. Consejo de Arqueología. Boletín. pp 46-49.
- Con M. J. 1992. Proyecto Xcaret. Cédulas de Campo. Centro INAH. Quintana Roo. Cancún.
- De la Garza M. 1992. Los Mayas. 3000 Años de civilización. Bonechi. Monclém. Italia. pp 3-8.
- Dowton M. y Campbell N. J. H. 2001. Intramitochondrial recombination- is it why some mitochondrial genes sleep around?. Trends in Ecology Evolution. 6:6:269-271.
- Easton R. D., Merriwether D. A., Crews D. E. y Ferrell R. E. 1996. mtDNA variation in the Yanomami: evidence for additional New World founding lineages. Am. J. Hum. Genet. 59:213-225.
- Feindel W. 1988. Cranial clues to the mysterious decline of the maya civilization: the hippocampal hypothesis. America Indígena. XLVIII:1:215-221.
- Ginther C., Corach D., Penacino G. A., Rey J. A., Carnese F. R., Hutz M. H., Anderson A., et al. 1993. Genetic variation among the Mapuche indians from the Patagonian region of Argentina: mitochondrial DNA sequence, nuclear variation and allele frequencies of several nuclear

genes. En: DNA fingerprinting: state of the science. Pena S. D. J., Chakraborty R., Epplen J. T., Jeffrey A. J. (eds). Birkhauser. Basel. pp 211-219.

Goodyear P., MacLaughlin-Black y Mason J. 1994. A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA. *Bio. Techniques*. 16:232-234.

Haeseler A. V., Sajantilla A. y Pääbo S. 1995. The genetical archaeology of the human genome. *Nature genetics*. 14:135-140.

Hagelberg E. Sykes B. y Hedges R. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature*. 342:485.

Hagelberg E. y Clegg J. B. 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. London B*. 244:45-50.

Hagelberg E. 1994. Dried samples: hard tissues. Mitochondrial DNA from ancient bones. En: Ancient DNA. Herrmann B. y Hummel S. (eds). Springer-Verlag. New York. pp 195-204.

Handt O., Höss M., Krings M. y Pääbo S. 1994. Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*. 50:524 -529.

Hartl L. D. y Clark G. A. 1997. Principles of population genetics. 3 ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland Massachusetts.

Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Ryder O. A. y Wilson A. C. 1984. DNA sequences from the quagga, and extinct member of the horse family. *Nature* 312:282-284

- Horai S., Kondo R., Murayama K., Hayashi S., Koike H. y Nakai N. 1991.
Phylogenetic affiliation of ancient and contemporary humans inferred from
mitochondrial DNA. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 333:409 -417.
- Horai S., Kondo R., Nakagawa-Hattori Y., Hayashi S., Sonoda S. y Tajima
K. 1993. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of
mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* 10:23-47.
- Höss M., Handt O. y Pääbo S. 1994. Recreating the past by PCR. En: *The
polymerase chain reaction.* Mullis K. B., Ferré F. y Gibbs R. A. (eds).
Birkhauser. Boston. pp 257-264.
- Höss M., Jaruga P., Zastawny T. H., Dizdaroglu M. y Pääbo S. 1996.
DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic
Acids Res.* 24:1304-1307.
- Hutchison III C. A., Newbold J. E., Potter S. S. y Hall E. M. 1974. Maternal
inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature.* 251:536- 538.
- Ingman M., Kaessmann H., Pääbo S. y Gyllensten U. 2000.
Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.*
408:708-713.
- Kajander O. A., Rovio A. T., Majamaa K., Poulton J., Spelbrink J. N., Holt
I. J., Karhunen P. J. y Jacobs H. T. 2000. Human mtDNA sublimons
resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states.
Human Molecular Genetics. 9:19:2821-2835.
- Krings M., Stone A., Schmitz R. W., Krainitzki H., Stoneking M. y Pääbo S.
1997 Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans
Cell 90:19-30.

- Lalueza C., Pérez-Pérez A., Prats E., Cornudella L. y Turbón D. 1997. Lack of founding amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum. Mol. Genet.* 6:1:41-46.
- Lorenz J. G. y Smith D. G. 1996. Distribution of four founding mtDNA haplogroups among native north americans *Am. J. Phys. Anthropol.* 101:307-323.
- Márquez M. L., Peraza M. E., Gamboa J. y Miranda T. 1982. Playa del Carmen, una población de la costa oriental en el postclásico. Un estudio osteológico. INAH. México. pp 9-45.
- Márquez M. L. 1987. Qué sabemos de los mayas peninsulares a partir de sus restos óseos. *Memorias del 1er. Coloquio Internacional de mayistas.* UNAM. México. pp 43-56.
- Márquez M. L. 1991. La dieta maya prehispánica en la costa yucateca. *Estudios de Cultura Maya.* UNAM. XVIII:357-394.
- Merriwether D. A., Rothhammer F. y Ferrell R. E. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in native americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98:411-430.
- Merriwether D. A., Reed D. M. y Ferrel R. E. 1997. Ancient and contemporary mitochondrial DNA variation in the Maya. En: *Bones of the Maya. Studies of ancient skeletons.* Whittington S. L., Reed D. M. (eds). Smithsonian Inst. Press. Washington. pp 208-217.
- Moritz C., Dowling T. E. y Brown W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Am. Rev. Ecol. Syst.* 18:269-292

- Muñoz M. L., Moreno-Galeana M., Díaz-Badillo A., Loza-Martínez I., Macias-Juárez V., Márquez-Morfin L., Jiménez-López J. C. y Martínez-Meza A. 2001. Análisis del DNA mitocondrial de una población prehispanica de Monte Albán, Oaxaca. México. *Antropo*. En prensa.
- Nei M. y Roychoudhury K. 1993. Evolutionary relationships of human populations on a global scale. *Mol. Biol. Evol.* 10:5:927-943.
- Pääbo S. 1985. Molecular cloning of ancient egyptian mummy DNA. *Nature*. 314:644-645.
- Pääbo S., Gifford J. A. y Wilson A. C. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Research*. 16:20:9775-9727.
- Pääbo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:1939-1943.
- Pääbo S., Higuchi R. G. y Wilson A. C. 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 264:9709-9712.
- Pääbo S. 1993. Ancient DNA. *Scientific American*. 269:60-66
- Parr R. L., Carlyle S. W. y O'Rourke D. H. 1996. Ancient DNA analysis of Fremont amerindians of the Great Salt lake wetlands. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99:507-518.
- Poinar H. N. 1999. DNA from fossils: the past and the future. *Acta Paediatr. Suppl.* 433:133-40.

- Ribeiro- Dos-Santos A. K. C., Santos S. E. B., Machado A. L., Guapindala V. y Zago M. A. 1996. Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in pre-columbian natives of the Amazon region. *Am. J. Phys. Anthropol.* 101:29-37.
- Romano A. 1974. Sistemas de enterramientos. *Antropología física, época prehispánica. México. Panorama histórico y cultural. I.N.A.H. México.* pp 81-112.
- Saldaña B. H. A., López O. R., Martínez R. A. y Pérez R. D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo. XVIII:108:50-60.*
- Sambrook J., Fritsch E. F. y Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Lab Press. New York.*
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74:12:5463-5467.*
- Schurr T. G., Ballinger S. W., Gan Y.Y., Hodge J. A., Merriwether D. A., Lawrence D. N., Knowler W. C., Weiss K. M. y Wallace D. C. 1990. Amerindian Mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 46:613 -623.
- Sharer R. J. 1994. *The ancient Maya. Stanford. CA. Stanford University Press.*
- Stone A. C. y Stoneking M. 1993. Ancient DNA from a pre-columbian amerindian population. *Am. J. Phys. Anthropol.* 92:463-471.

- Stone A. C. y Stoneking M. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1153-1170.
- Storey R. 1997. Individual frailty, children of privilege, and stress in Late Classic Copán. En: *Bones of the Maya studies of ancient skeletons.* Whittington S. L., Reed D. M. (eds). Smithsonian Inst. Press. Washington. pp 116-126.
- Tiesler B. V. 1999. Rasgos bioculturales entre los antiguos mayas. Aspectos arqueológicos y sociales. Tesis Doctoral. Facultad de Filosofía y Letras. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Torróni A., Schurr T. G., Yang Chi-Chuan., Szathmary E. J. E., Williams R. C., Schanfield M. S., Troup G. A., Knowler W. C., Lawrence D. N., Weiss K. M. y Wallace D. C. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics.* 130:153-162.
- Torróni A., Schurr T. G., Cabell M. F., Brown M. D., Neel J. V., Larsen M., Smith D. G., Vullo C. M. y Wallace D. C. 1993a. Asian affinities and continental radiation of the four founding native american mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* 53:563- 590.
- Torróni A., Sukernik R. I., Schurr T. G., Starikovskaya Y. B., Cabell M. F., Crawford M. H., Comuzzie A. G. y Wallace D. C. 1993b. mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with native americans. *Am. J. Hum. Genet.* 53:591-608

- Torrioni A., Chen Y. S., Semino O., Santachiara-Beneceretti A. S., Scott C. R., Lott M. T., Winter M. y Wallace D. C. 1994. mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four native american populations from southern Mexico. *Am. J. Hum. Genet.* 54:303-318.
- Tuross N. 1994. The Biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia.* 50:530-535.
- Vargas P. E. 1988. La costa oriental de Quintana Roo: Un modelo de desarrollo alternativo para la zona Maya. *Anales de Antropología. Instituto de Investigaciones Antropológicas. No. XXV. UNAM. México.* pp 89-110.
- Wallace D. C., Garrison K. y Knowler W. C. 1985. Dramatic founder effects in amerindian mitochondrial DNAs. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68:149-155.
- Walsh P. S., Metzger D. A. y Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a Médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio. Techniques.* 10:4:506-513.
- Ward R. H., Frazier B. L., Dew-Jager K. y Pääbo S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:8720-8724.
- William J., Ballard O. y Kreitman M. 1995. Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker?. *Tree.* 10:12:485-488.
- Woodward S. R., King M. J., Chiu N. M., Kuchar M. J. y Griggs C. W. 1994. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR methods and applications.* 3:244-247.

