



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-IZTACALA

**Estudio del ADN mitocondrial de restos óseos
antiguos de los pobladores de Monte Alban, Oaxaca.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO PRESENTA
IGNACIO LOZA MARTÍNEZ**

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. Ma. de LOURDES MUÑOZ MORENO

MÉXICO, D. F. 2002.

e-mail: iloza60@hotmail.com



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



U.N.A.M. CAMPUS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. de Lourdes Muñoz mi sincero agradecimiento, por todo su apoyo dentro y fuera del Laboratorio, por su conocimiento y las experiencias profesionales compartidas.

Al CONACyT y al Museo Nacional de Antropología e Historia, por la beca otorgada en la realización del presente trabajo.

A la Dra. Martha, Dr. Jorge, M. en C. Elias, Biol. Tzasna, por sus sugerencias, críticas y comentarios en la revisión de este trabajo de tesis.

A mi Madre Leticia que me dio la dicha de nacer.

A mi Padre Ignacio por su esfuerzo y apoyo.

A mi compañera Lorena por su amor y comprensión.

A mis Hermanos, Julia, Micky, Uriel, Leticia y Mario.

A los Profesores y compañeros de la FES-IZTACALA.

A Hugo, Tony, Francisco, Miguelito, Gloria, Alejandro, Miguel...del CINVESTAV-IPN.

Al Dr. Calderón del CICATA-IPN.

A

Michelle y Donovan

Con cariño.

ÍNDICE

IZT.

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
• REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	4
• ADN MITOCONDRIAL.....	7
• TEORÍAS MIGRATORIAS.....	11
II. ÁREA DE ESTUDIO.....	18
III. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	22
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
• LIMPIEZA DE MUESTRAS.....	25
• EXTRACCIÓN DE ADN.....	25
• ELECTROFORESIS.....	28
• PURIFICACIÓN DE ADN.....	31
• AMPLIFICACIÓN PCR.....	34
• OLIGONUCLEÓTIDOS.....	36
• PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.....	39
• REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN.....	40
• PURIFICACIÓN.....	44
• SECUENCIACIÓN.....	46
• INHIBIDORES DE LA PCR.....	46

RESULTADOS.....	47
• GEL DE INHIBICIÓN DE LA PCR.....	47
• GEL DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	48
• TABLA DE EXTRACCIÓN DE ADN.....	49
• GEL DE PURIFICACIÓN POR GENE CLEAN.....	50
• GEL DE PURIFICACIÓN POR COLUMNA.....	50
• GELES DE MUESTRAS AMPLIFICADAS.....	50
• TABLA DE MUESTRAS AMPLIFICADAS.....	53
• SECUENCIAS DE ADN MITOCONDRIAL.....	54
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	63
APÉNDICE.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	68

RESUMEN

El ADN antiguo que se ha preservado a través del tiempo, ha permitido una variedad de estudios entre los cuales están, el seguir el cambio genético entre las poblaciones así como migraciones de las mismas. Existe la teoría de que la colonización del Nuevo Mundo se realizó por el Estrecho de Bering en una o más migraciones humanas llevando consigo los haplotipos primarios denominados A, C y D que representan regiones específicas del ADN mitocondrial que pueden o no ser reconocidas por una enzima de restricción y B que se caracteriza por la delección de 9pb. El presente trabajo es una contribución para la elucidación del número de estas migraciones, empleando muestras de restos óseos antiguos de los pobladores de Monte Albán, Oaxaca. Así mismo este trabajo contribuyó a la purificación de este ADN eliminando contaminantes inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa, mediante el método de “Gene Clean”. Este ADN puro fue amplificado y secuenciado. Es interesante hacer notar que detectamos exclusivamente en cuatro muestras de esta población, el haplotipo A.

I.-INTRODUCCIÓN

Uno de los temas que durante mucho tiempo ha despertado gran interés en el ser humano ha sido el de conocer su origen. Esto ha suscitado desde hace mucho tiempo una amplia variedad de estudios en el campo de la Antropología Física, que para conocer la evolución biológica de la especie humana, ha estudiado los diferentes tipos de restos que ha encontrado, incluyendo material óseo, tejido momificado y tejido congelado (Vargas,1989).

Las primeras investigaciones realizadas para comprender la evolución biológica de los seres vivos eran meramente descriptivas, tales como estudios morfométricos, posteriormente en las dos últimas décadas con los avances de la tecnología en bioquímica y biología molecular se han logrado estudios más detallados, como es la de obtener y caracterizar secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN), una molécula capaz de almacenar la información necesaria para el desarrollo y reproducción de los seres vivos. Esta información genética esta contenida en todos los organismos vivos. En organismos muertos, cualquier resto de ADN esta considerado como ADN antiguo (Salazar, 1995).

A través de la Biología Molecular es posible obtener información cuantitativa y objetiva acerca de la historia evolutiva de las especies, estudiando el ADN mitocondrial de organismos tanto antiguos como actuales, dicho ADN es heredado maternamente, no teniendo procesos de recombinación a diferencia del ADN nuclear (Cann y col. 1987) además de que ADN mitocondrial presenta mutaciones en un índice regular, dichas mutaciones son pasadas a la siguiente generación, esta diferencia (polimorfismo) hace de todos nosotros únicos y el análisis de estas diferencias nos puede ayudar a entender la evolución así como la migración de las especies.

De los primeros estudios reportados en la recuperación de secuencias de ADN antiguo se encuentra el de Higuchi y col. 1984 quienes recuperaron y secuenciaron, un fragmento de ADN de 229 pares de bases (pb) a través de sucesivas clonaciones de ADN mitocondrial (ADNmt) de un animal extinto de la especie *quagga* del género *Equus*, que se extinguió hace más de cien años. Situando a esta especie en otra línea filogenética distinta, perteneciente a un tipo de cebra, ya que por estudios morfométricos estaba situada en un parentesco con los caballos.

Uno de los primeros problemas de la Biología Molecular fue la clonación y amplificación de ADN antiguo. Básicamente debido a que el material genético en esas condiciones se encuentra dañado, lo cual genera una eficiencia de clonación baja. Por otro lado el tiempo requerido para obtener resultados positivos es hasta de meses, además de presentarse problemas de contaminación que generan dudas en los resultados. A pesar de estos problemas Pääbo en 1985 logró recuperar y secuenciar el ADN nuclear a partir de la piel de una momia egipcia de 2, 500 años de antigüedad a través de clonaciones repetidas.

Algunos de problemas presentados mediante la técnica de Clonación de ADN, fueron resueltos en parte con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki y col. 1985).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

La PCR es un procedimiento rápido de amplificación a través de la actividad enzimática de la polimerasa *in vitro* a partir de un segmento específico de ADN. La base teórica de la PCR es la de utilizar un ADN de doble cadena a ser amplificado y dos oligonucleotidos de cadena sencilla que delimitan la región a estudio.

Además, incluye un componente proteico con actividad enzimática (ADN polimerasa ó Taq polimerasa), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), un buffer con sales ($MgSO_4$, $Tris-SO_4$ y $(NH_4)_2SO_4$) para la reacción. Consiste por lo general de tres pasos que forman un ciclo: (Fig. 1).

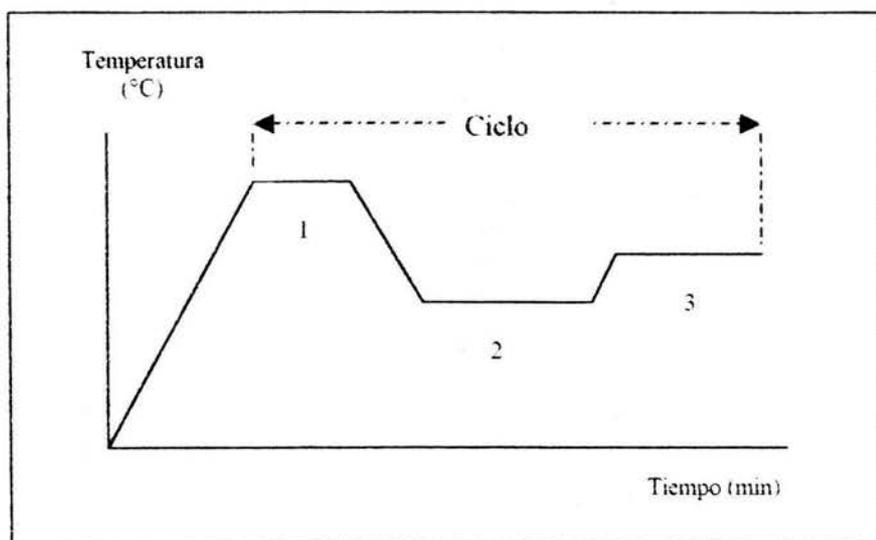


Fig. 1 Representación de un ciclo de PCR.

El primer paso denominado desnaturalización, donde se abren las cadenas de ADN blanco con temperaturas que van de $92^{\circ}C$ a $96^{\circ}C$, el segundo paso es alinear los oligonucleótidos que hibridan y delimitan específicamente la secuencia blanco, la temperatura de alineación depende de la composición de

los oligonucleótidos (TM) y puede ser desde 37°C hasta temperaturas de alrededor de los 60°C. Por último el tercer paso consiste en la extensión en el cual se sintetiza la cadena complementaria al molde original, con temperaturas alrededor de 72°C (Erlich y Arnheim, 1992). El número de ciclos varia también dependiendo del origen del ADN y la cantidad que se quiera obtener, va desde 20 hasta 50 ciclos.

Esta técnica de amplificación tiene tres características importantes:

- 1) Es rápida cuando se han optimizado las condiciones. En cuestión de horas se obtienen resultados y no en semanas o meses como en la técnica de clonación.
- 2) Es sensible, teóricamente una sola copia de ADN intacto es suficiente para la amplificación haciendo esto una herramienta ideal para el estudio del ADN antiguo (Pääbo y col. 1989) lo mismo que para la ciencia forense (Higuchi y col. 1988) entre otros estudios.
- 3) Este método es selectivo ya que los oligonucleótidos delimitan la región de estudio, haciéndolo específico.

Entre los estudios de ADN antiguo utilizando la PCR, se encuentran los de un cerebro humano de 7,000 años de antigüedad preservado en la turba de un pantano de Florida (Pääbo y col. 1988).

En otro estudio con muestras más antiguas, se logró la recuperación de ADN de cloroplastos de una hoja del género *Magnolia* de 17-20 millones de años de antigüedad, en el que se amplificó un fragmento de 820 pb (Golenberg y col. 1990).

El tejido óseo es más factible de preservarse a través del tiempo con respecto a los tejidos blandos, es por ello que los estudios de ADN antiguo en humanos se realizan generalmente en tejido óseo, entre los estudios registrados en los que por primera vez se recuperó ADN directamente de tejido óseo, fue el de un fémur de un individuo de 5,500 años de antigüedad, recuperando 5-10 μ g de ADN de 2 g de hueso en polvo (Hagelberg y Sykes en 1989).

ADN MITOCONDRIAL

Los estudios realizados con muestras antiguas y actuales que tienen fines filogenéticos se hacen generalmente con ADN mitocondrial (ADNmt), ya que presenta las siguientes características importantes con respecto al ADN nuclear, permitiendo la posibilidad de seguir el cambio genético a través del tiempo.

- Es heredado maternamente:

No tiene procesos de recombinación en índices de 1/1000, además de que en la formación del cigoto en células de mamífero, el óvulo contribuye con mucho más citoplasma que el espermatozoide (Bruce, 1994).

- Tiene un alto número de copias de 1,000 a 10,000 por célula con respecto al ADN nuclear lo que permite la posibilidad de encontrar al menos una copia intacta para el estudio del ADN antiguo.

- Tasa alta de mutación: El ADN mitocondrial presenta mutaciones acumuladas, con una mayor frecuencia respecto al ADN nuclear, las mutaciones generan un polimorfismo entre los individuos en un nivel genotípico, haciendo de los organismos únicos.

- Se conoce la secuencia completa del ADNmt en humanos (Anderson y col. 1981).

En 1991 Hagelberg y Clegg demostraron que la información obtenida del ADNmt de muestras arqueológicas es auténtica y no producto de una contaminación. En la extracción de ADN obtuvieron una banda de alto peso molecular mayor a 2,000 pb, la cual posiblemente estaba acompañada de contaminación microbiana aparte del ADN humano ya degradado, a pesar de

esto se logró amplificar el ADN, utilizando un control (blanco) en la reacción de PCR, el cual fue negativo, debido a que no encontraron contaminación en las muestras, secuenciaron el ADN comprobando que es de humano y no producto de una contaminación. Dicha secuencia tenía una deleción de 9 pb que se encuentra en la región intergénica entre el citocromo oxidasa II y el gen de RNA_t para la lisina que es muy común en ADN de huesos Polinesios. La contaminación de las muestras se puede checar monitoreando la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados. (Hagelberg y Clegg, 1991).

Con la PCR es posible además identificar a que sexo pertenecieron los individuos mediante muestras de restos de tejido óseo, anteriormente se necesitaban de muestras grandes para estudios morfométricos y para poder identificar el sexo, era casi imposible en esqueletos infantiles o adultos incompletos. Hoy con pequeñas muestras es posible amplificar regiones específicas de ADN para los cromosomas X o Y (Faerman y col. 1995).

En los 90s comenzaron los estudios a nivel poblacional con muestras actuales y antiguas, abarcando un mayor número de muestras para un análisis más completo.

Así Torroni y col. en 1992 demostraron que en poblaciones contemporáneas del nuevo mundo, existen cuatro linajes primarios: denominados haplotipos A, B, C y D. Un haplotipo es una región específica del ADNmt que puede o no ser reconocida por una enzima de restricción. Los haplotipos A, C y D se caracterizan por tener diferentes sitios de restricción enzimática y el B por contener una deleción de 9pb.

El haplotipo A se caracteriza por la presencia del sitio de restricción en el nucleótido 663 del ADNmt para la enzima Hae III. La ausencia del sitio para Hinc II en el nucleótido 13,259 y la presencia de Alu I en el nucleótido 13,262 define al haplotipo C; la ausencia de Alu I en el nucleótido 5,176 define al haplotipo D; finalmente el haplotipo B se caracteriza por una deleción de 9pb que se encuentra en la región intergénica entre el citocromo oxidasa II y el gen RNA_i para la lisina (Torroni y col. 1992).

En 1993 Stone y Stoneking encontraron los cuatro haplotipos primarios en restos antiguos de Oncota, de 50 muestras analizadas, 28 pertenecen al haplotipo C, cinco al B, doce al haplotipo A y el D se encontró en cuatro muestras.

Un estudio realizado en Tierra del Fuego-Patagonia reveló la ausencia de dos haplotipos primarios, es decir A y B, en contraste el haplotipo C se encontró

en frecuencia de 0.38 y 0.60 para el haplotipo D. La frecuencia del haplotipo A disminuye en la latitud sur de América y el haplotipo B es limitado al área central de América (Lalueza y col. 1997), lo cual apoya la teoría de sucesivas migraciones a América de Asia a través del Estrecho de Bering llevando consigo los haplotipos mitocondriales primarios (Stone y Stoneking, 1993).

En poblaciones Siberianas esta ausente el haplotipo B, estando presentes A, C y D. El haplotipo B se encuentra en poblaciones de Asia del este en poblaciones Polinesias en alta frecuencia de 0.41 a 1.0 (Stoneking y col. 1990). Lo que apoya la teoría de migraciones independientes (Torroni y col. 1993).

En el continente Americano la población de Chukchi, cercana al Estrecho de Bering y en poblaciones Siberianas se presentan solamente tres haplotipos: A, C y D. El haplotipo B esta ausente, lo que sugiere una subsecuente migración (Starikovskaya y col. 1998).

TEORÍAS MIGRATORIAS

La naturaleza y el tiempo de colonización del nuevo mundo por gente Asiática que cruzó el Estrecho de Bering es muy debatido.

Algunos investigadores interpretan la edad a través de restos esqueléticos del norte de América, indicando que las tribus amerindias descienden de un grupo de cazadores que cruzaron el estrecho de Bering, en una sola migración hace 12,000- 15,000 años (Bada y col. 1984; Taylor y col. 1985; Nelson y col. 1986).

Turner en 1983 a través de morfología dental, propuso tres olas de migraciones de Asia a América.

Greenberg y col. (1986) con base en datos lingüísticos, relacionaron estas tres olas migratorias con las tres principales familias lingüísticas en América. Acorde a esta hipótesis la primera migración a las Americas fue hace 15,000 a 30,000 años con los Paleo-Indios (Amerindios) que ocuparon por varios milenios todo el sur, Centroamérica y gran parte de Norte América (Griffin, 1979; Hopkins, 1979). Subsecuentemente otra migración dio origen a los indios Na-Dene hace alrededor de 10,000 a 15,000 años y los Aluet- Eskimo hace 6,000 a 9,000 años.

Aunque la separación temporal de movimientos es disputado (Szathmary, 1985; Laughlin, 1988), esta teoría de tres olas de migración propone que existe una correlación entre la antigüedad de los grupos pobladores y la dispersión geográfica de éstos, de este modo los grupos más antiguos son

los más alejados de el punto de entrada (Bering). Así los Amerindios son los grupos más antiguos presentando los cuatro haplotipos mitocondriales, los Na-Dene fue otro grupo migratorio que presenta generalmente solo el haplotipo A (Torroni,1993).

Otra teoría acerca de la colonización del nuevo mundo, es la teoría de Ward y col. 1991 quienes propusieron que la diversidad actual de los cuatro linajes primarios pudo haber ocurrido en Asia en poblaciones aisladas que se diferenciaron antes de cruzar por el Estrecho de Bering.

Szathmary en 1993 propuso que un grupo de poblaciones migró por el Estrecho de Bering y de ellas diversas subpoblaciones migraron hacia el sur quedando temporalmente aisladas por el hielo, produciendo posteriormente la diversidad genética encontrada actualmente.

En referencia a los estudios existentes en poblaciones Mexicanas se encuentra el primer intento de extracción y caracterización de ADN de material óseo de restos humanos mexicanos, de un ejemplar perteneciente al entierro núm.1 del Peñón del Márquez (En Iztapalapa DF.) con antigüedad de 650-750 años (Vargas, 1989), demostrando que es posible recuperar ADN de restos óseos antiguos.

Así mismo se ha hecho la hibridación del ADN de tejido óseo humano antiguo con el gen humano de la betaglobina (Vargas y Sánchez, 1990).

En lo que se refiere a pobladores contemporáneos se estudió la variación de la secuencia del ADNmt de 60 nativos Americanos (Mixtecos de la alta, Mixtecos de la baja, Zapotecos y Mixes) del sur de México mediante la amplificación del ADN por PCR, encontrando que en estas poblaciones solo están presentes los haplotipos A con un rango de frecuencia de 0.33 a 0.92, el haplotipo B con un rango de 0.07 a 0.33 y el haplotipo C con una frecuencia en el rango de 0.06 a 0.33 (Torróni, 1994), en este caso se tiene que considerar sin embargo que el número de muestras por población fue en promedio de 15 individuos.

En nativos del territorio mexicano se han encontrado los cuatro haplotipos primarios mitocondriales en diferente frecuencia dependiendo del lugar de estudio, por ejemplo al sur de México, la tribu Zapoteca se presentan los haplotipos A, B y C con la misma frecuencia promedio de 0.33 y el haplotipo D muy raramente se ha encontrado en estas poblaciones (Torróni y col. 1994). En la tribu Maya al suroeste de México el haplotipo predominante es el A con una frecuencia de 0.52, seguido del B con una frecuencia de 0.22, mientras que el C presenta una frecuencia de 0.15 y el

haplotipo D que es poco común tiene una frecuencia del 0.07 (Torrioni y col. 1992).

Al norte de México en la tribu Cochimi el haplotipo B tiene una frecuencia promedio de 0.46, el haplotipo C 0.46 y para el haplotipo A 0.08, mientras que el D también es poco frecuente (Lorenz y Smith, 1996).

Hoy en día hay un sin número de investigaciones realizadas para comprender la distribución de los haplotipos mitocondriales alrededor del mundo esto con el fin de esclarecer cómo se dieron las migraciones de Asia a América. Con el manejo de muestras actuales es relativamente fácil obtener el ADN para poder analizarlo y caracterizar los haplotipos mitocondriales, sin embargo en muestras antiguas no siempre sucede lo mismo, el tener éxito en amplificar ADN antiguo depende enormemente de las condiciones en las cuales se encontraban enterradas las muestras, por lo general se presentan problemas en las amplificaciones con ADN antiguo entre los cuales están:

-CONTAMINACIONES MICROBIANAS: Los restos óseos antiguos generalmente están acompañados por contaminantes como ADN de hongos o bacterias que se forman durante el proceso de descomposición del organismo (Hagelberg y Clegg, 1991).

Esto depende de las condiciones de entierro en las cuales estuvieron las muestras, existiendo la posibilidad de obtener resultados erróneos en el proceso de amplificación si las temperaturas de alineamiento son muy bajas. En principio los oligonucleótidos son específicos para ADNmt humano y se elimina la posibilidad de obtener un producto de amplificación no deseado incrementando la temperatura, hasta obtener un alineamiento específico.

-DEGRADACIÓN DEL ADN: Con el tiempo el ADN se va degradando, dependiendo también de las condiciones de entierro, pH, humedad del suelo, sufriendo la molécula procesos oxidativos, al parecer una de cada diez pirimidinas están oxidadas en el ADN antiguo (Pääbo y col. 1989).

Hagelberg y Clegg (1991) reportaron que debido a la degradación del ADN las moléculas recuperadas son por lo general de bajo peso molecular; 300 a 400pb. Además de que en condiciones de hidratación es más probable la degradación del ADN, favoreciéndose la formación de microorganismos. Debido a esto es preferible trabajar con ADNmt ya que este se encuentra en múltiples copias dando la posibilidad de encontrar alguna molécula intacta.

-INHIBIDORES: Otro condicionante en el medio externo, en el cual están

los restos óseos, parecen ser las sustancias inhibidoras de la PCR, la identidad de estas sustancias no es muy conocida aunque se sugiere que el color café de las preparaciones de ADN son los productos Maillard ó azúcares reducidos, otra posibilidad son los ácidos húmicos inhibidores de la PCR, los cuales son una mezcla de sustancias que son producidas por el proceso de descomposición y que pueden por consiguiente ser encontrados en las muestras de ADN de extractos de material antiguo (Pääbo y col. 1988). Estas sustancias inhibidoras generalmente no son removidas por métodos como extracción con solventes orgánicos, precipitación con etanol, digestión con RNasa A, DNasa I ó proteinasa K.

La presencia de sustancias inhibitorias parece estar correlacionado con la apariencia del extracto de material antiguo, presentando bajo iluminación normal un color amarillo/café, además de que migran rápidamente por medio de electroforesis en geles de agarosa, con la presencia de bromuro de etidio, fluorescen en color azul cuando se exponen a la luz UV, a diferencia de fragmentos de ADN de bajo peso molecular que fluorescen en color rosa/rojo (Goodyear, D. y col. 1994)

-ADN CONTEMPORÁNEO: Las contaminaciones con ADN contemporáneo pueden darse en la manipulación de las muestras en el

laboratorio ó en el momento de excavar para recuperar las muestras.

II.- ÁREA DE ESTUDIO

Monte Albán:

La ciudad de Monte Albán tuvo florecimiento entre los años 500 a. c. y 800 d. c. Se caracteriza por su arquitectura, sus piedras grabadas y sus urnas de cerámica gris. Sobresalió por la actividad comercial, la política y la innovación artística y se encontraba en la parte central y media de amplios valles del centro de Oaxaca, donde habitó la cultura Zapoteca, cuyos habitantes tuvieron entre sus características el hecho de que se pintaban la cara o el cuerpo, se recortaban los dientes con fines de belleza o prestigio, su alimentación se basaba en el consumo de maíz, frijol, calabaza y chile y completaban su dieta con la caza de animales de la zona. Además de servir como la principal ciudad de los zapotecas, Monte Albán fue también una necrópolis desarrollando una arquitectura funeraria. En su apogeo en el año 650 d. c. llegó a tener cerca de 25,000 habitantes, sin embargo en el año 900 d. c. Monte Albán fue abandonada.

Se ha sugerido que esto se debió a un excesivo crecimiento de la población,

además de una producción insuficiente de alimentos lo que provocó que la población no pudiera sostenerse. Otra teoría posible es una crisis entre el pueblo y sus gobernantes. Hoy en día es una de las zonas arqueológicas más importantes del país, en 1987 fue declarada Patrimonio Cultural de la Humanidad por la UNESCO. Uno de los trabajos efectuados para el conocimiento de los antiguos pobladores de Monte Albán fue realizado en 1991 a través de un proyecto de salvamento arqueológico en esta zona bajo la dirección de el Dr. Ernesto González y la Dra. Lourdes Márquez (González y col. 1991) en conjunto con la construcción de una nueva carretera con acceso a Monte Albán. Logrando recuperar restos óseos humanos encontrados en diferentes condiciones de enterramiento:



1) Entierros: donde el cadáver fue anteriormente sepultado en una simple fosa de muros bajos de piedra o adobe. IZT.

2) Tumbas: Son construcciones con dimensiones mayores en planta y altura. Distribuidos en varias áreas: El Pitayo, en la carretera, estacionamiento y estacionamiento este (Fig. 2).

Al iniciar los trabajos de salvamento por donde pasaría la nueva carretera, se excavaron dos unidades habitacionales de los antiguos pobladores Zapotecos en una zona conocida como El Pitayo.

Estas unidades se encontraban sobre dos terrazas niveladas artificialmente, identificándolas con letras A y B, en la unidad A se encontraron 5 entierros.

En la altura del Km. 5,137 se inició la excavación de tres unidades habitacionales en lo que se llamó área de La Carretera donde se encontraron seis tumbas (2 a 7) se cree que pertenecen a la clase media por los materiales arqueológicos recuperados, indicando que al parecer fueron artesanos.

Otro salvamento se realizó al sur de la carretera en una zona arqueológica denominada como área del Estacionamiento donde se excavaron cuatro unidades habitacionales: A, Á, B, C y una estructura D. Al este del Estacionamiento se encontraron otras dos unidades habitacionales. En el área del Estacionamiento bajo los pisos de las unidades habitacionales se descubrieron las siguientes tumbas: unidad A: tumbas 8 y 8-1, en la unidad Á: tumbas 10, 15 y 16, unidad B: tumba 9, unidad C: tumba 11, en la estructura D: tumba 12 y en el área este del Estacionamiento se encontraron las tumbas 13 y 14.

Al término de las excavaciones de este proyecto en 1991 se lograron recuperar 16 tumbas y 86 entierros.

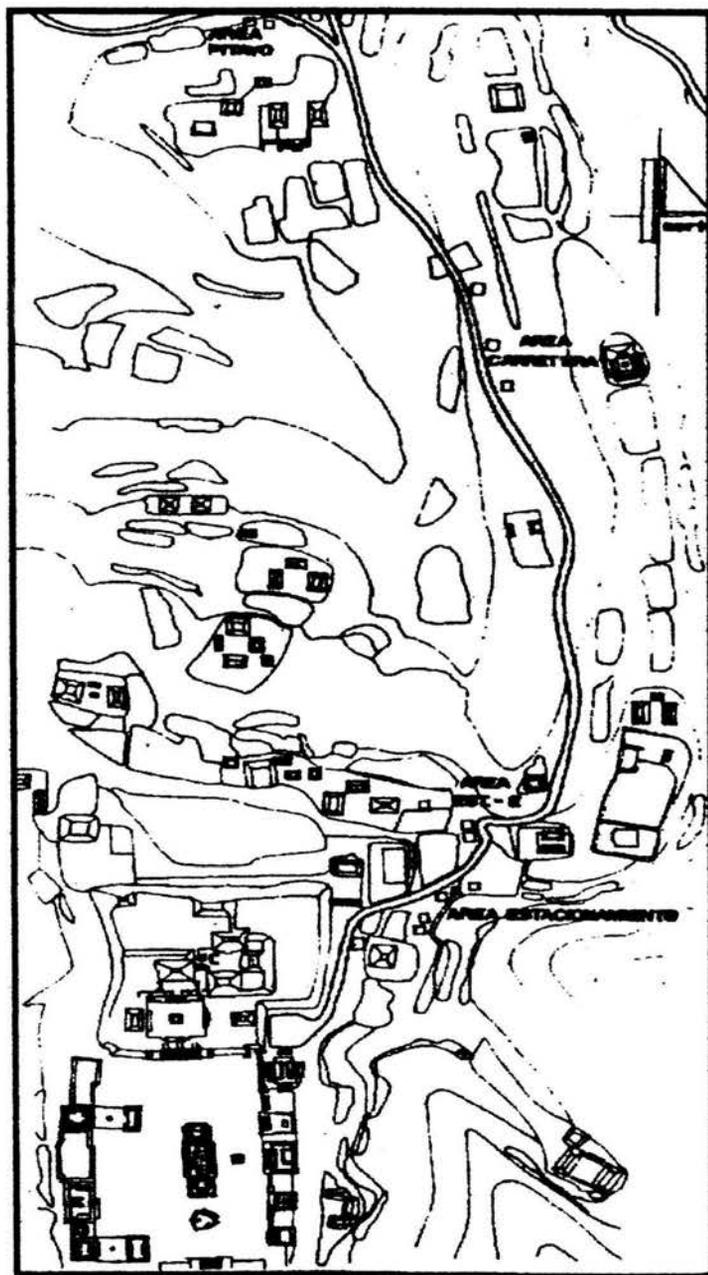


Fig. 2 Mapa de el centro arqueológico de Monte Albán, Oaxaca; donde habitó la Cultura Zapoteca, indicando los diferentes lugares (El Pitayo, Carretera, Estacionamiento y Estacionamiento Este) donde fueron recuperados los restos óseos durante el proyecto de salvamento arqueológico realizado en 1991 bajo la dirección de el Dr. Ernesto González y la Dra. Lourdes Márquez (González y col. 1991).