- Torróni A., Chen Y. S., Semino O., Santachiara-Beneceretti A. S., Scott C. R., Lott M. T., Winter M. y Wallace D. C. 1994. mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four native american populations from southern Mexico. *Am. J. Hum. Genet.* 54:303-318.
- Tuross N. 1994. The Biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia.* 50:530-535.
- Vargas P. E. 1988. La costa oriental de Quintana Roo: Un modelo de desarrollo alternativo para la zona Maya. *Anales de Antropología. Instituto de Investigaciones Antropológicas. No. XXV. UNAM. México.* pp 89-110.
- Wallace D. C., Garrison K. y Knowler W. C. 1985. Dramatic founder effects in amerindian mitochondrial DNAs. *Am. J. Phys. Anthropol.* 68:149-155.
- Walsh P. S., Metzger D. A. y Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a Médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio. Techniques.* 10:4:506-513.
- Ward R. H., Frazier B. L., Dew-Jager K. y Pääbo S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single amerindian tribe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:8720-8724.
- William J., Ballard O. y Kreitman M. 1995. Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker?. *Tree.* 10:12:485-488.
- Woodward S. R., King M. J., Chiu N. M., Kuchar M. J. y Griggs C. W. 1994. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR methods and applications.* 3:244-247.

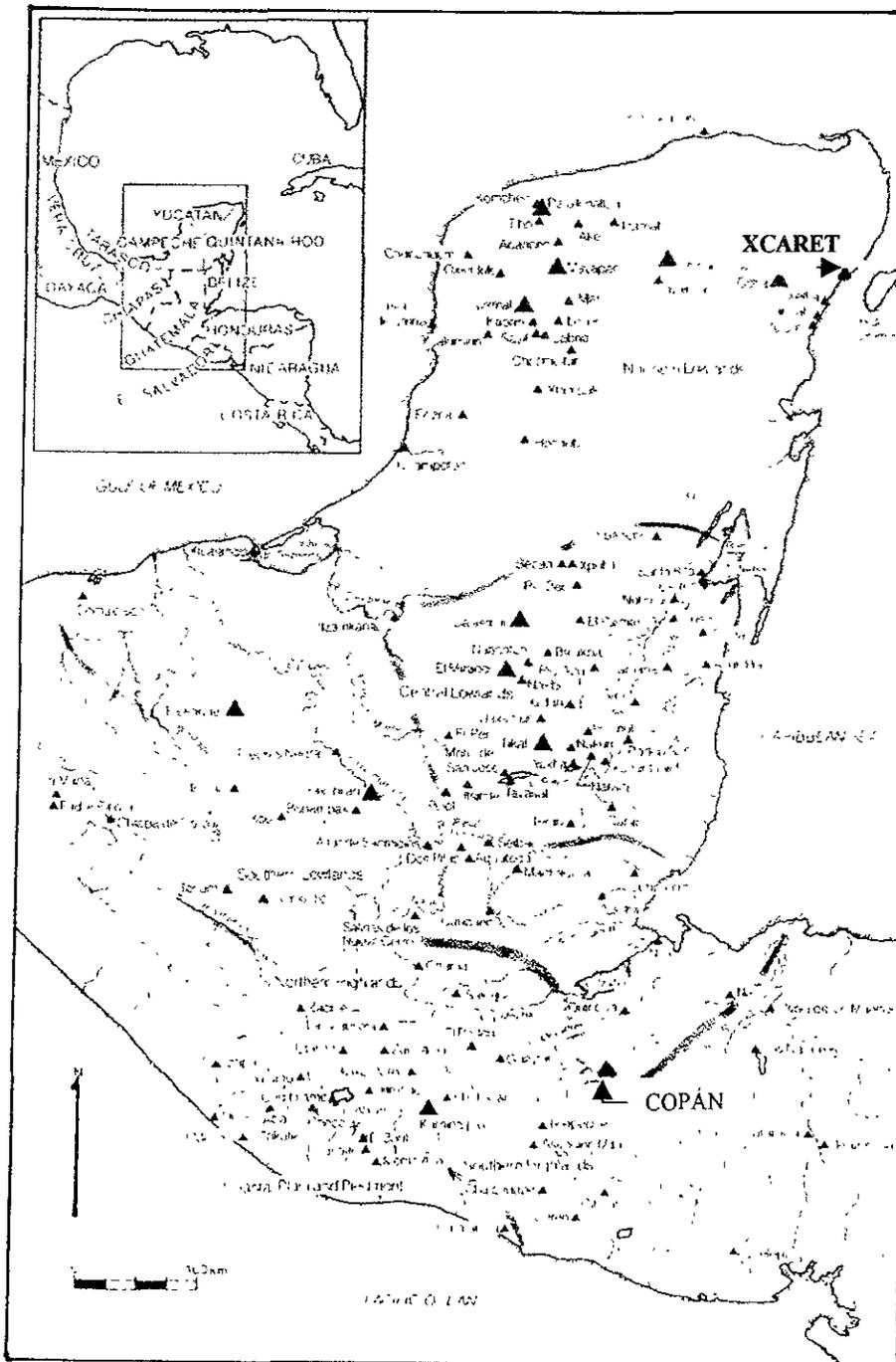
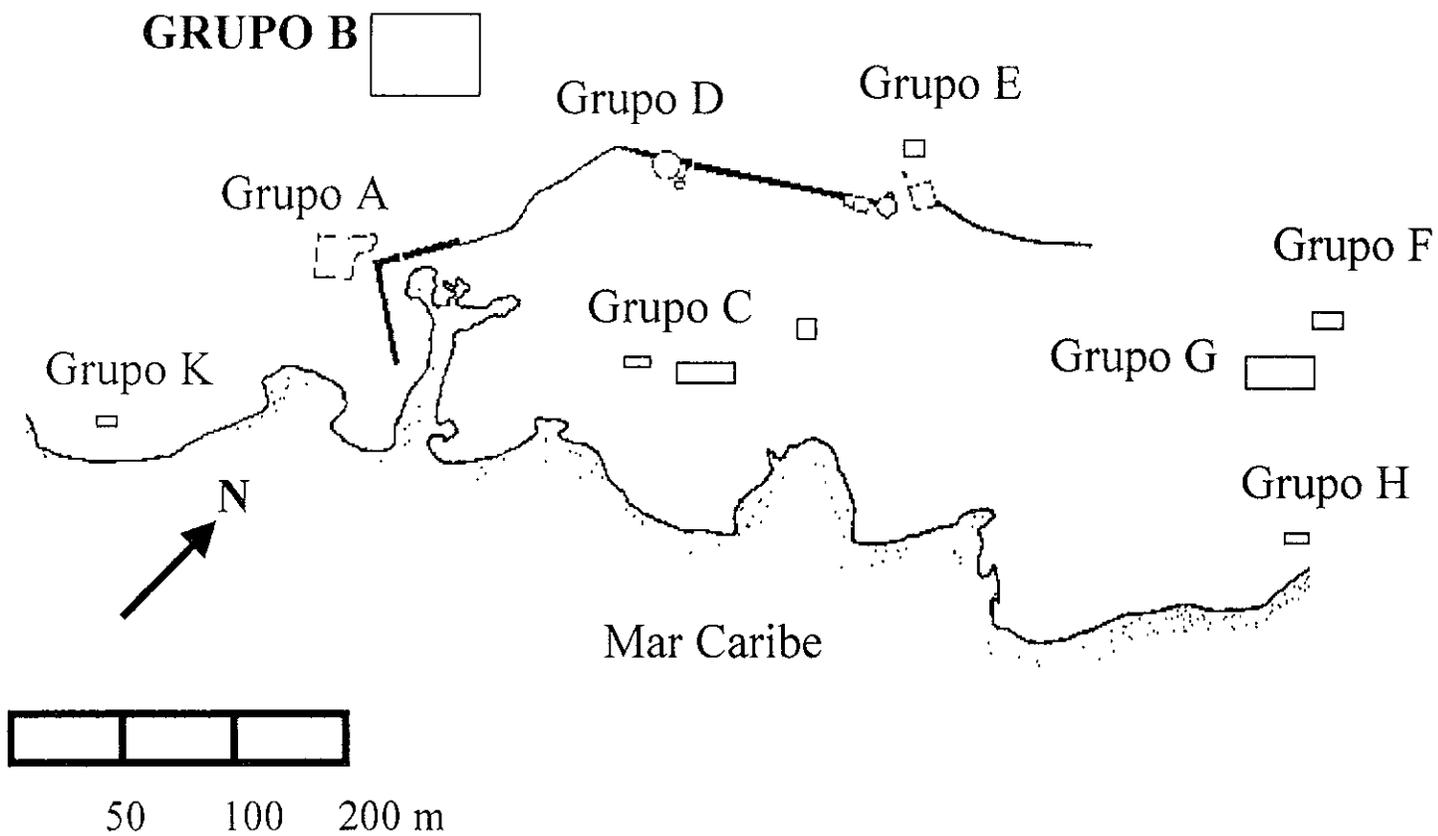


Figura 1. Mapa del área Maya, donde se muestran los principales sitios arqueológicos y la división de acuerdo al relieve (Tomado de Sharer 1994).



**Figura 2. Zona Arqueológica de Xcaret,
Quintana Roo (Tomado de Con 1991).**

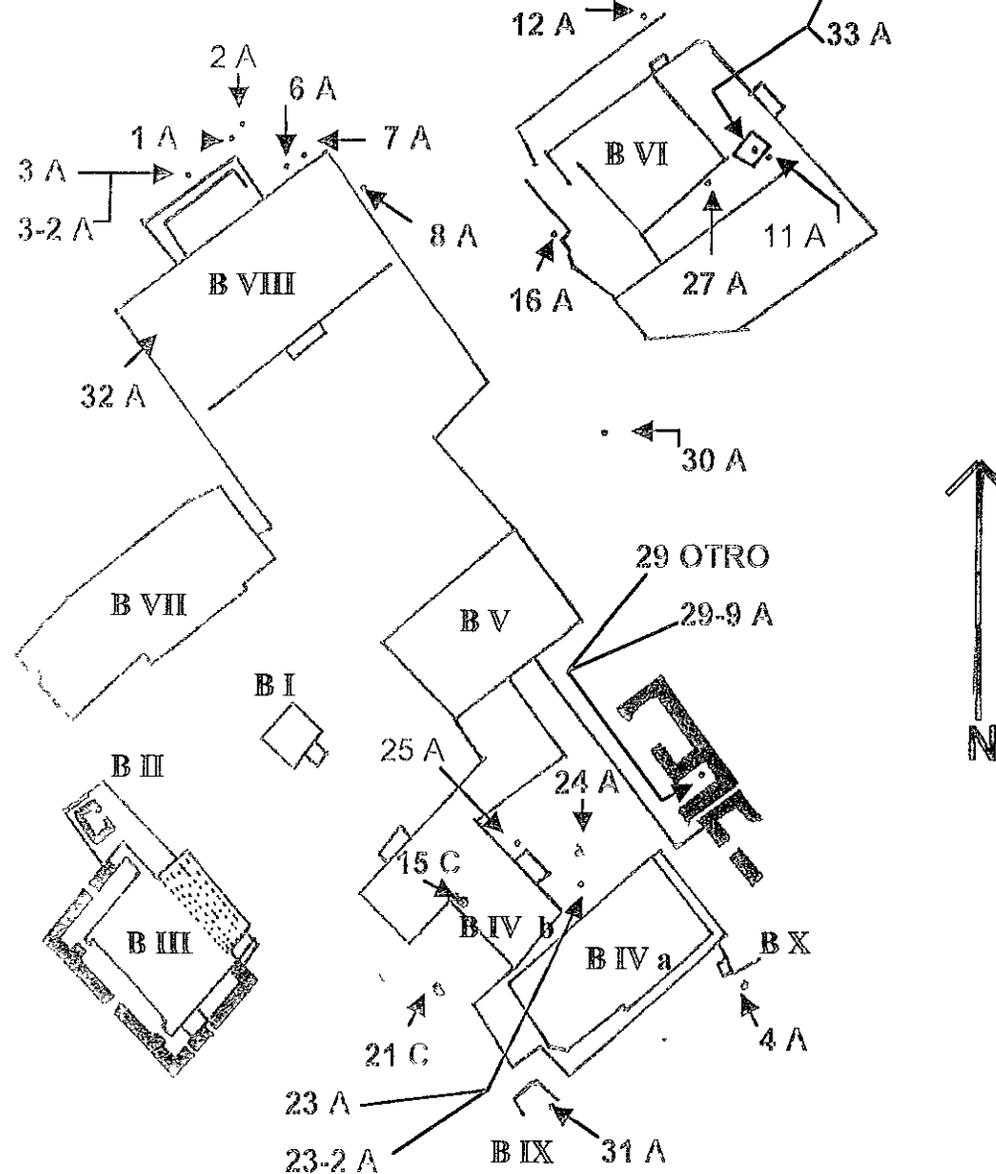


Figura 3. Plano arquitectónico del Grupo B en Xcaret, en el se muestran las estructuras que lo conforman con número romano en azul. Los individuos Mayas estudiados en este proyecto en morado. El linaje fundador del mtDNA que presentaron en rosa, y los puntos y flechas indican el sitio de donde se recuperaron los individuos anlizados en este trabajo.

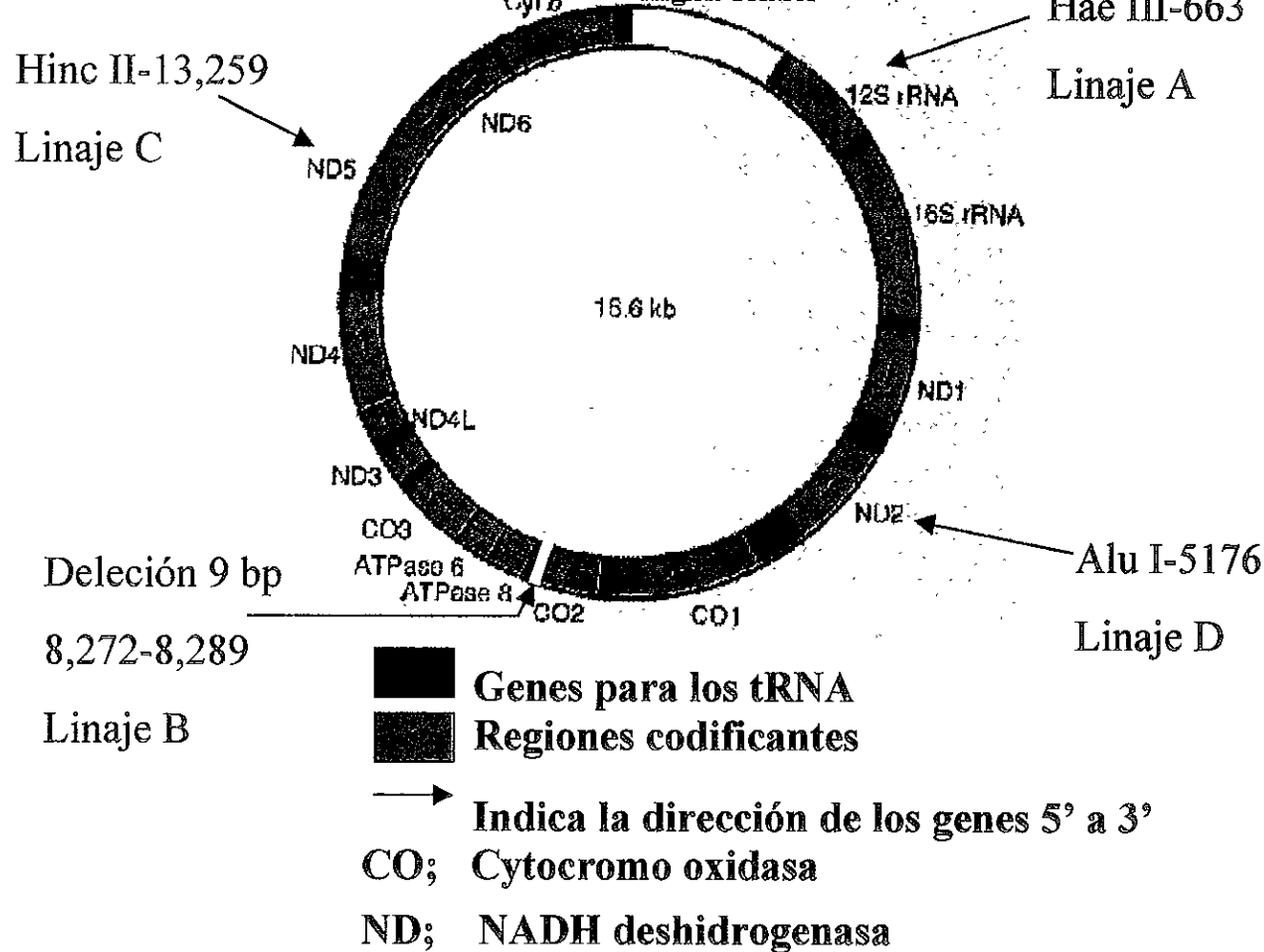


Figura 4. Genoma Mitocondrial Humano. Catorce de las 15 regiones que codifican para proteínas o para el rRNA, son transcritos en la misma dirección. Catorce de los genes para los tRNA se transcriben en el sentido de las manecillas del reloj y 8 en dirección opuesta en negro (Lewin 1997). Se muestran los cuatro Linajes Fundadores, las enzimas que los reconocen y las posiciones en donde se da el sitio de corte o la pérdida de 9 bp (Torrioni et al. 1992).

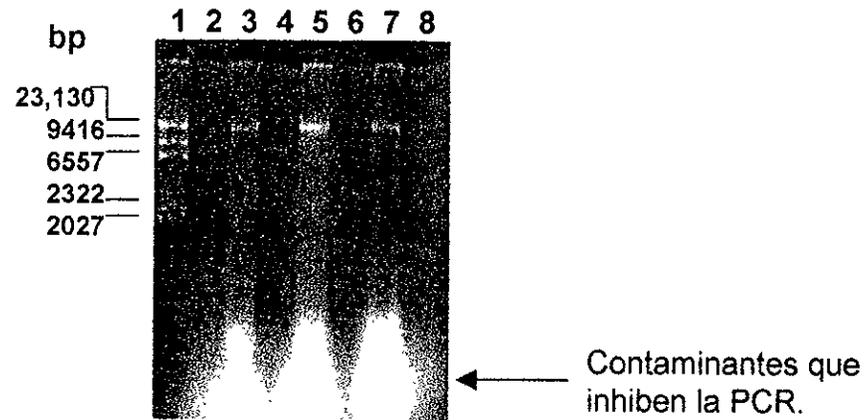


Figura 5. Extracción de DNA total por el método de Muñoz et al. (2001), en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 2-8: DNAs antiguos de restos óseos. Carril 1: marcador estándar λ / Hind III.