III.- OBJETIVO GENERAL

- Identificar los haplotipos a partir del ADN mitocondrial a los que pertenecen los restos óseos humanos prehispánicos en México para determinar nuestros orígenes.

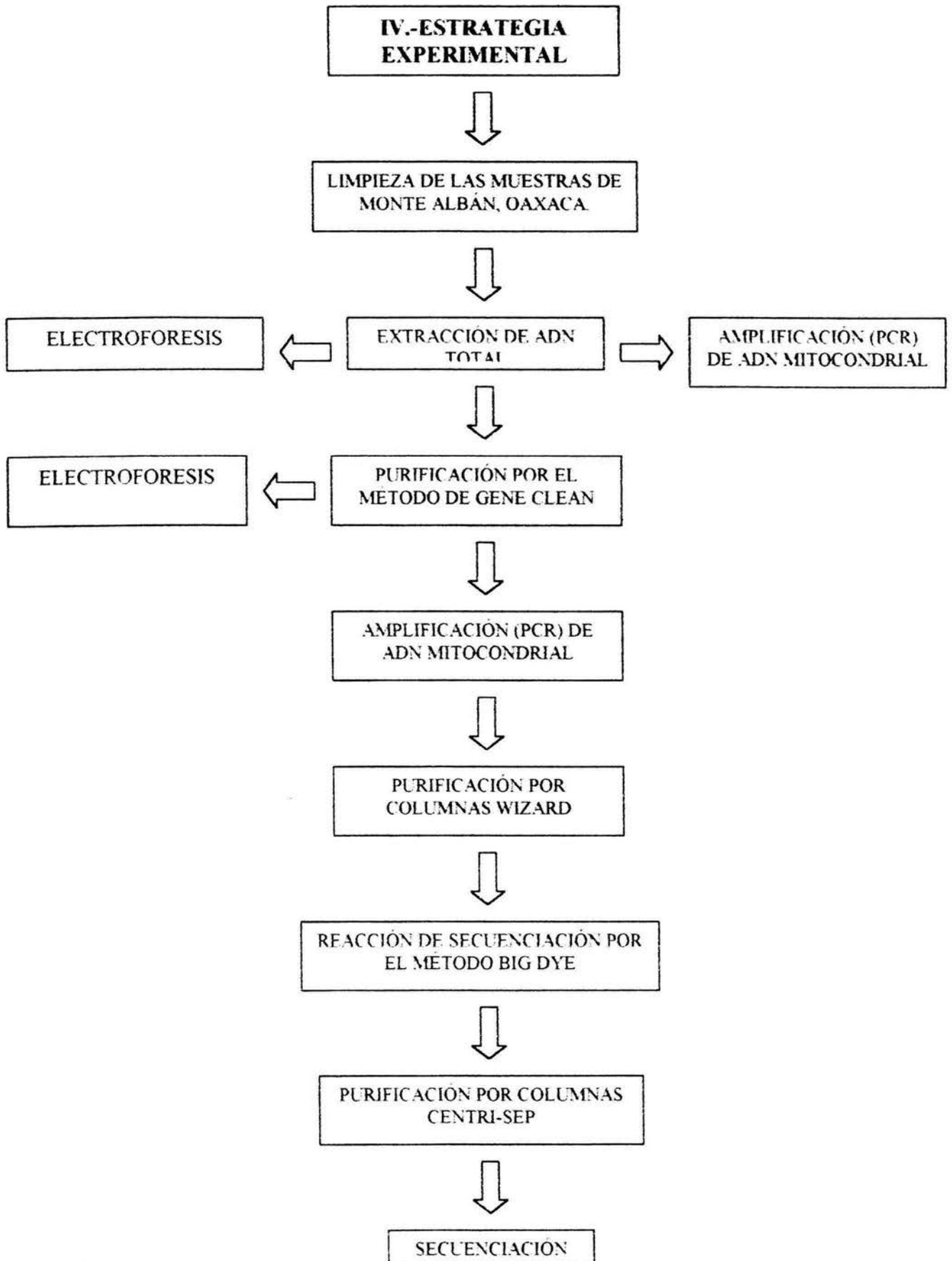
OBJETIVOS PARTICULARES

- Llevar a cabo la amplificación de los fragmentos que determinan la presencia de los haplotipos A, B, C y D.

- Determinar los haplotipos mitocondriales de algunas de las muestras de restos óseos humanos antiguos de Monte Albán Oaxaca, mediante la secuenciación de los fragmentos de PCR.

JUSTIFICACIÓN

Se desconoce el número de migraciones a América. El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de la colonización del Nuevo Mundo por migración(es) de gente Asiática, así como también contribuir en la relación de estudios genéticos y encuentros arqueológicos.



V.- MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras fueron recuperadas en 1991 durante el proyecto de salvamento arqueológico en Monte Albán, Oaxaca, dirigido por el Dr. Ernesto González y la Dra. Lourdes Márquez (González y col. 1991) . La mayor parte de las muestras recuperadas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Antropología e Historia al Laboratorio 1 de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN para su estudio. En el siguiente cuadro se presentan las muestras analizadas en el presente trabajo.

Cuadro 1. Muestras y su antigüedad aproximada en base a registros de cerámica encontrados en el lugar donde fueron recuperados los restos óseos en Monte Albán, Oaxaca.

NOMBRE	ANTIGÜEDAD
E3P	500-800 d. c.
E19	350-500 d. c.
E4	300-100 a. c.
TB1A	100 a.C.-250 d. c.
T21-2	350-500 d. c.
T3	500-100 a. c.
T11	500-300 a. c.
T4E	500-100 a. c.

E significa: entierro y T: Tumba

LIMPIEZA

Los restos óseos clasificados por estudios antropológicos como restos de una población de la Cultura Zapoteca, fueron manipulados con guantes nuevos estériles, para evitar contaminación con ADN contemporáneo, como pueden ser células de la piel o sudor. Cada muestra fue limpiada cerca de un mechero, removiendo la tierra que contiene el hueso, con una espátula estéril, además de remover de la superficie del hueso unos 2 mm, para descartar una posible contaminación con ADN contemporáneo del personal que manejó los huesos cuando estos fueron recuperados, estando limpias las muestras fueron molidas en morteros estériles hasta hacer polvo fino de cada uno de los huesos, los cuales fueron contenidos individualmente en tubos de 1.5 ml y guardados a -70°C , para su posterior manipulación.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción se realizó mediante una variante del método de Maniatis y col. 1989. Brevemente se pesaron de 0.9-1.0gr de polvo de hueso previamente limpiado conforme se menciona en el párrafo anterior.

El hueso en polvo se colocó en un tubo de plástico para centrifuga de 15 ml, agregando 8 ml de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM (BIO RAD), pH 8.0; EDTA 0.1 M, pH 8.0 (GIBCO BRL) y SDS al 0.5 % (BIO RAD)), que permite degradar materiales celulares, como membrana celular y nuclear, liberando el ADN.

El SDS es un detergente aniónico cuya función es solubilizar y desnaturalizar proteínas, el EDTA permite descalcificar las muestras óseas, mientras que el Tris-HCl es un amortiguador de pH. Se agregó además a cada tubo 5µl de Proteinasa K 10mg/ml (SIGMA) que con la presencia del SDS al 0.5 % digiere una gran variedad de proteínas incluyendo nucleasas. Se adicionaron además 200µl de Chelex al 20 % (BIO RAD) que protege el ADN de iones catiónicos.

Cada muestra en esta solución se incubó 1 h, a 37°C en agitación en una incubadora (Shaker modelo G25) a 200 rpm, así mismo 2 h, a 56°C, el siguiente paso fue calentar los tubos a 90°C por 10 min en un baño (AQUABATH LAB-LINE), para desnaturalizar las proteínas que no hayan sido eliminadas. Se enfriaron posteriormente a 60°C y se pasó toda la solución con la muestra a tubos corex de 30 ml, junto con 7 ml de fenol (Resarch Organics) agitándolos por 15 min a 250 rpm.

El fenol permitió separar el ADN de las proteínas celulares por centrifugación a 15,000 rpm durante 15 min, obteniendo el sobrenadante donde está contenido el ADN, transfiriéndolo a otro tubo corex junto con 7ml de una solución fenol-cloroformo-isoamilico en proporción (25:24:1) para remover proteínas ya que el cloroformo (J. T. Backer) desnatura proteínas y facilita la separación de la fase orgánica y acuosa y el alcohol isoamilico (J. T. Backer) reduce la espuma durante la extracción, posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min, pasando la fase orgánica (fase superior) a otro tubo, junto con 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto (J. T. Backer) (14 ml) y 700 µl de acetato de sodio (Sigma) 3 M, para precipitar y concentrar el ADN a -20°C durante 24 h.

El siguiente paso fue centrifugar a 15,000 rpm, 15 min, decantando el sobrenadante el cual se desecha mientras que la pastilla que contiene el ADN se resuspendió en 1 ml de agua estéril, y se almacenó en alicotas de 0.25 ml, a -70°C, dejando una alicuota a -20°C, para las purificaciones y amplificaciones posteriores.

El ADN se comparó con el marcador λ ADN/Hind III fragments (Bio Labs) para cuantificarlo a través de un digitalizador de imágenes UVP (Laboratory Products).

ELECTROFORESIS

La extracción de ADN se confirmó por medio de electroforesis en geles de agarosa, que es un extracto de alga marina, conformado por un polímero lineal que es fundido en la presencia de un buffer, este mismo buffer es utilizado para correr el gel en una cámara que contiene dos polos, uno negativo y otro positivo.

El ADN que es cargado negativamente por los grupos fosfato que tiene en cada uno de sus nucleótidos que lo conforman, a pH neutro y en un campo eléctrico migra hacia el ánodo ó polo positivo, a través de un gel de agarosa.

La migración es determinada por varios parámetros, así entre más grandes sean las moléculas de ADN migran mas despacio por la fricción que tienen al pasar por los poros de la agarosa, mientras que moléculas pequeñas migran más rápido, presentando menor fricción a través del gel. La migración del ADN es afectada también por la composición y fuerza iónica de un buffer, en ausencia de iones la conductancia es mínima y el ADN migra lentamente y en un buffer con alta fuerza iónica, la conductancia es mayor pero se genera calor, pudiéndose fundir el gel.

El buffer utilizado comúnmente en electroforesis en geles de agarosa es el TAE 1X (Tris-base, ácido acético, EDTA).

Para confirmar la extracción de ADN se utilizó un gel al 1.0 % de agarosa, el cual se preparó disolviendo 1gr de agarosa tipo1-A, Low-EEO, (Sigma) en 100 ml de buffer TAE 1X, junto con 3µl de bromuro de etidio, (Sigma) 10mg/ml, este colorante se intercala entre los nucleótidos complementarios del ADN, haciéndolo visible cuando se expone a luz UV emitiendo fluorescencia. La agarosa se fundió a 70°C por 2 min., posteriormente se agregó a un porta geles junto con un peine, para formar pozos y poder colocar las muestras, una vez formado el gel se colocó dentro de una cámara de electroforesis GIBCO BRL Model H 5 con 850 ml de buffer TAE 1 X. Cada una de las muestras (10µl) se mezcló junto con 1µl de buffer de carga, el cual contiene glicerol que le proporciona una mayor densidad a la muestra y le permite depositarse en el fondo de cada pozo. Este buffer esta formado de azul de bromofenol 0.2 %, xilen-cianol 0.2 % y glicerol 30 % en agua. Los colorantes ayudan a visualizar la migración de la muestra a través del gel, el azul de bromofenol migra más rápido aproximadamente dos veces más que el xilen-cianol que migra a la velocidad de un fragmento linear de ADN de doble cadena de unos 4 Kb.

Se aplicó corriente en la cámara con una fuente E-C Apparatus Corporation EC 500-90, a 100 Volts, 100mA y 10 watts durante 40 minutos.

Uno de los pozos se utilizó para correr (500ng) de un marcador comercial de alto peso molecular λ ADN/Hind III Fragments (Bio Labs), para identificar el peso molecular aproximado del ADN extraído de las muestras.

Visualizando a través de luz UV en un digitalizador de imagenes UVP Laboratory Products. El buffer TAE se preparó a una concentración de 50X de la siguiente manera para un litro:

- 242g de Tris-base
- 57.1ml de ácido acético glacial, (J. T. Backer)
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

De este concentrado se tomaron 20 ml y se llevaron a un litro con agua destilada para formar TAE 1 X. La extracción de ADN de una muestra humana contemporánea se realizó con leucocitos mediante la técnica descrita por John, S. y col. (1991), el procedimiento esta contenido en el apéndice.

Una vez checada la extracción de ADN se procedió a la purificación la cual se realizó por el método de GENE CLEAN para obtener un ADN lo más limpio posible para la reacción de amplificación.

PURIFICACIÓN DE ADN.

Se realizó a través del método GENE CLEAN de BIO 101, el cual permite purificar el ADN en geles de agarosa, uniendo el ADN a partículas de silica en la presencia de una de alta concentración de sales caotrópicas y es eluido en baja concentración de sales, puede eliminar: sales, residuos de solventes orgánicos, oligonucleótidos, nucleótidos, etc.

Se realizó una electroforesis con las mismas condiciones anteriormente mencionadas solo que utilizando 50µl en cada pozo para más muestra de ADN y realizar su purificación. Una vez identificadas las bandas de ADN fueron cortadas del gel, colocándolas en tubos de 1.5 ml con 500µl de yoduro de sodio NaI 6 M para disolver la agarosa a 56°C en un Multi-blok de Lab-Line. Además de que permite la unión del ADN a partículas de silica del Glassmilk teniendo el NaI una alta concentración.

Disuelto el gel se agregaron 5µl de Glassmilk para fijar el ADN dejándose las muestras en hielo 10 min., se centrifugó posteriormente a 15,000 rpm, 1 min. desechando el sobrenadante, resuspendiendo la pastilla con 200µl de New Wash (Es un concentrado de NaCl, Tris, EDTA y etanol, no se especifican concentraciones), centrifugando a 15,000 rpm 1 min. que elimina el exceso de yoduro, se vuelve a lavar la pastilla con 200µl de New Wash.

centrifugando 15,000 rpm 1min, desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 25µl de agua destilada estéril a 56°C, 10 min para eludir el ADN, centrifugando posteriormente a 15,000 rpm 1 min, obteniendo el ADN del sobrenadante. Después de checar la purificación por electroforesis con 10µl de muestra, en las mismas condiciones antes mencionadas, el ADN se guarda en alicotas de 5 µl a -70°C.

El siguiente método de purificación de ADN fue utilizado en el proyecto inicial en 32 muestras de Tabasco, donde a pesar de que se variaron las condiciones en la reacción de PCR semejantes a las del presente trabajo no se encontraron resultados positivos en las amplificaciones. Sin embargo se encontraron resultados interesantes, mostrados mas adelante.

La purificación de las muestras de ADN se hizo a través de un kit comercial QIA quick Gel Extracción. (QIAGEN). El cual consiste de columnas que tienen propiedades selectivas de unión a una membrana silica-gel, que a través de buffer específicos remueven contaminantes, recuperando y concentrando el ADN.

La absorción del ADN a través de la membrana de silica se da en la presencia de altas concentraciones de sales caotrópicas, mientras que los contaminantes pasan a través de la membrana.

La absorción por la membrana QIA quick además de ser dependiente de la concentración de sales, también lo es del pH, estas columnas son aptas para aislar el ADN de soluciones acuosas y de geles de agarosa.

ABSORCIÓN.- La purificación por medio de este kit, inicia con la utilización de un buffer denominado QG que contiene la correcta concentración de sales y pH para la absorción del ADN por la membrana QIA quick.

El indicador de pH en este buffer tiene un color amarillo en rango, menor ó igual a 7.5, si el pH es mayor a 7.5, la mezcla de el buffer con el extracto de ADN toma una tonalidad naranja o violeta. Se agregaron 100 µl del extracto de ADN junto con 300 µl de buffer QG, a la columna, la cual esta contenida en un tubo de 2 ml, para obtener todo lo que no retenga la membrana, centrifugando a 13,000 rpm durante 1 min., en una centrífuga BECKMAN, desechando el líquido y poniendo nuevamente la columna en el mismo tubo que puede ser rehusado.

LAVADO.- Durante el paso de la absorción de ADN, los oligonucleótidos no deseados, impurezas, semejante a sales, enzima, nucleótidos no incorporados, agarosa, bromuro de etidio y aceite no se unen a la membrana de silica.

Las sales son cuantitativamente lavadas por otro buffer, que contiene etanol, llamado PE, adicionando 0.75 ml de este buffer a la columna, dejando reposar 5 min., antes de centrifugar a 13, 000 rpm por 1 min; con una centrifugación adicional para eliminar residuos de etanol, pasando posteriormente la columna QIA quick a tubos de micro centrífuga de 1.5 ml, para eluir por último el ADN.

ELUSIÓN.- La elusión del ADN es también dependiente de la concentración de sales, contrario a la adsorción, la elusión es más eficiente en baja concentración de sales. Se agregaron 50 µl de agua desionizada al centro de la columna y centrifugando a 15, 000 rpm por 1 min., una vez eluido el ADN fue guardado a -20°C, para su uso posterior. La purificación realizada por columna fue confirmada por medio de electroforesis en las mismas condiciones anteriores, con 10 µl de muestra purificada.

AMPLIFICACIÓN

La amplificación de cada una de las muestras incluyendo un blanco que no contiene ADN para descartar posibles contaminaciones de los reactivos para la PCR y un ADN contemporáneo como control positivo se realizó con el

Kit Super Mix High Fidelity de Gibco BRL, el cual como su nombre lo indica tiene una alta fidelidad de amplificación, este Super Mix tiene las siguientes características:

- Una mezcla de Taq ADN polimerasa recombinante y ADN polimerasa de **Pyrococcus** especie GB-D, 22 U/ml.
- 66 mM Tris-SO₄, pH 9.1; 19.8 mM (NH₄)₂SO₄, 2.2 mM MgSO₄.
- 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP.
- Estabilizadores.

COMPONENTES DE LA REACCION

Para los haplotipos A, B, C y D.

-45 μl de PCR Super Mix High Fidelity

-42.5 pmol de cada uno de los dos oligonucleótidos.

-3 μl de ADN purificado, equivalente a 6 mg de hueso en polvo (18-24ng, aproximadamente de ADN) ya que en las purificaciones el ADN se eluyó en la mitad de volumen utilizado de extracto. La concentración aproximada de ADN obtenido en la extracción fue de 3-4 μg / gr. de hueso. Aunque se tiene que tomar en cuenta que esta evaluación no es muy exacta debido a los contaminantes que normalmente se encuentran en las muestras y

también es posible que este ADN tenga ADN de microorganismos. Para el ADN contemporáneo (Control positivo) se utilizaron 100 ng en cada reacción. En las muestras antiguas se utilizó una menor concentración de ADN para las amplificaciones para tratar de disminuir los inhibidores de la ADN polimerasa (Taq polimerasa). En las reacciones de PCR se mezcló en un solo tubo el reactivo de Super Mix y los oligonucleótidos para el haplotipo correspondiente y posteriormente se adicionaron las alícuotas correspondientes a cada tubo con ADN (18-24 ng).

OLIGONUCLEÓTIDOS

Estos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, fueron diseñados en base a reportes previos en los que ya se utilizaron y se logró obtener amplificaciones de cada uno de los diferentes haplotipos (Wrischnik y col. 1987, Lorenz y Smith, 1996 y Stone y Stoneking, 1993).

Los oligonucleótidos para amplificar la región que determina la presencia / ausencia de los haplotipos A y B, son los reportados por Wrischnik y col. 1987.

Los oligonucleótidos utilizados para la región que determina la presencia / ausencia del haplotipo C son los reportados por Lorenz y Smith, 1996; con la diferencia de que al primer C2 se le agregó un nucleótido más terminando en Guanina, esto debido a que al momento de sintetizarse los oligonucleótidos, solo se disponía en ese momento de columnas para purificar secuencias con extremos 3' en Guanina ó Citosina. De esta manera, de todos los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo ninguna secuencia tiene extremo 3' en Adenina ó Timina.

Por otro lado los oligonucleótidos utilizados para el haplotipo D son los reportados por Stone y Stoneking, 1993, para obtener los extremos 3' en Citosina por lo arriba mencionado, se acortó la secuencia reportada con dos nucleótidos menos para el primer D1 y un nucleótido menos para el primer D2.

El siguiente cuadro especifica las secuencias de cada uno de los diferentes oligonucleótidos y el tamaño del fragmento que se amplifica:

Cuadro 2. Secuencia de los oligonucleótidos para cada uno de los haplotipos, así como el tamaño del fragmento que amplifica y la enzima de restricción que identifica a cada haplotipo.

	SECUENCIA 5' → 3'	FRAGMENTO QUE AMPLIFICA	ENZIMA DE RESTRICCIÓN	SITIO DE CORTE
A 1	ACCTCCTCAAAGCAATACTG	176 pb	Hae III 663	GG-CC
A 2	GTCCTTGATGCTTGTTCTTTG			
B 1	ACAGTTTCATGCGCATCGTC	121 pb	DELECIÓN 9 pb	
B 2	ATGCTAAGTTGACTTTACAG			
C 1	GACGCAGTCTGCGCCC	206 pb	Hinc II 13, 259	GT-CA
C 2	ATATCTTGTTTCATTGTTAAG			
D 1	TAACTACTACCGCATTCC	149 pb	Alu I 5,176	AG-CT
D 2	AAAGCCGGTTAGCGGGGGC			

Las condiciones de PCR para amplificar cada fragmento de ADN para cada uno de los haplotipos (A, B y D) son las siguientes:

Una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, 40 ciclos consistiendo de una desnaturalización 94°C, 30 seg.; alineamiento de los primers a 60°C, 1 min; extensión a 72°C, 1min y una extensión final a 72°C, 5 min. Para el haplotipo C fueron: Desnaturalización inicial 94°C, 2 min; 40 ciclos : con

desnaturalización a 94°C, 30 seg.; alineamiento a 57°C, 1 min; una extensión 72°C, 1 min. y una extensión final a 72°C por 5 min.

Las temperaturas de alineamiento fueron tomadas con base en trabajos previos en el Laboratorio durante el proceso de optimización de los resultados.

Los productos de amplificación fueron checados en geles de agarosa al 3%, en las mismas condiciones de electroforesis antes mencionadas, utilizando 500 ng de marcador ϕ X 174 RF ADN HaeIII Digest,(Bio Labs), como referencia para identificar el tamaño de los productos esperados.

PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.

Se realizó para las muestras amplificadas de los diferentes haplotipos para llevar a cabo la reacción de secuenciación, con 5 μ l de muestra amplificada a través del Kit Wizard ADN Clean-up System que purifica fragmentos de ADN de 200 a 50,000 pb, eliminando dímeros de oligonucleótidos, enzima, nucleótidos y sales.

Se agregaron 5 μ l de muestra amplificada a tubos de 1.5 ml junto con 1 ml de resina de purificación (tiocinato de guanidina 6 M) que permite la unión del

ADN a la columna, se agita y se pasa a una columna Wizard ADN Clean-up y con un motor de vacío Vacuum Pump de BIO-RAD, una presión de 10 in Hg, jala la resina por la parte de debajo de la columna quedándose el ADN en la columna, posteriormente se agregaron 2 ml de isopropanol al 80 % para lavar la columna. Igualmente se atrae por medio de vacío, centrifugando también a 12,000 rpm 20 seg. Para eluir el ADN se utilizó agua desionizada estéril a 65°C, colocando 5µl en el centro de la columna y se dejó reposar 1 min, para centrifugar 12.000 rpm 20 seg., obteniéndose el ADN puro.

REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN

Se realizó mediante el ADN Sequencing Kit, método Big Dye de ABI PRISM, el cual contiene una enzima de secuenciación **AmpliTaq^R** ADN polimerasa denominada FS, que es una variante de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* que tiene una mutación puntual en el sitio activo, lo que le da la característica de tener menor discriminación con los dideoxynucleótidos, teniendo la ventaja de originar picos más altos e intensos en la secuenciación.

Esta enzima además tiene una segunda mutación en el dominio amino terminal que virtualmente elimina la actividad nucleasa 5' a 3' de la

AmpliAq ADN polimerasa. Este Kit contiene además nucleótidos marcados con diclororodamina originando diferente color para cada nucleótido en la secuenciación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Nucleótidos marcados y su color obtenido en la secuenciación.

NUCLEÓTIDO	TINTE	COLOR
A	Dicloro(R6G)	VERDE
C	Dicloro(TAMRA)	AZUL
G	Dicloro(R110)	NEGRO
T	Dicloro(ROX)	ROJO

También contiene deoxynucleósidos trifosfatados (dATP, dCTP, dITP, dTTP), MgCl₂, Tris-HCl buffer, pH 9.0, un ADN control 0.2µg/µl de doble cadena pGEM^R -3ZF (+), junto con su oligonucleótido -21M 13, 0.8pmol/µl.

MEZCLA DE REACTIVOS

Se utilizaron tubos de 0.2ml Micro Amp^R para la reacción, utilizando un termociclador Gene Amp PCR Systems 9700 de PE Applied Biosystems.

El volumen total de reacción de secuenciación es de 20 μ l, utilizando un solo oligonucleótido por reacción para obtener una sola cadena y poder secuenciar.

Se utilizó 0.2 μ g/ μ l del ADN de doble cadena pGEM^R -3ZF(+) control y 0.8pmol/ μ l del oligonucleótido control -21 M13. En este protocolo es recomendado utilizar 3.2 pmol de oligonucleótido para la reacción de secuenciación de las muestras, sin embargo se decidió trabajar con 15 pmol de oligonucleótidos para tener mayor posibilidad de hibridar con el ADN blanco debido a la calidad del mismo, se recomienda además que no haya un exceso de oligonucleótidos de tal forma que puedan originar ruido en la secuenciación.

Si en una reacción normal de PCR de 50 μ l, se utilizan generalmente 50 pmol de oligonucleótidos, ajustando a una reacción de secuenciación de 20 μ l, la concentración de oligonucleótidos sería de 20 pmol, a esta concentración de oligonucleótidos se le disminuyó un 25 %, quedando en 15 pmol, teniendo como base experimentos previos en los que se obtuvo dimerización de oligonucleótidos, en amplificaciones obtenidas por PCR. De tal forma que la concentración utilizada no fue la recomendada por ABI PRISM, ni tampoco la de una reacción normal de PCR.

Se utilizaron (1.5µl) 100 ng de ADN producto de amplificación, cuantificada a través de un digitalizador de imágenes UVP Laboratory Products, para la reacción de secuenciación.

El siguiente cuadro muestra con mas detalle los agentes y las cantidades utilizadas en la reacción de secuenciación.

Cuadro 4. Reactivos y cantidades utilizadas en la reacción de secuenciación.

AGENTE	MUESTRAS	CONTROL
MEZCLA DE REACCIÓN	8.0 µl	8.0 µl
ADN. PRODUCTO DE PCR.	1.5 µl	0.2 µl
OLIGONUCLEÓTIDOS	15.0 pmol	0.8 µl
AGUA DESIONIZADA	*	10.0 µl
VOLUMEN TOTAL	20.0 µl	20.0 µl

*La cantidad de agua varió dependiendo de la concentración a la cual se tiene inicialmente cada oligonucleótido.

Los oligonucleótidos son los mismos utilizados en la amplificación. La reacción de secuenciación consistió de 25 ciclos. ABI PRISM recomienda las siguientes condiciones para cada ciclo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tiempos recomendados y realizados para la reacción de secuenciación.

	RECOMENDADO	REALIZADO
DESNATURALIZACIÓN	96°C por 10 segundos	96°C por 20 segundos
ALINEAMIENTO	50°C por 5 segundos	50°C por 15 segundos
EXTENSION	60°C por 4 minutos	60°C por 4 minutos

Se trabajó modificando el tiempo de desnaturalización a 20 segundos, con la finalidad de que más moléculas de ADN rompan sus puentes de hidrógeno separando las dos cadenas . El tiempo de alineamiento se modificó también a 15 segundos, para que el oligonucleótido tuviese más tiempo de hibridar. Estas consideraciones fueron tomadas debido a la naturaleza del ADN con el que se trabajó.

PURIFICACIÓN

La purificación de la reacción de secuenciación se realizó mediante columnas de Centri-Sep de Princeton Separations (P/N CS-901) para cada

una de las muestras, estas columnas retienen restos de nucleótidos y oligonucleótidos que pueden interferir en la calidad de la secuencia, permitiendo el paso del ADN por la columna, mediante el siguiente procedimiento:

- Se removió la tapa superior de la columna, adicionando 0.8 ml de agua desionizada, mezclándola con el material contenido, para formar un gel, hidratándolo a 4°C por 30 min.

- Se eliminaron las burbujas de aire, invirtiendo o palmeando la columna, removiendo la tapa superior se drenó completamente por gravedad el agua sobrante que no formó parte del gel, se insertó la columna en un tubo de lavado para centrifugar a 1,300 g durante 4 min. para remover fluidos.

Posteriormente se removió la columna del tubo de lavado y se colocó en un tubo para micro centrifuga de 1.5 ml, cargando 20µl de la muestra de la reacción de secuenciación encima de cada gel para centrifugar nuevamente a 1,300 g por 4 min. para finalmente obtener la muestras purificadas.

Estas se secaron en un DyNA Vap de Labnet a 40°C durante 30 min., para poder llevar a cabo la secuenciación.

SECUENCIACIÓN

La secuenciación se realizó en la Unidad de Síntesis de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN con un secuenciador ABI PRISM modelo 310. (Perkin Elmer de México S. A.).