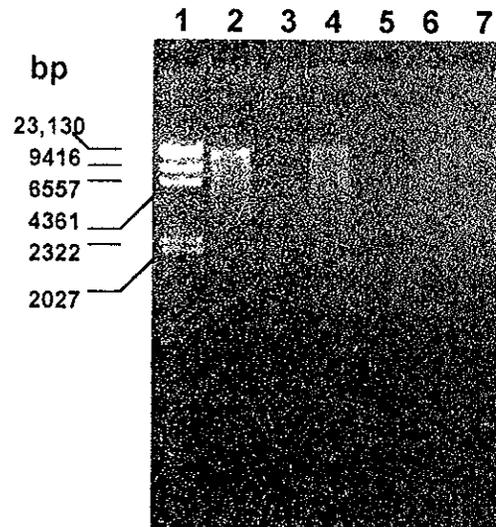


Figura 6. DNA purificado con el kit GeneClean de (Bio 101), en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 2-7: DNAs antiguos previamente extraídos con la técnica de Muñoz et al. (2001). Carril 1: marcador estándar λ / Hind III.

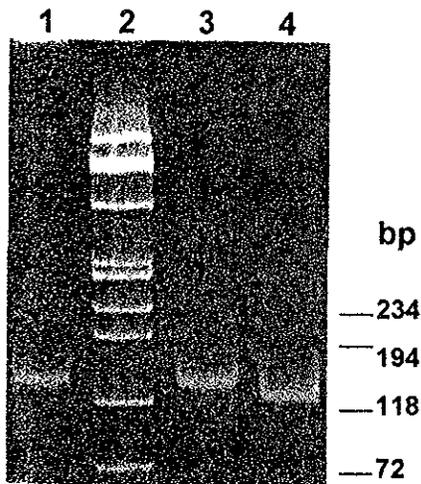


Figura 7. Productos de amplificación del marcador genético deleción de 9 bp 8,272-8,289, que define el linaje B en Nativos Americanos, analizados en un gel de poliacrilamida al 14% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: DNA antiguo de un individuo de Xcaret. Carriles 3-4: DNAs contemporáneos de 121 y 112 bp respectivamente. Carril 2: marcador estándar ϕ X174/ Hae III.

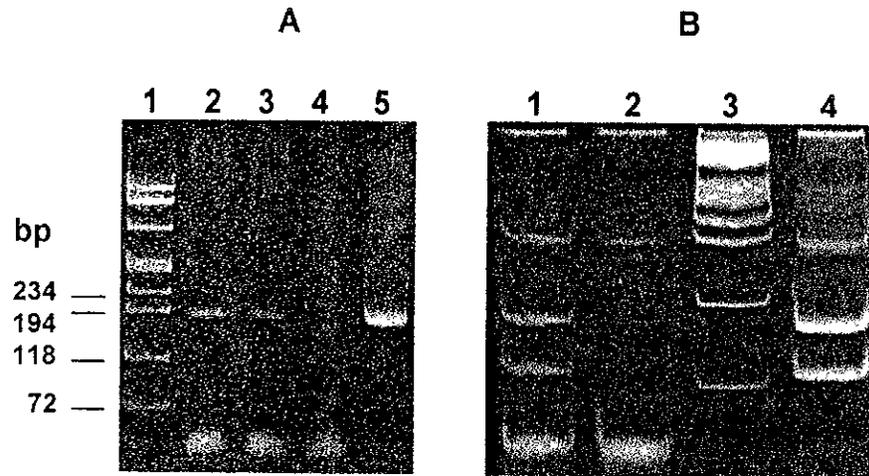


Figura 8. (A) Productos de amplificación de Hae III-663 que define el linaje A en Nativos Americanos analizados en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio. Carriles 2-3: productos de distintos extractos de DNA antiguo. Carril 5: DNA contemporáneo. El fragmento amplificado es de 176 bp. Carril 4: DNA antiguo que no amplificó.

(B) Restricción de productos de PCR con 5 unidades de la enzima Hae III a 37°C toda la noche. Carriles 1 y 2: DNAs prehispánicos. Carril 4: DNA contemporáneo. Los fragmentos son de 75 y 101 bp. Carriles A1 y B3: marcador estándar ϕ X174/ Hae III.

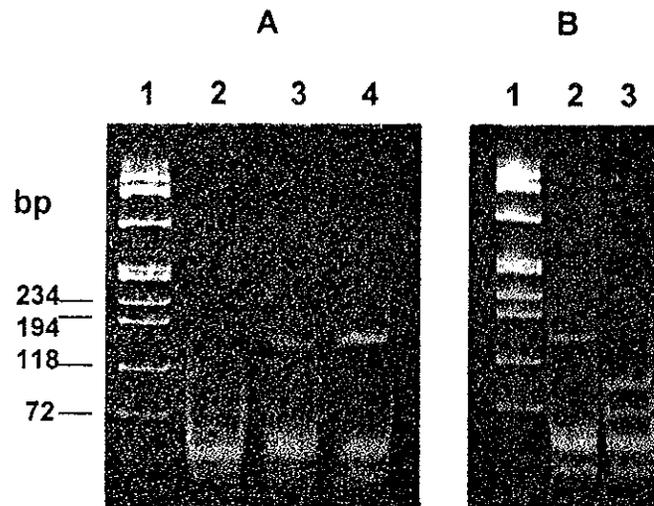


Figura 9. (A) Productos de amplificación del marcador Hinc II-13,259, que define el linaje C en Nativos Americanos analizados en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con bromuro de etidio. Carriles 2- 4: productos de amplificación de tres diferentes extractos de DNA antiguo. El fragmento amplificado es de 147 bp. El DNA antiguo del carril 2, no amplificó.

(B) Restricción de los productos de PCR con 5 unidades de la enzima Hinc II a 37°C toda la noche. Carril 2: producto de amplificación de DNA antiguo antes de la restricción. Carril 3: DNA antiguo después de la restricción. Los fragmentos son de 64 y 83 bp. Carriles A1 y B1: marcador estándar ϕ X174/ Hae III.

APÉNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos Generales de la Población Maya de Xcaret, Quintana Roo*.

No. Entierro	Tipo de Entierro	Individuos analizados ^a	Cronología	Localización Estructura	Sexo	Edad	Ofrenda o Material Asociado ^b
1	Primario directo de 1 individuo	1	PoTa	B-VIII	F	Adulto	Ninguna.
2	Primario directo de 1 individuo	1	PoTa	B-VIII. A un lado del Ent. 1	F	Adulto	Ninguna.
3	Primario directo Colectivo de 3 individuos	2	PoTa	B-VIII.	NI	Adultos	Una vasija , 4 cuentas y 3 pendientes de concha.
4	Primario directo de 1 individuo	1	PoTa	B-X	NI	Infantil	Material Asociado: dos pesas de red.
6	Primario directo de 1 individuo	1	CIa	B- VIII	F	Adulto	Cajete.
7	Primario directo de 1 individuo	1	PoTa	B- VIII	F	Adulto	Material Asociado: una pesa de red de cerámica.

8	Primario directo de 1 individuo	1	CITa	B-VIII	F	Adulto	Plato y 4 conchas perforadas.
10	Primario Indirecto dentro del talud de la construcción de 1 individuo	1	CITa	B-III	M	Adulto	Ninguna.
11	Primario directo de 1 individuo	1	PoTa	B-VI	M	Adulto	Un punzón de hueso animal, dos cuentas de concha.
12	Primario directo de 1 individuo	1	CITa	B-VI	M	Adulto	Un plato y un cuchillo de sílex.
15	Secundario Osario. 5 individuos	1	PoTa	B-IV	NI	Adulto	Material asociado: mano de metate de coral etc.
16	Primario directo de 1 individuo	1	NI	B-VI	NI	Infantil	Ninguna.
21	Primario directo de 1 individuo	1	NI	B-IV	M	Adulto	Ninguna.

23	Secundario Osario 2 individuos	2	PoTa	Plaza B-IV-V	M	Adultos	Dos cajetes, caracoles pintados de rojo.
24	Primario directo de 1 individuo	1	PoTa	Plaza B-IV-V	NI	Infantil	Un cajete y una cuenta de jade.
25	Primario directo de 1 individuo	1	NI	Plaza B-IV-V	M	Adulto	Ninguna.
26	Primario directo de 1 individuo	1	PoTa	Plaza B-IV-V	NI	Infantil	Molcajete y un machacador de papel.
27	Secundario de 1 individuo	1	CITa	B-VI	NI	Adulto	Cajete y una hacha de caracol.
28	Primario directo de 1 individuo	1	CITa	B-VI	M	Adulto	Plato.
29	Secundario Indirecto. Osario 9 individuos	2	Po	B-V	NI	Adultos	Ninguna.

30	Secundario de 1 individuo	1	NI	Plaza formada por B-VI B-VIII	NI	NI	Plato y una cuenta de caracol.
31	Primario Indirecto, en cista 1 individuo	1	CITa	B-IX	M	Adulto	Vasija.
32	Primario directo de 1 individuo	1	NI	B-VIII	F	Adulto	Un caracol.
33	Secundario Indirecto en cista. 2 individuos.	2	PoTa	B-VI	NI M	NI Adulto	Una cuenta de jadeita, un colgante de piedra verde y una punta de flecha de obsidiana.

* Los datos de: Cronología, Sexo y Edad fueron tomados de Tiesler (1999), el resto fue tomado de las cédulas de campo de Con (1992).

^aEn el presente estudio.

Claves de la cronología: Cl: Clásico, Po: Post-Clásico, Ta: Tardío, NI: no identificado. Claves del sexo: F: femenino, M: masculino

^bEl material asociado, son objetos que se encontraron en el entierro pero no estaba adyacentes al individuo.

Tabla 2. Haplotipos Fundadores del mtDNA Identificados en Amerindios al Secuenciar la Región Hipervariable I del D-Loop*.