INHIBIDORES DE LA PCR.

Se determinó la presencia de los inhibidores de la PCR en los restos óseos antiguos, utilizando 6 tubos con ADN contemporáneo en las mismas condiciones antes mencionadas para su amplificación, adicionando además a los tubos ADN antiguo de muestras de Tabasco (que fueron las muestras con las que se comenzó el proyecto) para poder observar si es inhibida la reacción de amplificación: con muestras purificadas por el método de Gene Clean (tubos 1 y 2), purificadas por columnas de silica (tubos 3 y 4) y con ADN antiguo sin purificar (tubos 5 y 6). Utilizando también un control positivo sin ADN antiguo y un blanco sin ADN contemporáneo, ni antiguo.

RESULTADOS

Es interesante mencionar de manera breve que inicialmente se extrajo el ADN de muestras de restos óseos de Tabasco y se purificó por columnas de sílica y Gene Clean. Encontrando que al emplear los dos diferentes métodos no se logró obtener la amplificación de ninguna de las muestras. Debido a esto se decidió probar el efecto del ADN antiguo purificado y su efecto en la amplificación de el ADN contemporáneo.

En una reacción de PCR se utilizaron las condiciones anteriormente mencionadas para la amplificación de el ADN contemporáneo, además de incluir en cada tubo de reacción 1.5 μ l (aproximadamente 9-12 ng) de ADN antiguo. Obteniendo una inhibición de la amplificación al adicionar ADN antiguo purificado por el método de Gene Clean, carriles 1 y 2, de la misma manera el ADN antiguo purificado por columnas de sílica (carriles 3 y 4) y el ADN antiguo de el extracto original sin purificar (carriles 5 y 6) inhibieron la reacción de amplificación del ADN contemporáneo (Fig. 3).

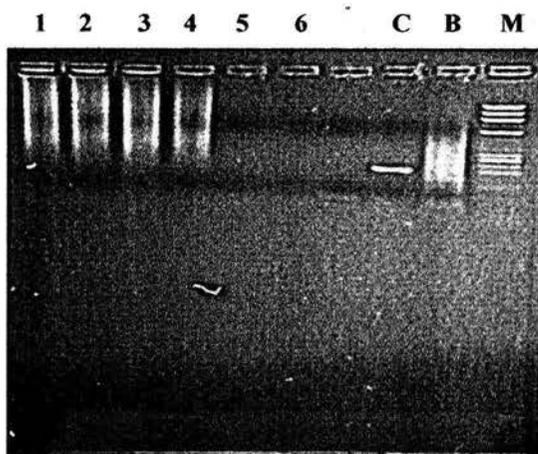


FIG. 3 Gel de inhibición de la amplificación de ADN contemporáneo, donde 1 y 2 se adicionó además muestra purificada por Gene Clean, 3 y 4 muestra purificada por columna, 5 y 6 con muestra de ADN sin purificar. C: Control positivo, contemporáneo, B: Blanco, control negativo y M: Marcador Phi X174 / Hae III.

En la extracción de ADN de muestras de restos óseos de Monte Albán se encontró un fragmento de ADN de alto peso molecular, además de la presencia de inhibidores de la PCR, los cuales cuando se tiñen con bromuro de etidio y se exponen a la luz UV fluorescen en color azul, a diferencia de el ADN que fluoresce en color rosa/rojo (Fig. 4). Estas sustancias inhibidoras generalmente no son removidas por métodos como son solventes orgánicos, digestión con Rnasa A, DNasa I ó proteinasa K (Goodyear y col. 1994).

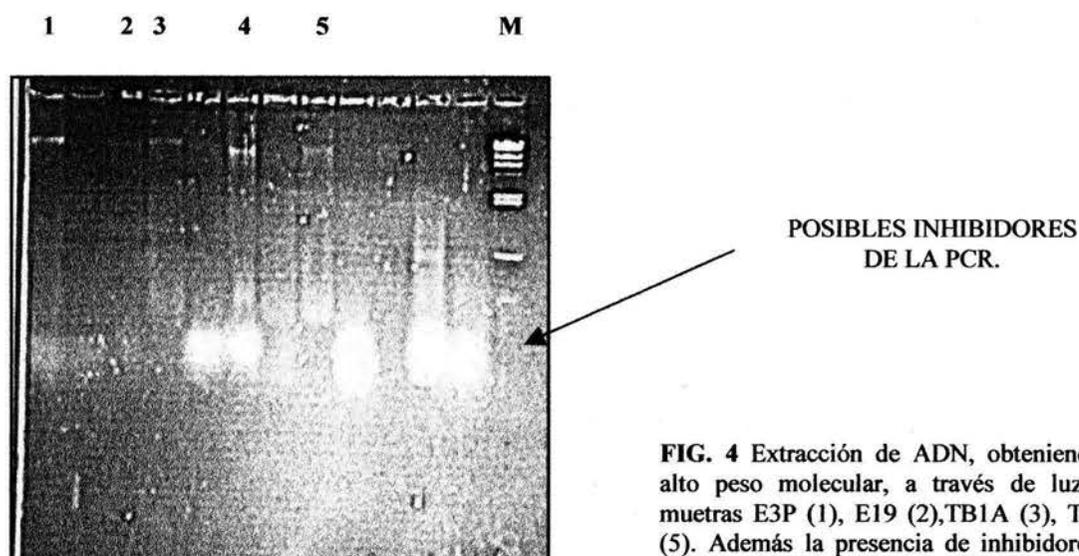


FIG. 4 Extracción de ADN, obteniendo una banda alto peso molecular, a través de luz UV, en las muestras E3P (1), E19 (2), TB1A (3), T11 (4) y T4E (5). Además la presencia de inhibidores en la parte inferior del gel. **M:** Marcador Lambda / Hind III.

Los resultados obtenidos con el método de extracción de ADN utilizado, se resumen en el cuadro 6, las muestras de Monte Albán en las que se observó una banda en el gel, se representan con un signo positivo (+), mientras que una ausencia de la banda de ADN en el gel, se representa con un signo negativo (-).

Cuadro 6. Extracción de ADN, obteniendo una banda a través de luz UV, con signo positivo (+). La ausencia de la banda de ADN es indicada con signo negativo (-).

MUESTRA	EXTRACCIÓN DE ADN.
E3P	+
E19	+
E4	-
TB1A	+
T21-2	-
T3	-
T11	+
T4E	+

Mediante los métodos de purificación por columna y Gene Clean, se observó en el gel una banda de ADN aparentemente limpia (Fig. 5 y 6) de los inhibidores encontrados en el gel de la extracción (Fig. 4).

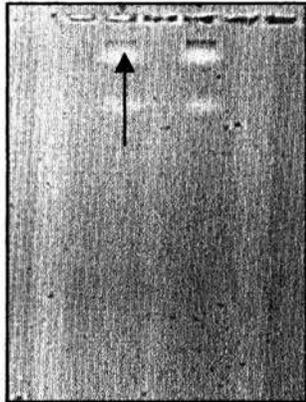


FIG. 5 Muestras de Monte Albán purificadas por Gene Clean

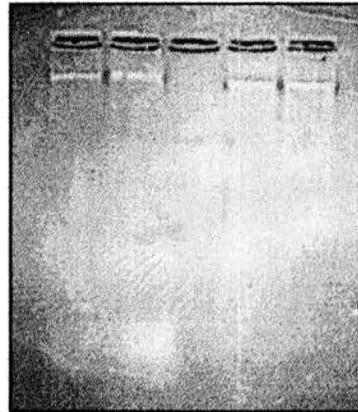


FIG. 6 Muestras de Tabasco purificadas por columna

Las muestras de ADN de restos óseos antiguos (E3P, TB1A, T11, T4E y E19) de Monte Albán, Oaxaca purificadas por el método de Gene Clean, amplificaron para la región que determina la presencia o ausencia del haplotipo A, obteniendo un producto de amplificación de 176, pb (Fig. 7).

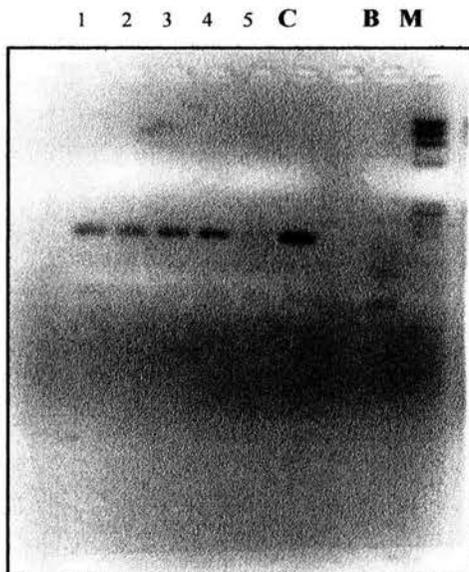


FIG. 7 Amplificaciones de ADN antiguo purificado por el método de Gene Clean: muestras E3P (1), TB1A (2), T11 (3), T4E (4) y E19 (5). C: Control positivo (contemporáneo). B: Control negativo (blanco), para la región que determina la presencia o ausencia del haplotipo A. M: Marcador Phi X174 / Hae III. El tamaño del fragmento es de 176 pb.

Se logró además amplificar un fragmento de ADN de 121 pb, de las muestras: E3P, TB1A, T11 y T4E y para la región que determina la presencia o ausencia del haplotipo **B** (Fig. 8), así como también se amplificó un fragmento de ADN de 206 pb, para la región que determina la presencia ó ausencia del haplotipo **C** (Fig. 9).

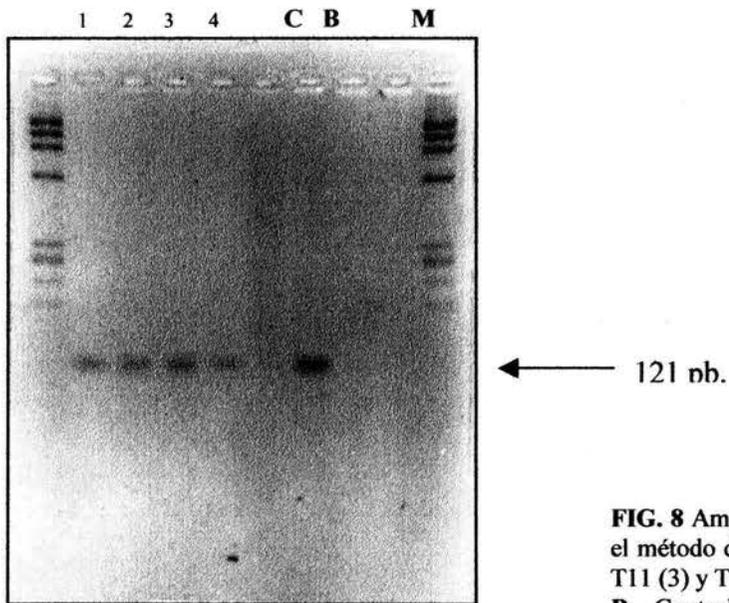
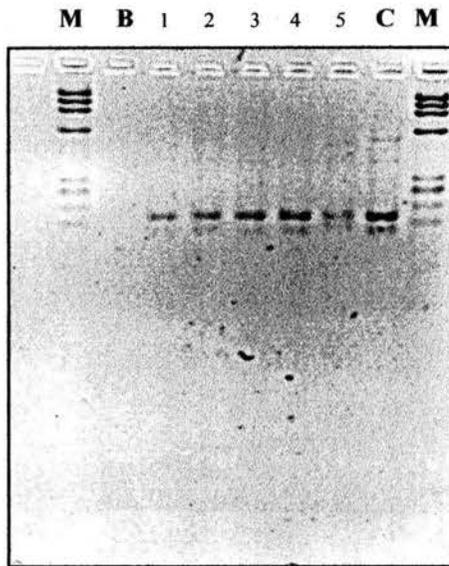


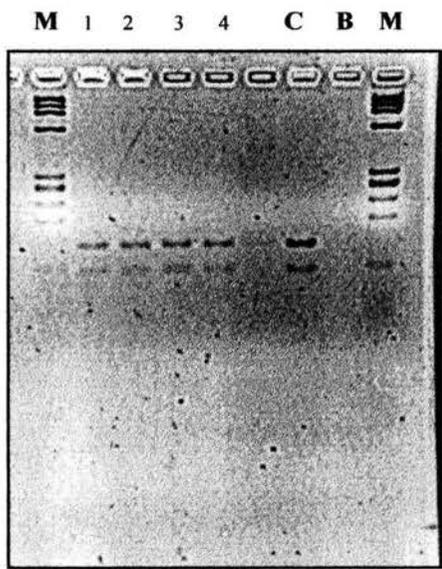
FIG. 8 Amplificaciones de ADN antiguo purificado por el método de Gene Clean: muestras E3P (1), TB1A (2), T11 (3) y T4E (4). **C:** Control positivo (contemporáneo). **B:** Control negativo (blanco), para la región que determina la presencia o ausencia del haplotipo **B**. **M:** Marcador Phi X174 / Hae III. El tamaño del fragmento es de 121 pb.



← 206 nb

FIG. 9 Amplificaciones de ADN antiguo purificado por el método de Gene Clean: muestras E3P (1), TB1A (2), T11 (3) , T4E (4) y E19 (5). C: Control positivo (contemporáneo). B: Control negativo (blanco), para la región que determina la presencia o ausencia del haplotipo C. M: Marcador Phi X174 / Hae III. El tamaño del fragmento es de 206 pb.

En la figura 10 se indica el producto de amplificación de 149 pb, de las muestras: E3P, TB1A, T11 y T4E, para la región que determina la presencia o ausencia del haplotipo D.



← 149 nb

FIG. 10 Amplificaciones de ADN antiguo purificado por el método de Gene Clean: muestras E3P (1), TB1A (2), T11 (3) y T4E (4). C: Control positivo (contemporáneo). B: Control negativo (blanco), para la región que determina la presencia o ausencia del haplotipo D. M: Marcador Phi X174 / Hae III. El tamaño del fragmento es de 149 pb.

En el siguiente cuadro están contenidos los resultados de las amplificaciones de ADN, purificado por el método de Gene Clean, de las muestras restos óseos antiguos de Monte Albán, Oaxaca.

Cuadro 7. Amplificaciones de ADN, con signo positivo (+). Con signo (-) ausencia de amplificación. Estos resultados fueron los mismos para los cuatro juegos de oligonucleótidos, con excepción de la muestra E19 (♦) la cuál solo amplificó para la región que determina la presencia ó ausencia del haplotipo A y el haplotipo C.

MUESTRA	AMPLIFICACIÓN DE ADN
E3P	+
E19	+ (♦)
E4	-
TB1A	+
T212	-
T3	-
T11	+
T4E	+

Las muestras purificadas por el método de Gene Clean en las cuales se logró amplificar el ADN se secuenciaron por el método de *Big Dye*. La figura 11 y 12 representan las secuencias sentido y antisentido obtenidas de la muestra T11, en la cuál se encontró el sitio de corte para enzima de restricción Hae III, caracterizando el haplotipo A.