Haplotipos y Transiciones	Posición	Haplotipos Equivalentes (Referencia)
I: T → C T → C	bp 16,189 bp 16,217	I (Horai et al. 1993) I (Ginther et al. 1993) IV (Ward et al. 1991) B (Torrioni et al. 1993)
II: C → T T → C	bp 16,187 bp 16,325	II (Horai et al. 1993) III (Ginther et al. 1993) III (Ward et al. 1991)
III: C → T G → A	bp 16,290 bp 16,319	III (Horai et al. 1993) IV (Ginther et al. 1993) II (Ward et al. 1991) A (Torrioni et al. 1993)
IV: T → C C → T	bp 16,298 bp 16,327	IV (Horai et al. 1993) II (Ginther et al. 1993) C (Torrioni et al. 1993)
V: C → T	bp 16,278	I (Ward et al. 1991)

*Tomado de Bailliet et al. 1994.

Tabla 3. Distribución de los Cuatro Linajes Fundadores del mtDNA en Poblaciones Contemporáneas del Nuevo Mundo*.

Populations	Percent				other	References
	A	B	C	D		
Siberian Eskimo [50]	80	0	20	0	0	Torroni et al. (1993b)
Chukchi [24]	37.5	0	16.7	16.7	29.2	Torroni et al. (1993b)
Koryaks [46]	23.9	0	21.7	8.7	45.7	Torroni et al. (1993b)
Evens [43]	0	0	58.1	7	34.9	Torroni et al. (1993b)
Yukagirs [27]	0	0	59.3	33.3	7.4	Torroni et al. (1993b)
Ngansans [49]	2	0	38.8	36.7	22.5	Torroni et al. (1993b)
Selkups [20]	0	0	35	0	65	Torroni et al. (1993b)
Nivkhs [57]	0	0	0	28.1	71	Torroni et al. (1993b)
Udegeys [46]	0	0	19.6	0	80.4	Torroni et al. (1993b)
Evenks [51]	3.9	0	84.3	9.8	2	Torroni et al. (1993b)
Old Harbor Eskimo [115]*	61.7	3.5	0	34.8	0	This study
Quzinkie Eskimo [41]*	73.2	0	4.9	14.6	7.3	This study
Gambell Eskimo [50]*	58	0	14	26	2	This study
Savoonga Eskimo [49]*	93.9	0	0	2	4.1	This study
St. Paul Aleut [72]*	25	0	1.4	66.7	6.9	This study
Dogrib [154]*	90.9	0	2	0	7.1	This study
Haida [38]	92.1	0	7.9	0	0	Ward et al. (1993)
Haida [25]	96	0	0	4	0	Torroni et al. (1993a)
Bella Coola [32]	78.1	6.25	9.4	6.25	0	Ward et al. (1993)
Bella Coola [25]	60	8	8	20	4	Torroni et al. (1993a)
Nuu- <i>Chah-Nulth</i> [15]	40	6.7	13.3	26.7	13.3	Torroni et al. (1993a)
Chipewa [15]	26.7	13.3	33.3	0	26.7	Torroni et al. (1993a)
Mohawk [18]*	46.4	10.5	13.8	0.6	28.7	This study
Ojibwa [28]	64.3	3.6	7.1	0	25	Torroni et al. (1993a)
Oneota [50]	24	10	56	8	2	Stone and Stoneking (1994)
Oklahoma Muskoke [71]*	36.6	15.5	9.9	38	0	This study
Navajo [48]	58.3	37.5	0	0	4.2	Torroni et al. (1993a)
Apache [25]	64	16	12	8	0	Torroni et al. (1993a)
Pima [30]	6.7	50	43.3	0	0	Schurr et al. (1990)
Alta Mixtec [15]	73.4	13.3	13.3	0	0	Torroni et al. (1994a)
Baja Mixtec [14]	92.9	7.1	0	0	0	Torroni et al. (1994a)
Mixe [16]	62.5	31.3	6.2	0	0	Torroni et al. (1994a)
Zapotec [15]	33.3	33.3	33.3	0	0	Torroni et al. (1994a)
Maya (Mexico) [27]	51.9	22.2	14.8	7.4	3.7	Schurr et al. (1990)
Berber/Cabecar [24]	54.2	45.8	0	0	0	Torroni et al. (1993a)
Boruca [14]	21.4	71.4	0	7.1	0	Torroni et al. (1993a)
Guatuso [20]	85	15	0	0	0	Torroni et al. (1994a)
Teribe [23]	80	20	0	0	0	Torroni et al. (1994a)
Goyamí [16]	68.8	31.2	0	0	0	Torroni et al. (1993a)
Kuna [16]	100	0	0	0	0	Torroni et al. (1993a)
Columbian [20]	59	20	25	5	0	Horai et al. (1993)
Pitcairn [10]	50	0	10	40	0	Torroni et al. (1993a)
Makiritari [10]	20	0	70	10	0	Torroni et al. (1993a)
Yanomama [24]	0	16.7	54.2	29.2	0	Torroni et al. (1993a)
Macushi [10]	10	20	30	40	0	Torroni et al. (1993a)
Meruba [10]	10	0	60	30	0	Torroni et al. (1993a)
Treuna [25]	17.9	0	32.1	50	0	Schurr et al. (1990)
Wapishana [12]	0	25	8.3	66.7	0	Torroni et al. (1993a)
Mataco [26]	10.7	35.7	0	53.6	0	Torroni et al. (1993a)
Krabo [14]	28.6	57.1	11.3	0	0	Torroni et al. (1993a)
Quechua [19]*	26.3	36.8	5.3	31.6	0	This study
Vizviri (Aymara) [76]*	6.6	64.5	10.5	18.4	0	This study
Caquena (Aymara) [23]*	17.4	60.9	13	8.7	0	This study
Pamnacota (Aymara) [12]*	8.3	50	41.7	0	0	This study
Guallatari (Aymara) [19]*	0	55.6	33.3	11.1	0	This study
Codpa (Aymara) [19]*	11.1	66.7	11.1	11.1	0	This study
Guamatagua (Aymara) [17]*	0	100	0	0	0	This study
Esquina (Aymara) [11]*	0	64.3	0	35.7	0	This study
Ilapata (Aymara) [12]*	0	100	0	0	0	This study
Total Aymara [172]*	6.4	67.4	12.2	14	0	This study
Atacameño [50]*	12	72	10	6	0	This study
Argentinian Mapuche [39]	15.1	38.5	20.5	25.6	0	Ginther et al. (1994)
Chilean Mapuche [45]	4.1	22.2	40	33.3	0	Howa et al. (1993)
Burakolbun (Peheunche) [26]*	0	3.8	26.9	69.2	0	This study
Trapa Trapa (Peheunche) [74]*	2.7	10.8	40.5	15.9	0	This study
Total Peheunche [100]*	2	9	37	52	0	This study
Rudliche [80]*	1.75	28.75	18.75	48.75	0	This study

*Tomado de Merriwether et al. 1995. Los asteriscos indican datos del autor

Tabla 4. Frecuencias de los Cuatro Linajes de los Pobladores de América Reportadas en Varias Poblaciones Antiguas y en los Mayas Contemporáneos de Yucatán.

Población	n ¹	A %	B %	C %	D %	Otro ² %	Referencia
Precolombina Illinois.	108	31.5	12.0	42.6	8.3	5.6	Stone y Stoneking 1998.
Prehispánica Pantano del Gran Lago Salado.	32	0.0	73.0	13.0	7.0	7.0	Parr et al. 1996.
Prehispánica Maya Copán.	9	0.0	0.0	89.0	11.0	0.0	Merriwether et al. 1997.
Antigua Siglo XIX-XX Tierra del Fuego-Patagonia.	60	0.0	0.0	38.3	60.0	1.7	Lalueza et al. 1997.
Prehispánica Maya Xcaret	25	84.0	4.0	8.0	0.0	4.0	Este estudio
Contemporánea Maya península de Yucatán.	27	51.9	22.22	14.81	7.40	3.7	Torróni et al. 1992.

¹ Número de individuos analizados.

² Individuos que no presentaron ninguno de los cuatro linajes fundadores de los Nativos Americanos.

Tabla 5. Primers Usados para Tipificar el mtDNA.

Coordenadas de los primers y Linajes	Secuencia de los <i>Primers</i> (5' a 3')	Tamaño del Fragmento bp	Referencia
Hae III-663 A L 590-611 H 743-765	ACCTCCTCAAAGCAATACACTG GTGCTTGATGCTTGTTCTTTTG	176	Stone y Stoneking (1993)
Delección 9 bp B L 8196-8215 H 8295-8316	ACAGTTTCATGCCCATCGTC ATGCTAAGTTAGCTTTACAGTG	121 o 112	Modificado de Stone y Stoneking (1993)
Hinc II-13,259 C L 13209-13232 H 13393-13416	CGCCCTTACACAAAATGACATCAA TCCTATTTTTTCGAATATCTTGTTT	208	Stone y Stoneking (1993)
Hinc II-13,259 C L 13179-13199 H 13305-13325	CGCTATCACCCTCTGTTCGC CAGATGTGCAGGAATGCTAGG	147	Este estudio
Alu I-5,176 D L 5101-5122 H 5230-5249	TAACTACTACCGCATTCTACT AAAGCCGGTTAGCGGGGGCA	149	Modificado de Stone y Stoneking (1993)

L= cadena ligera del mtDNA

H= cadena pesada del mtDNA.

Tabla 6. Tamaño de los Productos de PCR y de los Fragmentos de Restricción para cada Marcador Genético Utilizado.

Marcador Genético	Linaje Del mtDNA	Tamaño del Producto de Amplificación bp.	Tamaño de los Fragmentos de Restricción bp.
Hae III - 663	A	176	101 + 75
Hinc II- 13,259	C	208	155 + 53
		147	83 + 64
Alu I - 5,176	D	149	72 + 77

Tabla 7. Métodos de Extracción Utilizados para Recuperar el DNA antiguo y el Número de Repeticiones Realizadas en cada Individuo.