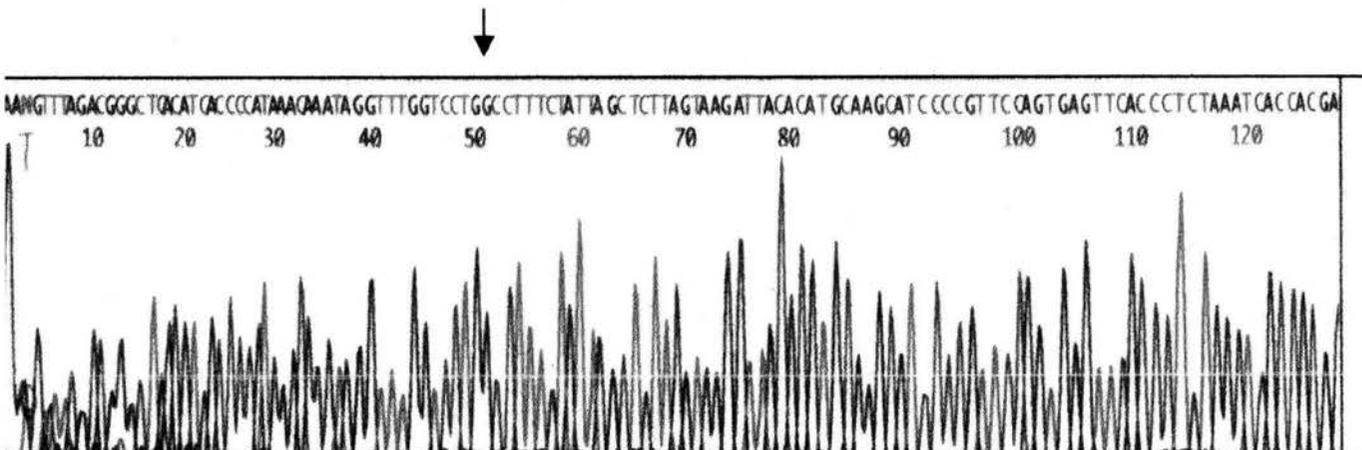


Fig. 11 Secuencia sentido de ADNmt en la cuál se encontró el haplotipo A en la muestra T11, es señalado el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC), caracterizando el haplotipo A en dicha muestra.

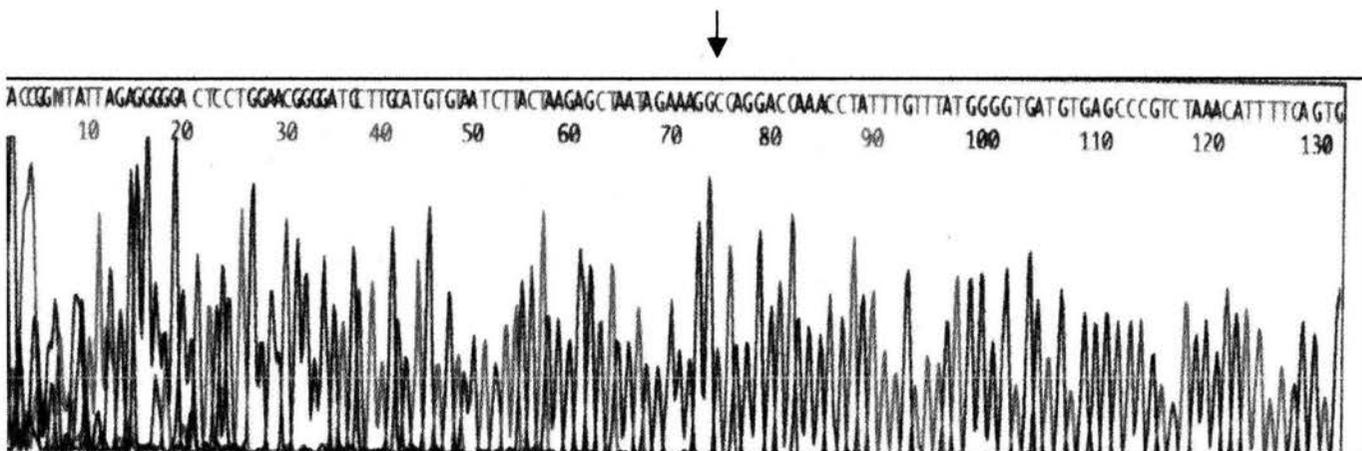


Fig. 12 Secuencia antisentido de ADNmt de la muestra T11, se indica el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC), caracterizando el haplotipo A.

Las figuras 13 y 14 representan la secuencia sentido y antisentido de ADNmt de la muestra TB1A, caracterizando el haplotipo A.

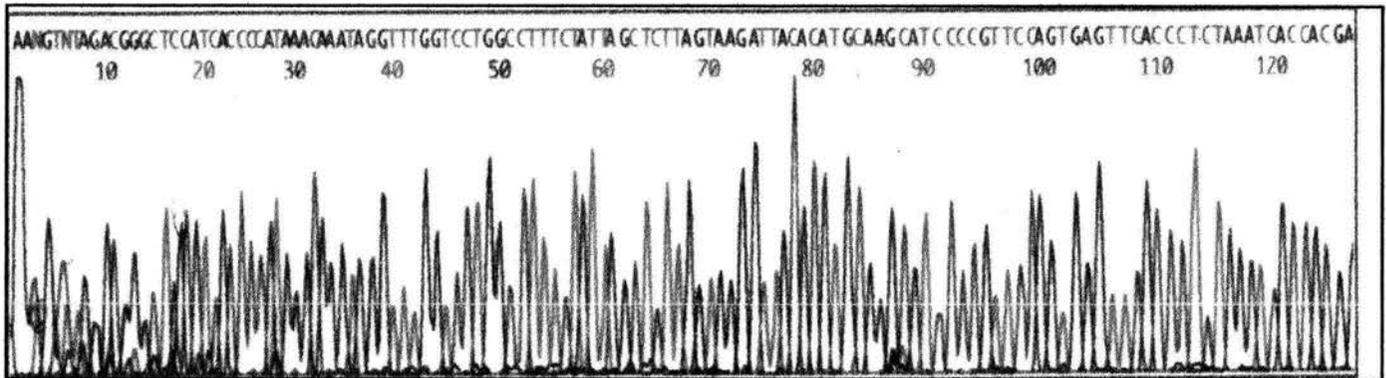


Fig. 13 Secuencia sentido de ADNmt de la muestra TB1A, indicando el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC) caracterizando el haplotipo A.

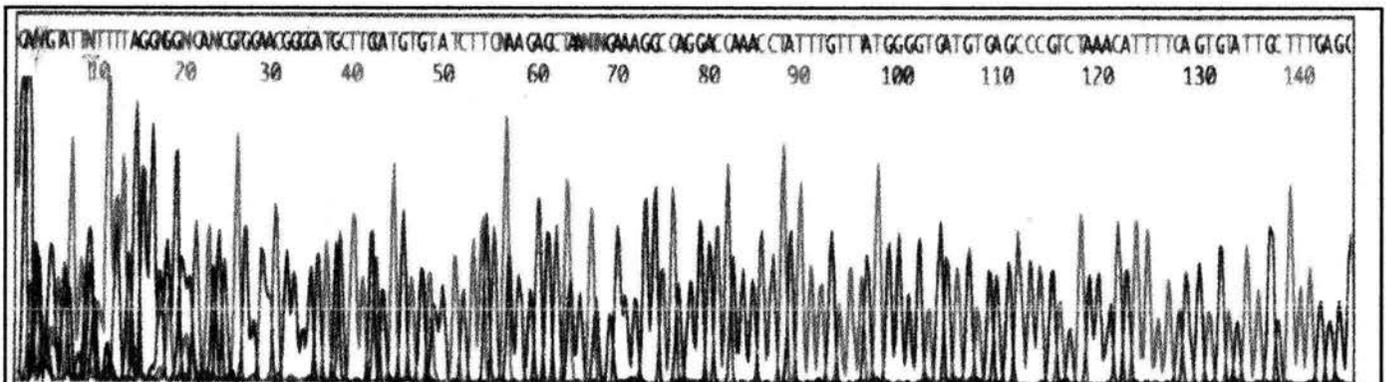


Fig. 14 Secuencia antisentido de ADNmt de la muestra TB1A, indicando el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC) caracterizando el haplotipo A.

Las figuras 15 y 16 representan la secuencia sentido y antisentido de ADNmt de la muestra T4E, caracterizando el haplotipo A.

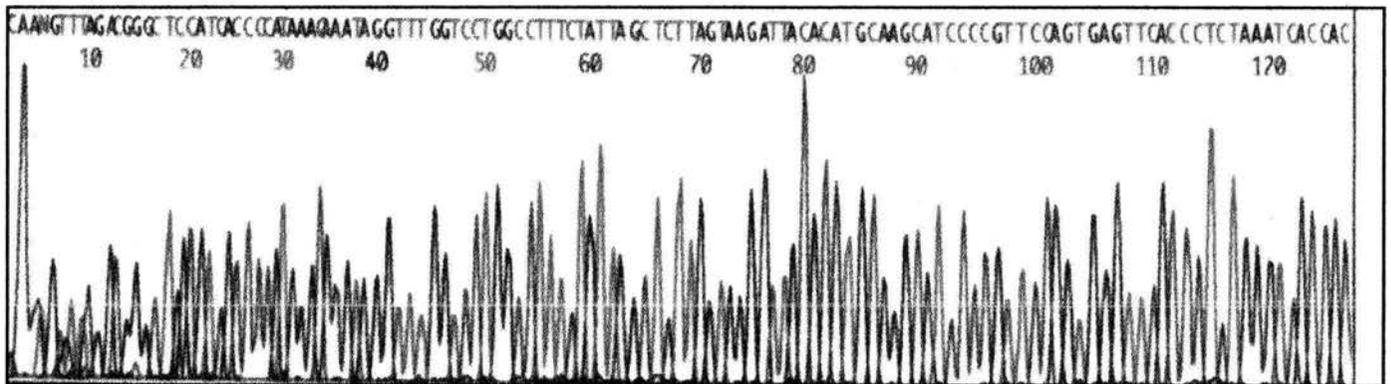


Fig. 15 Secuencia sentido de ADNmt de la muestra T4E, indicando el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC) caracterizando el haplotipo A.

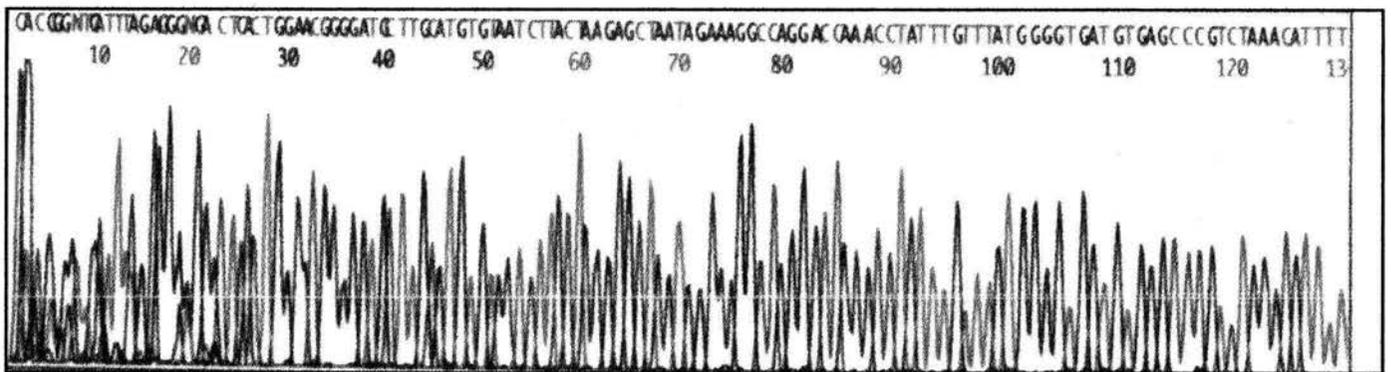


Fig. 16 Secuencia antisentido de ADNmt de la muestra T4E, indicando el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC) caracterizando el haplotipo A.

Las figuras 17 y 18 representan la secuencia sentido y antisentido de ADNmt de la muestra E3P, caracterizando el haplotipo A.

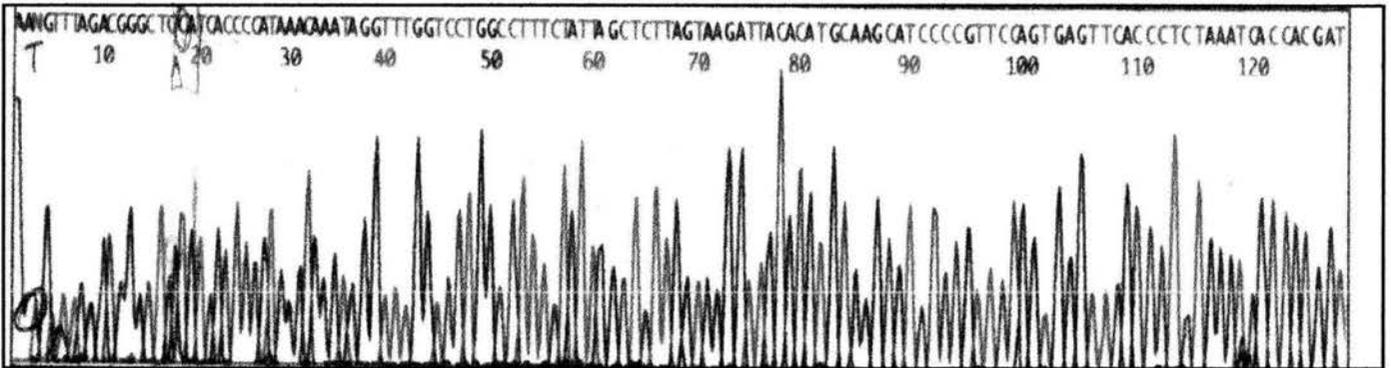


Fig. 17 Secuencia sentido de ADNmt de la muestra E3P, indicando el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC) caracterizando el haplotipo A.

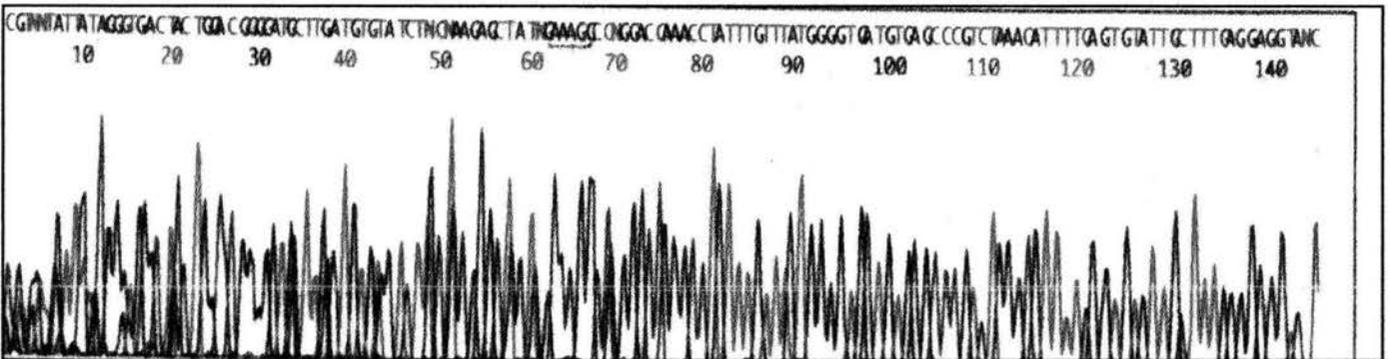


Fig. 18 Secuencia antisentido de ADNmt de la muestra E3P, indicando el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hae III (GG-CC) caracterizando el haplotipo A.