Individuo*	Hae III-663	Delección de 9 bp 8,272-8,289	Hinc II-13,259	Alu I-5,176	Linaje
1	M1+	C1-	M2+	M1+	A
2	M2+	C2-	K1-1+, M1+, C1+	M1+	A
3	M2+	K2-, Sec1-	M2+	M1+	A
3-2	K1+	K2-	C3+	K2+	A
4	M1+	K1-	M2+, Sec1+	M1+	A
6	M2+	K1-	K1+, K1+	M1+, M1+	A
7	M1+, K1+, K3+	K1-, Q1-, Sec1-	M1+, Q1+	M1+	A
8	M2+	K1-	M1+, Sec1+	M2+	A
11	M1+	C1-, K1-	M1+, K1+	M2+	A
12	M1+	K1-, Sec1-	M2+	M2+	A
15	M1-, M2-	K1-	K1+, K2-, Sec1-	M2+	C
16	M1+, K2+	Sec1-	M1+	K1+	A
21	M1-	K2-	K1-	M1+	C
23	M1-2+, M1+	C1-	M1+	M3+	A
23-2	M2+	K2-	M2+	M2+	A
24	M2+	K2-	M2+	M1+	A
25	M1-, Q2+, Sec1+	Q2-	Sec1+	M1-	A

27	M2+, M1+	C1-	K1+	M1+	A
29	M1-, M1-	K3-	M1+	M3+	<i>Otro</i>
29-9	M1-2+, Sec1+	K1-	M1+, M1+	M2+	A
30	M2+, K1+	K1-	M1+, K2+	M3+	A
31	M1+, Q1+	K1-	M1+, C1+	K1+	A
32	M1+	K1-	M1+, Sec1+	M1+	A
33	M1-, Sec1-	C1+	M2+	M1+	B
33-2	M1+, M2+, K1+	K1-	M1+	M1+	A

Cada extracción de DNA individual está indicada por una letra mayúscula, seguida por el número de amplificaciones por PCR, el resultado del análisis de restricción y de la secuenciación. M: Muñoz et al.; K: Krings et al.; C: Chelex-100; Q: Qiagen; +: presencia del sitio de restricción o de la delección de 9 bp; -: ausencia del sitio de restricción o de la delección de 9 bp; Sec: secuenciación directa de los productos de PCR.

* El número de cada individuo corresponde al número de entierro y una clave adicional en el caso de entierros múltiples.

Tabla 8. Frecuencias de los Cuatro Linajes Fundadores del mtDNA en Mayas Antiguos y Contemporáneos y en otras Poblaciones Contemporáneas de Origen Mesoamericano.

Población	n ¹	A	B	C	D	Otro ²	Referencia
		%	%	%	%	%	
Maya Antigua, Xcaret	25	84.0	4.0	8.0	0.0	4.0	Este estudio
Maya Antigua, Copán	9	0.0	0.0	89.0	11.0		Merriwether et al. (1997)
Maya Contemporánea	27	51.9	22.2	14.8	7.4	3.7	Torrioni et al. (1992)
Mixe	16	62.5	31.3	6.2	0.0		Torrioni et al. (1994)
Mixtecos de la (Alta) ³	15	73.4	13.3	13.3	0.0		Torrioni et al. (1994)
Mixtecos de la (Baja) ⁴	14	92.9	7.1	0.0	0.0		Torrioni et al. (1994)
Zapotecos	15	33.3	33.3	33.3	0.0		Torrioni et al. (1994)

¹Número de individuos tipificados.

²Individuos que no presentan ninguno de los cuatro linajes de los Nativos Americanos.

³Localizados a 60 millas al noroeste de la ciudad de Oaxaca.

⁴Localizados a 100 millas al noroeste de la ciudad de Oaxaca.

Founding Amerindian Mitochondrial DNA Lineages in Ancient Maya From Xcaret, Quintana Roo

Angélica González-Oliver,¹ Lourdes Márquez-Morfin,² José C. Jiménez,³ and Alfonso Torre-Blanco^{1*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

²Escuela Nacional de Antropología e Historia, Instituto Nacional de Antropología e Historia, México D.F. 14039, México

³Dirección de Antropología Física, Instituto Nacional de Antropología e Historia, México D.F. 11100, México

KEY WORDS ancient DNA; Native American diversity; RFLPs; New World

ABSTRACT Ancient DNA from the bone remains of 25 out of 28 pre-Columbian individuals from the Late Classic-Postclassic Maya site of Xcaret, Quintana Roo, was recovered, and mitochondrial DNA (mtDNA) was amplified by using the polymerase chain reaction. The presence of the four founding Amerindian mtDNA lineages was investigated by restriction analysis and by direct sequencing in selected individuals. The mtDNA lineages A, B, and C were found in this population. Eighty-four percent of the individuals were lineage A, whereas lineages B and C were present at low frequencies, 4% and 8%, respectively. Lineage D was absent from our sample. One individual

did not possess any of the four lineages. Six skeletons out of 7 dated from the Late Classic period were haplotype A, whereas 11 skeletons out of 16 dated from the Postclassic period were also haplotype A.

The distribution of mtDNA lineages in the Xcaret population contrasts sharply with that found in ancient Maya from Copán, which lack lineages A and B. On the other hand, our results resemble more closely the frequencies of mtDNA lineages found in contemporary Maya from the Yucatán Peninsula and in other Native American contemporary populations of Mesoamerican origin. *Am J Phys Anthropol* 116:230–235, 2001. © 2001 Wiley-Liss, Inc.

Nearly all mtDNAs from Native Americans can be traced back to one of four maternal lineages present in the founders of New World populations (Schurr et al., 1990; Torroni et al., 1992). Lineage A is defined by a *Hae*III site gain at nucleotide position (np) 663 of the reference sequence (Anderson et al., 1981). Lineage B is defined by the presence of a 9-bp deletion in the intergenic region between the cytochrome oxidase II and lysine tRNA genes. Lineage C is defined by a *Hinc*II restriction site loss at np 13,259 and an *Alu*I site gain at np 13,262. Lineage D is defined by an *Alu*I restriction site loss at np 5,176 (Torroni et al., 1992). Many analyses of mtDNA haplotypes in New World contemporary and ancient populations have shown the presence of a small number of individuals possessing none of the markers defining the four founding lineages; these different haplotypes have been grouped as "others" (Torroni et al., 1993; Stone and Stoneking, 1998), lineage N (Stone and Stoneking, 1993; Parr et al., 1996), or haplotype E (Bailliet et al., 1994).

A nonrandom distribution of lineages A and B in New World populations has been suggested. Lineage A shows a clear trend of decreasing frequency from north to south, while lineage B shows the reverse trend (Merriwether et al., 1995). Although the frequencies of lineages C and D vary widely in North, Central, and South America, they exhibit a general

southward trend towards higher frequencies (Lalueza et al., 1997).

An analysis of contemporary lowland Maya individuals from the central Yucatán Peninsula found the presence of the four mtDNA founding lineages (Torroni et al., 1992). These contemporary Maya showed higher frequencies of haplogroups A and B, and lower frequencies of haplogroups C and D (Table 3). These frequencies are similar to those found in other contemporary Native American populations of Mesoamerican origin (Table 3). However, ancient Maya skeletal remains from the Honduras Classic site of Copán showed only the presence of haplogroups C and D (Merriwether et al., 1994, 1997). To contribute to the understanding of this contrast between the frequencies of the founding mtDNA lineages in contemporary and ancient Maya populations, we analyzed the distribution of these lineages

Grant sponsor: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México; Grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico and Dirección General de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México

*Correspondence to: Alfonso Torre-Blanco, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México
E-mail: atb@hp.ciencias.unam.mx

Received 20 December 2000; accepted 21 June 2001

TABLE 1. Primers used for mtDNA typing

mtDNA site	Primer coordinates	Primer sequence (5' to 3')	Fragment size (bp)	Reference
<i>Hae</i> III 663	L 590-611 H 743-765	ACCTCCTCAAAGCAATACACTG GTGCTTGATGCTTGTCTTTTG	176	Stone and Stoneking (1993)
9-bp deletion	L 8196-8215 H 8295-8316	ACAGTTTCATGCCCATCGTC ATGCTAAGTTAGCTTTACAGTG	121 or 112	Modified from Stone and Stoneking (1993)
<i>Hinc</i> II 13259	L 13209-13232 H 13393-13416	CGCCCTTACACAAAATGACATCAA TCCTATTTTTCGAATATCTTGTTC	208	Stone and Stoneking (1993)
<i>Hinc</i> II 13259	L 13179-13199 H 13305-13325	CGCTATCACCACCTCTGTTCGC CAGATGTGCAGGAATGCTAGG	147	Present study
<i>Alu</i> I 5176	L 5101-5122 H 5230-5249	TAACTACTACCGCATTCCTACT AAAGCCGGTTAGCGGGGGCA	149	Modified from Stone and Stoneking (1993)

L, light and H, heavy describing strand of the human mtDNA.

in an ancient Maya population from the eastern Yucatán Peninsula.

Here we report on the results of an analysis of the four founding Amerindian mtDNA lineages in the skeletal remains of 28 individuals of pre-Columbian origin from the late Classic-Postclassic Maya site of Xcaret, Quintana Roo.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Skeletal remains of 28 individuals, recovered by M.J. Con during the 1990 season of archaeological excavations at the Late Classic-Postclassic Maya site of Xcaret, Quintana Roo, were used for DNA extraction. These skeletons were found in Group B, first described by Andrews and Andrews (1975). This is a large group of residential structures surrounding two central buildings; most skeletons were found in the courts or near the walls of residential structures (Tiesler, 1999). Based on the site chronology and the objects associated with the 28 skeletons, mainly ceramics, 7 individuals were dated to the Late Classic period (AD 600-800) and 16 individuals to the Postclassic (AD 900-1521); the remaining 5 could not be dated with certainty (Tiesler, 1999).

Contamination precautions

All procedures here described were carried out using new, sterilized disposable tubes and filter pipette tips. All nondisposable materials were soaked in 1 N HCl or bleach, rinsed with ultrapure water, and autoclaved for 30 min. Face mask, head cap, and a clean laboratory coat were always worn; new gloves were frequently changed. All reagents were molecular biology-grade (Sigma Chemical Co. and Gibco BRL). Autoclaved ultrapure water (Milli-Q Plus system, Millipore) was always used in the preparation of buffers and other reagents; these were sterilized after preparation unless they contained any denaturable substance. PCR reagents were acquired from PE Biosystems and Gibco BRL.

DNA extraction

Ancient DNA was extracted from ribs or vertebrae of individual skeletons. One bone was used for typing haplogroups A, C, and D, and a different bone

was used for typing haplogroup B. To prevent contamination from previous handling, the bones were exhaustively brushed to eliminate dirt, the outer layer of bone was removed using a new sterile razor blade, and the clean bones were UV-irradiated at 254 nm in a crosslinker for 1 min. Each sample was ground to a fine powder. These procedures were carried out in a dedicated laminar flow cabinet equipped with a 0.3- μ m HEPA filter, in a laboratory where no human DNA work was ever done; this laboratory is located on a different floor from the laboratory where DNA extraction and PCR are done.

The following method was used for ancient DNA isolation (M.L. Muñoz et al., in preparation, lmuñoz@cell.cinvestav.mx). One gram of powdered bone was incubated in extraction buffer (0.1 M EDTA, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) for 1 h at 37°C and 2 h at 50°C, with continuous shaking. DNA was phenol- and phenol-chloroform-extracted, followed by ethanol precipitation. DNA was electrophoresed in 1% agarose gels, a high molecular weight band (when visible), and the smears of degraded DNA were cut and purified with the GeneClean kit (Bio 101). Alternatively, the technique described by Krings et al. (1997) was also used for DNA extraction. In a few cases, Chelex-100 resin (Wals et al., 1991; Woodward et al., 1994) or the Qiagen Blood and Cell Culture DNA Kit were used. The extraction procedures were carried out using dedicated pipettors, in a dedicated laminar flow cabinet equipped with a 0.3- μ m HEPA filter, in a room separate from the place where PCR reactions were prepared.

PCR amplification

Small specific segments of mtDNA carrying the markers for lineages A, B, C, and D were PCR-amplified using the primer pairs described in Table 1. Primers L-5120 and H-8297, described by Stone and Stoneking (1993), were slightly modified by adding two nucleotides each, to increase the specificity of the amplification reaction by allowing annealing at a higher temperature. The optimal annealing temperatures and magnesium concentration were experimentally determined. Reactions were carried out in 25 or 100 μ l containing 100 μ M of each dNTP, 0.1 μ M each primer, 0.1 mg/ml BSA, 1.5 mM MgCl₂.

for lineage A, B, and C primers or 3.5 mM MgCl₂ for lineage D primers, 6 units/100 µl of AmpliTaq DNA polymerase Stoffel fragment, and 2.5 or 10 µl of the 10× buffer supplied by the manufacturer (PE Biosystems). The amount of DNA template was variable and individually adjusted for each sample. A program of 40 cycles of 30 s of melting at 94°C, 1 min annealing (at 63°C for lineage A, 52°C for lineage B, 57°C or 60°C for lineage C, and 55°C for lineage D), and 1 min extension at 72°C was used for PCR amplification in a Perkin-Elmer 2400 thermocycler. Negative extraction controls, which contained all reagents except bone powder, were always done; these, along with negative PCR controls, were included in every set of PCR reactions. PCR reactions were prepared in a dedicated HEPA filtered laminar flow cabinet in a room physically separated from the laboratory where amplification products were handled. Amplification results were either replicated in separate amplification reactions from the same extract, or replicated from different extracts.

Twelve microliters of PCR product were electrophoresed in 12% or 14% polyacrylamide gels (Sambrook et al., 1989). The size of the PCR product was determined by comparison to known standards after staining with ethidium bromide. Twelve microliters of PCR product for typing lineages A, C, and D were incubated with five units of the appropriate restriction endonuclease at 37°C overnight and electrophoresed as above.

Sequencing

The amplification products to be sequenced were electrophoresed in 12% polyacrylamide gels, and then the desired band was cut and purified as described by Sambrook et al. (1989). Ten microliters of the purified product were sequenced with Thermo-Sequenase (Amersham), using the same primers employed for PCR amplification following the supplier's recommendations; the reaction products were separated by electrophoresis, and the gels were fixed, dried, and subjected to autoradiography. Alternatively, PCR amplification products were purified by using the Concert Rapid PCR Purification kit (Gibco BRL) and sequenced in an automatic sequencer using ABI Prism dye terminator sequencing kits; both forward and reverse strands were sequenced.

Statistical analysis

Normal approximation tests for differences among two proportions were used to compare the frequencies of mtDNA haplogroups in the Maya and other populations of Mesoamerican origin listed in Table 3 (Zar, 1996).

RESULTS

Morphometric analysis of the bone remains showed that 4 individuals were infants younger than 6 years old; the remaining 24 were adolescents and adults.

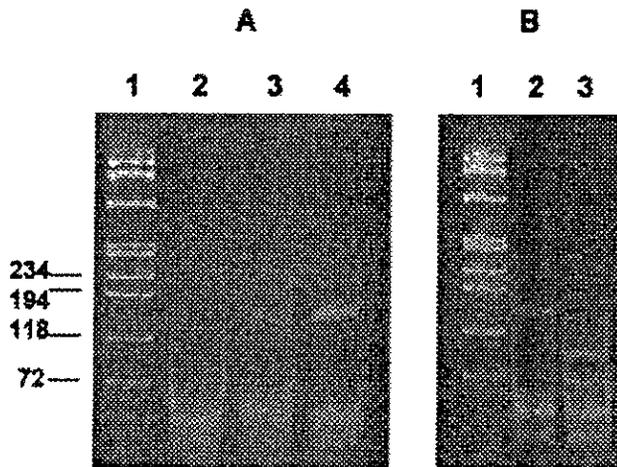


Fig. 1. Amplification product (A) and restriction pattern (B) of the polymorphic mtDNA site delineating Amerindian haplogroup C. Lanes A2-A4, PCR amplification of three different ancient DNA extracts. Lane B2, amplification product before restriction. Lane B3, amplification product incubated overnight, at 37°C, with five units of *HincII*. Lanes A1 and B1, size standard, ϕ X174 RF DNA/*HaeIII* fragments; sizes at left are in bp.

We initially used the primers described by Stone and Stoneking (1993) for amplification of the region carrying the *HincII* 13259 marker. However, we failed to obtain an amplification product from DNA extracts of several individuals who had been successfully typed for lineages A or D. Therefore, we designed primers for lineage C typing that amplify smaller fragments (Fig. 1). The use of these new primers allowed us to amplify DNA from those individuals with whom we had previously failed (data not shown).

We obtained amplifiable DNA from 25 out of 28 individuals. Though no DNA extraction method gave positive results with all the samples, the method described in detail in Materials and Methods (M.L. Muñoz et al., in preparation) and the method described by Krings et al. (1997) showed the best success rates. Fifty-six percent and 32% of the successful DNA amplifications were done with DNA obtained with the methods described by Muñoz et al. (in preparation) and by Krings et al. (1997), respectively. To test the reproducibility of DNA extraction methods, the mtDNA segment carrying the *AluI*-5176 site was amplified from three DNA samples obtained from the same individual by three different extraction procedures; the same results of the restriction analysis and sequencing were obtained from the three samples. The results obtained by restriction analysis were verified by direct sequencing of PCR products in 12 selected samples. Table 2 shows the detailed results obtained with the different DNA extraction methods here employed.

In a few cases we obtained conflicting results (e.g., lineage C, individuals 2 and 15) (Table 2). In these cases the correct result was decided after replications were done in different extracts or by direct sequencing.

TABLE 2. Ancient DNA extraction methods used and number of repeats made for each sample¹

Burial no.	HaeIII-663	9-bp deletion	HincII-13259	AluI-5176	Lineage
1	M1+	C1-	M2+	M1+	A
2	M2+	C2-	K1-1+, M1+, C1+	M1+	A
3	M2+	K2-, Sec1-	M2+	M1+	A
3-2	K1+	K2-	C3+	K2+	A
4	M1+	K1-	M2+, Sec1+	M1+	A
6	M2+	K1-	K1+, K1+	M1+, M1+	A
7	M1+, K1+, K3+	K1-, Q1-, Sec1-	M1+, Q1+	M1+	A
8	M2+	K1-	M1+, Sec1+	M2+	A
11	M1+	C1-, K1-	M1+, K1+	M2+	A
12	M1+	K1-, Sec1-	M2+	M2+	A
15	M1-, M2-	K1-	K1+, K2-, Sec1-	M2+	C
16	M1+, K2+	Sec1-	M1+	K1+	A
21	M1-	K2-	K1-	M1+	C
23	M1-2+, M1+	C1-	M1+	M3+	A
23-2	M2+	K2-	M2+	M2+	A
24	M2+	K2-	M2+	M1+	A
25	M1-, Q2+, Sec1+	Q2-	Sec1+	M1+	A
27	M2+, M1+	C1-	K1+	M1+	A
29	M1-, M1-	K3-	M1+	M3+	Other
29-9	M1-2+, Sec1+	K1-	M1+, M1+	M2+	A
30	M2+, K1+	K1-	M1+, K2+	M3+	A
31	M1+, Q1+	K1-	M1+, C1+	K1+	A
32	M1+	K1-	M1+, Sec1+	M1+	A
33	M1-, Sec1-	C1+	M2+	M1+	B
33-2	M1+, M2+, K1+	K1-	M1+	M1+	A

¹ Each individual DNA extract is indicated by a capital letter, followed by the number of successful amplifications and the result of the restriction analysis. M, Muñoz et al., in preparation; K, Krings et al., 1997; C, Chelex-100; Q, Qiagen; +, presence of restriction site or 9-bp deletion; -, absence of restriction site or 9-bp deletion, Sec, direct sequencing of PCR products.