Fueron secuenciadas las regiones que identifican a los haplotipos B, C y D de las muestras amplificadas TB1A, T11, T4E y E3P (Ver apéndice) encontrando una ausencia de dichos haplotipos.

DISCUSIÓN

El estudio del ADN de restos óseos antiguos es de suma importancia para conocer el cambio genético a través del tiempo entre las poblaciones, así como también migraciones de las mismas. Este tipo de estudios se dificulta debido a que el ADN que se obtiene generalmente está degradado y dependiendo de las condiciones en las que se encontraban los restos es la calidad del ADN que se obtiene.

El método de extracción permitió obtener un fragmento de material genético, el cual fue tratado con ADNasa demostrando que es ADN (Noria, 1996). Éste ADN es de alto peso molecular, obtenido en 5 de un total de 8 muestras, logrando recuperar de 3-4 μg de ADN por gramo de hueso, tomando en consideración que esta evaluación pudo no ser muy exacta debido a los contaminantes que normalmente se encuentran en las muestras y a que también es posible que este ADN tenga ADN de microorganismos. En las muestras en las que no se observó una banda, no se descartó la posibilidad de encontrar ADN ya que pudo haber estado en baja concentración.

También se consideró la posibilidad de tener ADN de mas bajo peso molecular, el cual no pudo ser observado en el gel.

La presencia de los inhibidores de la PCR fue notoria por el color café obtenido en el extracto de ADN, además de fluorecer en color azul cuando se expone el gel a la luz UV, encontrándose éstos inhibidores debajo de las bandas de ADN de la extracción obtenida (Fig. 4). La identidad de estas sustancias inhibidoras no es muy conocida, aunque se sugiere que posiblemente son los ácidos húmicos (Pääbo y col. 1988).

El ADN que se extrajo de las muestras fue de humano ya que pudimos amplificar las diferentes regiones que contienen o no los diferentes haplotipos específicos para las poblaciones Amerindias. Aunque obviamente no se descartó la presencia de algún tipo de ADN contaminante de microorganismos, pudiendo obtener un producto de amplificación inespecífico.

IZT.

Durante la optimización de las condiciones favorables para la amplificación del ADNmt se encontró que ninguna de las muestras amplificó cuando se utilizó ADN del extracto original (**no purificado**), aun cuando se realizaron diluciones del extracto de ADN en $1/10$ y $1/100$ para disminuir la concentración de los inhibidores de la PCR, reamplificaciones (segunda reacción de amplificación a partir de una alícuota del producto de la primera reacción de amplificación), variación en la temperatura de alineamiento, lo que indica que los inhibidores de la PCR están en muy alta concentración. Para comprobar estos resultados, en otra extracción de ADN realizada con las mismas muestras se volvieron a obtener los mismos resultados, ninguna de las muestras amplificó.



Se encontró un resultado interesante en las muestras de Tabasco, después de la purificación del ADN de los restos óseos por el método de columnas de sílica (Fig. 6) las muestras de ADN no amplificaron, aún cuando se empleó el método de purificación Gene Clean no se logró la amplificación de estas muestras. Debido a esto se decidió emplear muestras de Monte Albán purificadas por Gene Clean.



El hecho de que el ADN purificado de las muestras de restos óseos de Tabasco inhiben la reacción de PCR de un ADN contemporáneo (Fig. 3) indica que en el ADN purificado no se removieron por completo los inhibidores, debido a esto no se trabajó más con las muestras de Tabasco.

En la purificación del ADN por el método de GENE CLEAN en las muestras de Monte Albán en las que se obtuvo una banda en la extracción, se confirmó la purificación volviendo a checar el ADN en otra electroforesis, encontrando la banda limpia de el color azul fluorescente producido por los inhibidores (Fig. 5).

Sin embargo en estas muestras purificadas se logró obtener sólo la amplificación de las muestras E3P, TB1A, T11 y T4E, hay que tomar en cuenta que cada muestra puede comportarse de manera distinta dependiendo de las condiciones de entierro en las cuales se encontraba ofreciendo diferentes resultados aún purificando por el mismo método.

Las muestras T3 y T21-2 en las cuales no se encontró una banda en el gel de la extracción (Fig. 4) se realizó el mismo procedimiento de purificación, es decir se cortó el gel a la misma distancia a la cual se encontraban las bandas de ADN de las demás muestras.

Sin embargo en ninguna de estas dos muestras se logró la amplificación del ADN, aun cuando se variaron las condiciones de PCR en estas muestras, bajando la temperatura de alineamiento hasta 50°C, aumentando la concentración de ADN, realizando diluciones $1/10$ y $1/100$, para lo cual hay dos posibles explicaciones: 1) En estas muestras no se alcanzó a remover por completo los inhibidores de la PCR mediante este método de purificación, 2) Que el ADN obtenido en la extracción no fuera de humano.

Por lo tanto se logró en 4 de 8 muestras la amplificación para cada una de las diferentes regiones de los diferentes haplotipos (Figs. 7, 8, 9 y 10) es decir amplificó un 50.0 % de las muestras en comparación con el extracto de ADN (no purificado), donde la amplificación fue de 0 %.

Las 4 muestras que amplificaron fueron las mismas en las que se obtuvo una banda en la electroforesis de la extracción (E3P, TB1A, T11 y T4E), amplificaron para cada una de las regiones que determinaron mediante la secuenciación a que haplotipo pertenecen.

Es importante hacer notar que con la muestras E19, donde a pesar de que se encontró una banda visible en la extracción no se logró su amplificación para los haplotipos B y D.

Por otro lado las modificaciones realizadas en la reacción de secuenciación (Con10s más de desnaturalización y de alineamiento de los oligonucleótidos) fueron positivas ya que se logró obtener la secuencia de las muestras amplificadas identificando a que haplotipo pertenecen cada una de estas.

Hasta el momento se han estudiado los haplotipos de poblaciones contemporáneas y se ha encontrado una distribución muy heterogénea en América. Torroni y col.1992 identificaron los haplotipos mitocondriales mediante enzimas de restricción, en el presente trabajo se logró determinar el haplotipo por medio de la secuenciación, comprobando mediante la secuencia que efectivamente se trabajó con ADNmt humano y no con otro ADN producto de una contaminación microbiana.

La contaminación con ADN contemporáneo durante la manipulación de las muestras en el laboratorio fue descartada por los blancos obtenidos en la PCR. En el presente trabajo se encontró que las secuencias de las muestras E3P, TB1A, T11 y T4E pertenecen al haplotipo A presentando el sitio de corte GG-CC en la posición 663 del ADNmt que es reconocido por la enzima de restricción Hae III (Fig. 11 a 18). Esto indica que el 100 % de las muestras amplificadas presentan el haplotipo A.

Las secuencias fueron comparadas con la secuencia de ADNmt humano reportada por Anderson y col. 1981, presentando mas de un 99 % de analogía, la mínima diferencia entre estas es debido a que la secuencia reportada por Anderson no presenta el sitio de corte para Hae III.

Se descartó la presencia de cualquier otro haplotipo en las mismas muestras, mediante las secuencias, demostrando que no presentan los haplotipos B, C y D, (Ver Apéndice).

Se recomienda en posteriores trabajos utilizar distintos métodos de purificación de el ADN para obtener el más adecuado a la calidad de las muestras estudiadas y así tratar de evitar el efecto de los inhibidores de la PCR. Por otra parte resultó interesante el haber obtenido y caracterizado los haplotipos mitocondriales mediante la secuenciación del ADN de las muestras de este trabajo, por esto mismo sugerimos realizar en el futuro trabajos que nos permitan realizar un análisis mas completo sobre la frecuencia de los haplotipos mitocondriales en los antiguos pobladores de Monte Albán y otros pobladores prehispánicos para poder comparar con poblaciones de Amerindios contemporáneos y así contribuir al conocimiento sobre los primeros pobladores en América y sus migraciones.

CONCLUSIONES

- Con la purificación de el ADN por el método de Gene Clean se logró obtener mejores resultados con respecto a el ADN sin purificar, logrando amplificar 50 % de las 8 muestras.
- Las secuencias obtenidas de los restos óseos antiguos de Monte Albán son de ADNmt humano y no producto de contaminación.
- Se cumplió con el objetivo, logrando determinar el haplotipo mitocondrial de cuatro de las muestras de Monte Albán, Oaxaca encontrando sólo la presencia de el haplotipo A.
- Será necesario el estudio de un mayor número de muestras para poder determinar la frecuencia de los haplotipos mitocondriales de los antiguos pobladores de Monte Albán Oaxaca y otras poblaciones prehispánicas y así poder comparar con poblaciones amerindias contemporáneas y de esta manera contribuir al estudio de la colonización de el Nuevo Mundo por migración(es) de gente Asiática.

APÉNDICE

EXTRACCIÓN DE ADN CONTEMPORÁNEO: a partir de leucocitos humanos.

MATERIALES:

- Vacutainer con EDTA como anticoagulante.
- Solución 1 (10 mM Tris-HCL pH 7.6, 10 mM KCL, 10 mM MgCL₂)
- Nonidet P40
- Solución 2 (10 mM Tris-HCL pH 7.6, 10 mM KCL, 10 mM MgCL₂, 0.5 M NaCL, 0.5 % SDS y 2 mM EDTA.
- Fenol saturado con 1M Tris-HCL pH 8
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Etanol puro
- Agua bidestilada-desionizada.

Se colectan 5 ml de sangre fresca en el vacutainer y se llevan a 10 ml con la solución 1; adicionando 120 µl de Nodinet P40 para lisar las células, invirtiendo varias veces, posteriormente se centrifugo por 10 min. a 2000 rpm, desechando el sobrenadante, si se desea la pastilla puede ser congelada, se resuspendió la pastilla suavemente en 800 µl de la solución 2 que rompe el núcleo transfiriendo a tubos de 1.5 ml de microcentrífuga, agregando 400µl de fenol a cada tubo y se mezcló por inversión, centrifugando por un

min. a 12,000 rpm transfiriendo la fase acuosa a un tubo limpio de microcentrífuga, adicionando 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo: isoamílico 24:1 se mezcló por inversión, centrifugando por 1 min. a 12,000 rpm, transfiriendo la fase acuosa a otro tubo limpio de microcentrífuga, adicionando 700 µl de cloroformo:isoamílico, centrifugando por 1 min. a 12,000 rpm, transfiriendo la fase acuosa a otro tubo, adicionando dos volúmenes de etanol absoluto mezclando por inversión para precipitar el ADN, posteriormente se colectan las hebras de ADN con la punta de una micropipeta y se depositaron en otro tubo junto con 1 ml. de etanol al 70 %, mezclando por inversión y secando el ADN en un speed-vac, resuspendiendo el ADN en agua desionizada estéril a 65° C, se almacenó a -20°C.

En las siguientes secuencias se comprobó la ausencia de otro haplotipo (B, C, y D), en las muestras TB1A, T11, E3P y T4E donde fue caracterizado el haplotipo A.

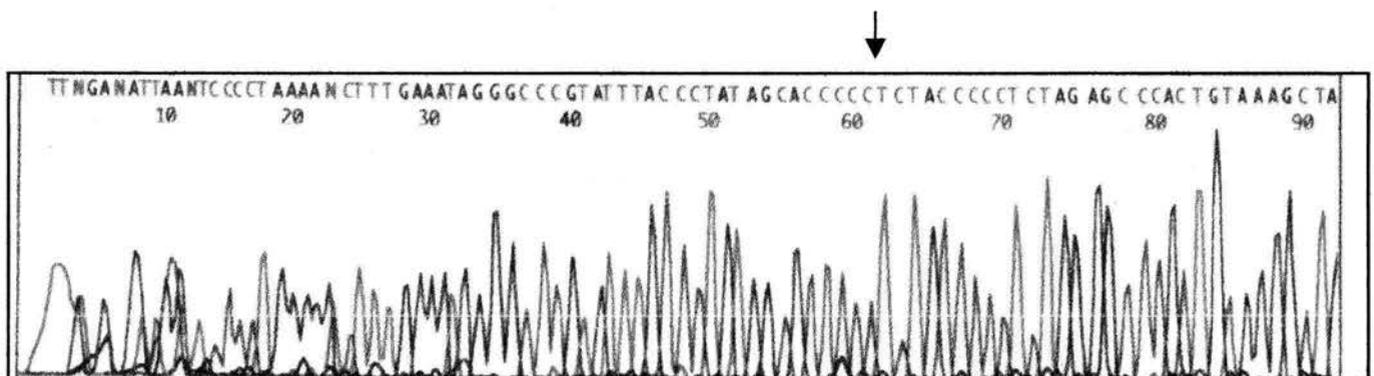


FIG. A1 Secuencia sentido en la cual no se encontró el haplotipo B en la muestra T11. Los nucleótidos señalados en la figura (CCCCCTCTA) están ausentes cuando hay deleción, característica que determina el haplotipo B.

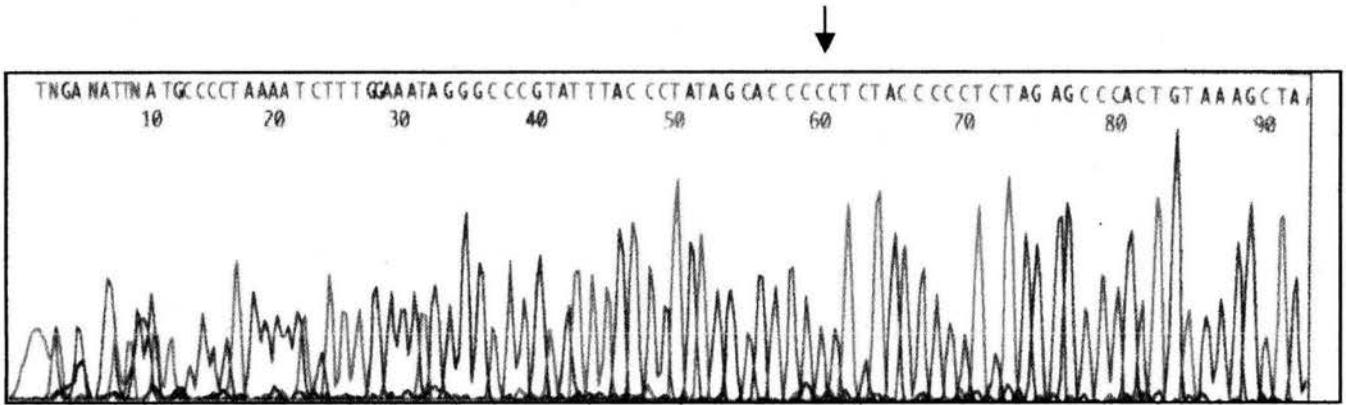


FIG. A2 Secuencia sentido en la cual no se encontró el haplotipo B en la muestra T4E. Los nucleótidos señalados en la figura (CCCCCTCTA) están ausentes cuando hay delección, característica que determina el haplotipo B.