TABLE 3. Frequencies of four primary mtDNA haplogroups in ancient and contemporary Maya and in other contemporary populations of Mesoamerican origin

Population	n ¹	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Other (%) ²	Reference
Ancient Maya, Xcaret	25	84.0	4.0	8.0	0.0	4.0	Present study
Ancient Maya, Copán	9	0.0	0.0	89.0	11.0		Merriwether et al (1997)
Contemporary Maya	27	51.9	22.2	14.8	7.4	3.7	Torrioni et al. (1992)
Mixe	16	62.5	31.3	6.2	0.0		Torrioni et al (1994)
Mixtec (Alta)	15	73.4	13.3	13.3	0.0		Torrioni et al (1994)
Mixtec (Baja)	14	92.9	7.1	0.0	0.0		Torrioni et al (1994)
Zapotec	15	33.3	33.3	33.3	0.0		Torrioni et al (1994)

¹ Number of subjects.

² Individuals not segregating into any of the four major Native American haplogroups.

Twenty-four individuals could be assigned to 1 of the 4 primary haplogroups: 21 individuals belonged to haplogroup A (84%), 1 to haplogroup B (4%), and 2 to haplogroup C (8%). No haplotype D was found in any of the 25 individuals typed. One individual did not possess any of the four characteristic markers and was classified as "other" (Table 3).

The statistical analysis of the frequencies listed in Table 3 showed that the Xcaret sample is significantly different ($P < 0.05$) from Copán for lineages A and C and from the Zapotec for lineages A, B, and C. Copán, on the other hand, is different ($P < 0.05$) from the other contemporary populations for lineages A and C, with the exception of the Zapotec, and different from all with respect to lineage C.

Six skeletons out of 7 dated from the Late Classic period were haplotype A; the remaining one could not be typed. Eleven skeletons out of 16 dated from the Postclassic period were haplotype A, 1 was B, 1 was C, 2 could not be typed, and the remaining one was the individual classified as "other" by its unaffiliation to any of the four major haplogroups.

Negative DNA extraction controls and negative PCR controls were consistently negative, indicating the absence of detectable sample contamination.

DISCUSSION

The high frequency of haplogroup A found in our sample of ancient Maya from Xcaret is consistent with the predominant presence of this lineage among many Native American populations in North and Central America. In particular, haplogroup A is the one most frequently found among contemporary populations of Mesoamerican origin, with the exception of the Zapotec, whereas haplogroups B and C are found at lower frequencies and haplogroup D is nearly absent (Table 3). From this perspective, the ancient population of Xcaret appears to be more closely related to contemporary Maya and other contemporary populations of Mesoamerican origin (Mixe and Mixtec) than to the ancient Copán Maya. These results do not show important breaks in genetic continuity between ancient and contemporary lowland Maya populations in the Yucatán Penin-

sula; however, some degree of genetic admixture with other Mesoamerican populations from southern Mexico (Zapotec, Mixe, or Mixtec) cannot be ruled out. Sequence analysis of the hypervariable regions of mtDNA would be useful to clarify this issue.

Copán is the southeasternmost major Classic Maya site. Although its culture was related to lowland Maya tradition, it was nearly surrounded by non-Maya groups (Sharer, 1994). This setting of Copán as a frontier city probably favored some degree of genetic flux with non-Maya populations. Indeed, it has been proposed that geographic proximity influences the frequency of these lineages more strongly than does linguistic affiliation, probably due to substantial female migration among adjacent but linguistically unrelated, or only remotely related, tribes (Lorenz and Smith, 1996). However, it should be noted that contemporary non-Maya Native Central Americans from different populations also exhibit the presence of A and B lineages at high frequencies, a very low frequency of haplogroup D, and notably, the absence of haplogroup C (Torróni et al., 1993; Merriwether et al., 1995; Batista et al., 1995). The ancient Maya from the Copán sample were dated to the Late Classic period (AD 700–1000) (Storey, 1997) or to the Coner ceramic phase (AD 700–1250) (Merriwether et al., 1997), and so they were roughly contemporary with at least 7 individuals of our Xcaret sample. Notwithstanding, 6 individuals from Xcaret, out of 7 dated from the Late Classic Period, were haplotype A; therefore, temporality would not seem to be responsible for the difference between the Copán and Xcaret ancient Maya.

The frequencies of mtDNA haplotypes in the ancient Maya from Copán could be biased by the small sample size (9 individuals) and, indeed, the authors give a warning that the true frequencies are likely to be different when more individuals are typed (Merriwether et al., 1997). Still, it is surprising to find a complete absence of the lineage most frequently found in other Maya or Mesoamerican populations. It would be tempting to conclude that these different frequencies may reflect the fact that the Xcaret and Copán populations represent different Maya groups, but additional data from the Copán population are needed.

The finding of individuals not belonging to haplogroups A–D has also been reported for other ancient Native American populations (Stone and Stoneking, 1993, 1998; Parr et al., 1996). This supports the proposal that more than four lineages could have entered the Americas from Asia; however, care should be taken in classifying or grouping haplotypes only on the basis of their unaffiliation to any of the four founding lineages A–D.

Contamination with modern human DNA is undoubtedly the most important concern when working with ancient DNA. Although formally it is almost impossible to discard contamination, many

precautions can be taken to reduce the probability of its occurrence to a minimum. In this work, every reasonable effort was made to avoid contamination with modern human DNA, including the cleaning and preparation of the bone remains in a laboratory where no human DNA work was ever done. We found that designing new primers to amplify smaller fragments for typing lineage C improved our ability to amplify this region; this lends support to our assessment that we were working with true ancient DNA. Moreover, the fact that we identified the sex, by DNA analysis (Faerman et al., 1995), of the bone remains of at least 30 male individuals from an infantile population (in preparation) that were handled exclusively by women allows us to discard the notion that DNA contamination arose in our own laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Lourdes Muñoz from Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Mexico, for training one of the authors (A.G.-O.) in ancient DNA extraction techniques, and Isaías H. Salgado-Ugarte for the statistical analysis.

LITERATURE CITED

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruyn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.
- Andrews EW IV, Andrews AP. 1975. A preliminary study of the ruins of Xcaret, Quintana Roo, Mexico. Middle American Research Institute, no. 40. New Orleans. Tulane University.
- Bailliet G, Rothhammer F, Carnese FR, Bravi CM, Bianchi NO. 1994. Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am J Hum Genet* 54:27–33.
- Batista O, Kolman CJ, Bermingham E. 1995. Mitochondrial DNA diversity in the Kuna Amerinds of Panamá. *Hum Mol Genet* 4:921–929.
- Faerman M, Filon D, Kahila G, Greenblatt C, Smith P, Oppenheim A. 1995. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 167:327–332.
- Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90:19–30.
- Lalueza C, Pérez-Pérez A, Prats E, Cornudella L, Turbón D. 1997. Lack of founding amerindian mitochondrial DNA lineages in extant aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum Mol Genet* 6:41–46.
- Lorenz JG, Smith DG. 1996. Distribution of four founding mtDNA haplogroups among Native North Americans. *Am J Phys Anthropol* 101:307–323.
- Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. 1994. Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia* 50:592–601.
- Merriwether DA, Rothhammer F, Ferrell RE. 1995. Distribution of the four founding lineage haplotypes in Native Americans suggests a single wave of migration for the New World. *Am J Phys Anthropol* 98:411–430.
- Merriwether DA, Reed DM, Ferrell RE. 1997. Ancient and contemporary mitochondrial DNA variation in the Maya. In Whittington, SL, Reed DM, editors. *Bones of the Maya: studies of ancient skeletons*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. p 208–217.

- Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465.
- Parr RL, Carlyle SW, O'Rourke DH. 1996. Ancient DNA analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *Am J Phys Anthropol* 99:507-518.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schurr TG, Ballinger SW, Gan Y, Hodge JA, Merriwether DA, Lawrence DN, Knowler WC, Weiss KM, Wallace DC. 1990. Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am J Hum Genet* 46:613-623.
- Sharer RJ. 1994. *The ancient Maya*. Stanford, CA: Stanford University Press.
- Stone AC, Stoneking M. 1993. Ancient DNA from a pre-Columbian Amerindian population. *Am J Phys Anthropol* 92:463-471.
- Stone AC, Stoneking M. 1998. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *Am J Hum Genet* 62:1153-1170.
- Storey R. 1997. Individual frailty, children of privilege, and stress in Late Classic Copán. In: Whittington SL, Reed DM, editors. *Bones of the Maya: studies of ancient skeletons*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. p 116-126.
- Tiesler V. 1999. *Rasgos bioculturales entre los antiguos Mayas*. Ph.D. thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Torróni A, Schurr TG, Yang C, Szathmari EJE, Williams RC, Schanfield MS, Troup GA, Knowler WC, Lawrence DN, Weiss KM, Wallace DC. 1992. Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130:153-162.
- Torróni A, Schurr TG, Cabell MF, Brown MD, Neel JV, Larsen M, Smith CM, Vullo CM, Wallace DC. 1993. Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53:563-590.
- Torróni A, Chen Y, Semino O, Santachiara-Benecere AS, Scott CR, Lott ML, Winter M, Wallace DC. 1994. mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four Native American populations from southern Mexico. *Am J Hum Genet* 54:303-318.
- Wals PS, Metzger DA, Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biol Techniques* 10:506-513.
- Woodward SR, King MJ, Chiu NM, Kuchar MJ, Griggs CW. 1994. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR Methods Appl* 3:244-247.
- Zar JH. 1996. *Biostatistical analysis*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall. p 552-554.