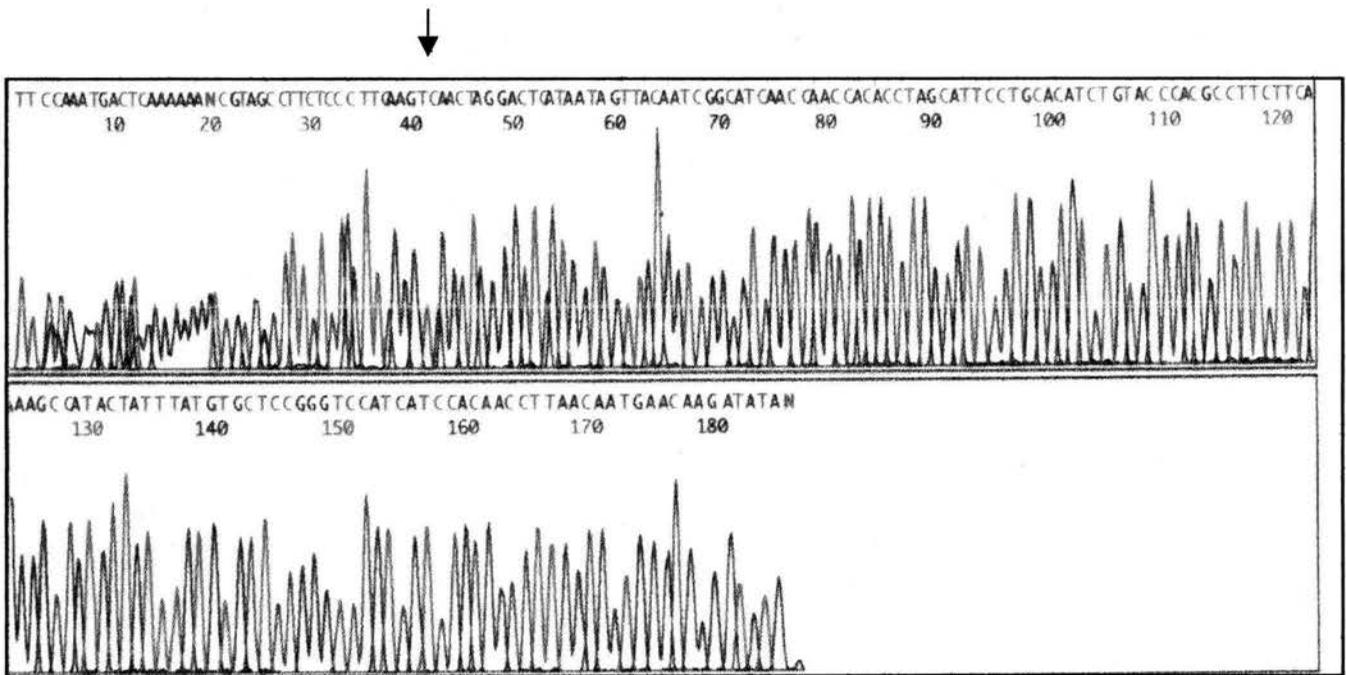


FIG. A3 Secuencia sentido en la cual no se encontró el haplotipo C en la muestra E3P, es señalado el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hinc II (GT-CA). Sin embargo la característica del haplotipo C es la ausencia de este sitio de corte.

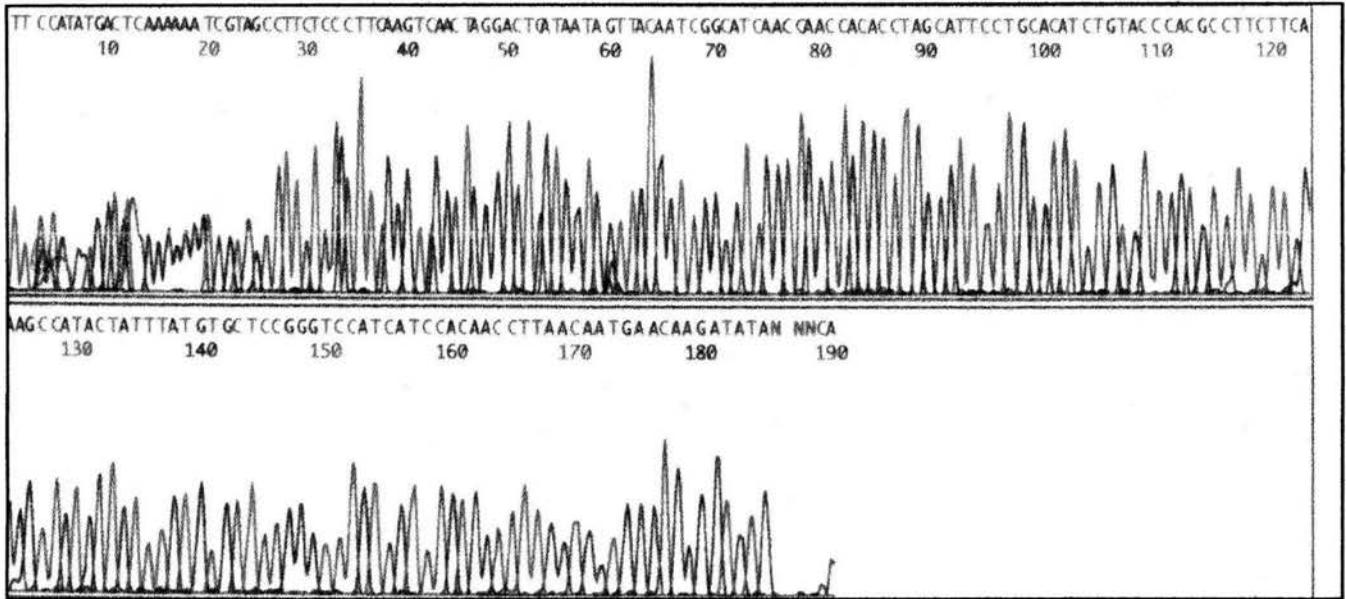


FIG. A4 Secuencia sentido en la cual no se encontró el haplotipo C en la muestra TB1A, es señalado el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Hinc II (GT-CA). Sin embargo la característica del haplotipo C es la ausencia de este sitio de corte.

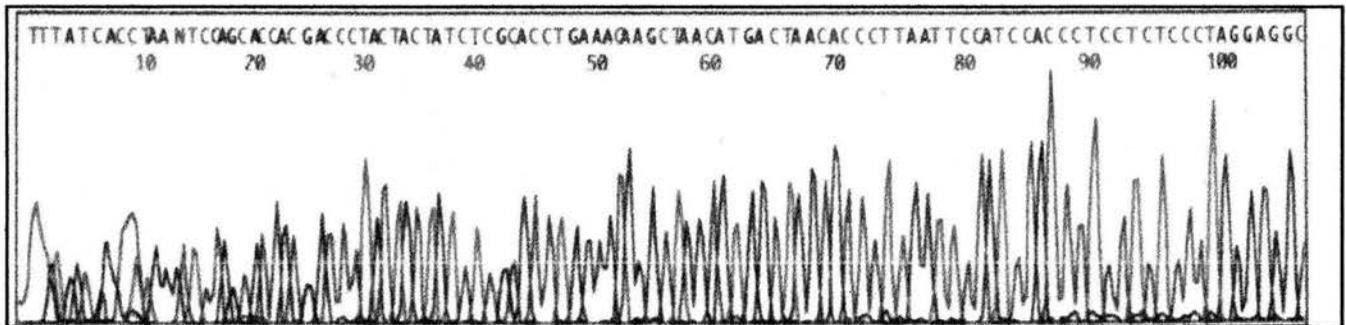


FIG. A5 Secuencia sentido en la cual no se encontró el haplotipo D en la muestra T11, es señalado el sitio de corte reconocido por la enzima de restricción Alu I (AG-CT). Sin embargo la característica del haplotipo D es la ausencia de este sitio de corte.

BIBLIOGRAFÍA

*Anderson, S. , Bankier, A. T. , Barrell, G. B. , de Bruijn, L. H. M. , Coulson, R. A. , Drouin, J. , Eperon, C. I. , Nierlich, D. P. , Roe, A. B. , Sanger, F. , Schreier, P. H. , Smith, H. J. A. , Staden, R. and Young, G. I. 1981. Sequence organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290, 457-465.

*Ausubel, M. F. , Brent, R. , Kingston, E. R. Moore, D. D. , Seidman, G. J. , Smith, A. J. and Struhl, K. 1991. The Polymerase Chain Reaction. *Current Protocols in Molecular biology*. 2, 51.03-15.2.10.

*Bada, J. L. , Gillespie, R. , Gowlett, J. A. J. and Hedges, R. E. M. 1984. Accelerator mass spectrometry radiocarbon ages of amino acid extracts from California Paleoindian Skeletons. *Nature*. 312, 442-444.

*Baillet, G. , Rothammer, F. , Carnese, R. , Bravi, M. and Bianchi, N. 1994. Founder Mitochondrial Haplotypes in Amerindian Populations. *Am. J. Hum. Genet.* 54, 27-33.

*Boom, R. , Sol, C. J. A. , Salimans, M. M. M. , Jansen, C. L. , Wertheim-van Dillen, P. M. E. and van der Noordaa, J. 1990. Rapid and Simple Method For Purification of Nucleic Acids. 1990. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503.

*Bruce. A, Bray, D. , Lewis, J. , Raff, M. , Roberts, K. and Watson, D. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc. 3a. Edicion, 705-707.

*Cann, L., Stoneking, M. and Wilson, C. 1987. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Nature*. 325, 31-35.

*Erlich, H. and Arnheim, N. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 131-156.

*Faerman, M. , Filon, D. , Kahila, G. , Greenblatt, L. , Smith, P. and Oppenheim A. 1995. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Science*. 467, 327-332.

*Greenberg, J. H. , Turner, C. G. II and Zegura, S. L.1986. The Settlement of the Americas: a coparasion of the linguistia, dental and genetic evidence. *Curr. Anthropol*. 27, 477-497.

*Green, D. L. , Derr, N. J. and Knight. 2000. mtDNA Affinities of the Peoples of North-Central Mexico. *Am. J. Hum. Genet*. 66, 989-998.

*Golenberg, M. E. , Giannasi, D. E. , Clegg, T. M. , Smiley, J. C. , Durbin, M. , Henderson, D. and Zurawski, G. 1990. Chroplast DNA sequence from a Miocene Magnolia species. 1990. *Nature*, Lon. 344, 656-658.

*Griffin, J. B. 1979. The Origin and dispersion of American Indians on North America. In: Laughlin W S. Harper A B (eds) *The First Americans: origins, affinities and adaptations*. Gustav Fischer, New York. 43-55

*González, E. , Márquez, L. y Martínez, C.1991. Salvamento arqueológico en Monte Alban, Oaxaca. *Temporada 1991*. INAH. 128-134.

*González, E. , Márquez, L. y Matadamas, R. 1991. Exploraciones arqueológicas en Monte Alban, Oaxaca, durante la temporada 1990-1991. INAH. 118-123.

*Goodyear, D. P. , Mac Laughlin-Black, S. and Mason, J. I. 1994. A Reliable Method for the Removal of Co-Purifying PCR Inhibitors from ancient DNA. *Biotechniques*. 16, 232-235.

*Hagelberg, E. and Sykes, B. 1989. Ancient bone DNA amplified. *Nature*, Lon. 342, 485.

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

*Hagelberg, E. and Clegg, J. B. 1993. Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proc. R. Soc. Lond.* 252, 163-170.

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

*Higuchi, R. , von Beroldingen, C. H. , Sensabaugh, G. F. and Erich, H. A. 1988. DNA typing from single hairs. *Nature, Lon.* 332, 543-546.

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

*Höös, M. and Pääbo, S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research.* 21, 3913-3914.

*Höös, M. , Jaruga, P. , Zastawny, H. T. , Dizdaroglu, M. and Pääbo, S. 1996. ADN damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. 1996. *Nucleic Acids Res.* 24, 1304-1307.

*Hopkins, D. M. 1979. Canscape and climate of Beringia during late Pleistocene and Holocene time. In: Laughlin W S, Harper A B (eds) *The First Americans: origins, affinities, and adaptations*, Gustav Fisher, New York, pp. 15-41.

*John, W. , Weitzner, G. , Rozen, R. and Scriver, C. 1991. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Research.* 19, 408

*Lalueza, C. , Perez, P. A. , Prats, E. , Cornudella, L. And Turbon, D. 1997. Lack of founding American mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia. *Hum. Mol. Genet.* 6, 41-46.

*Laughlin, W. S. 1988. From Ammassalik to Attu: 10,000 years of divergent evolution. *Objets et Mondes.* 25, 141-148.

- *Lindahl, T. 1997. Fact and Artifacts of Ancient DNA. *Cell*. 90, 1-3.
- *Lorenz, G. J. and Smith, G. D. 1996. Distribution of four founding mtDNA Haplogroups Among Native North Americans. *Am. J. Phys. Anthropol.* 101, 307-323.
- *Maniatis, T. , Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2, 9.14-9.23.
- *Nelson, D. E. , Morlan, R. E. , Vogel, J. S. , Southon, J. R. and Harrington, C. R. 1986. New dates on northern Yukon artifacts: Holocene not Upper Pleistocene. *Science*. 232, 749-751.
- *Noria, Ch. O. 1996. Análisis molecular de DNA antiguo de restos oseos humanos de Cholula, Puebla fase Cholteca III (1325 a 1500). Tesis de Licenciatura. UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS HIDALGO.
- *Pääbo, S. 1985. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*. 314, 644-645.
- *Pääbo, S. , Gifford, J. A. and Wilson, A. C. 1988. Mitochondrial DNA sequences from a 7,000-year-old brain. *Nucl. Acids. Res.* 16, 9775-9787.
- *Pääbo, S. and Wilson, A. 1988a. Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts. *Nature*. 334, 387-388.
- *Pääbo, S. , Higuchi, R. G. and Wilson A. C. 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 264, 9709-9712.
- *Parr, L. R. , Carlyle, W. S. and O'rouke, H. D. 1996. Ancient DNA Analysis of Fremont Amerindians of the Great Salt Lake Wetlands. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99, 507-518.
- *Romero, M. R. 1983. *Anales de Antropología*. UNAM. XX, 89-113.

*Saiki, R. K. , Scharf, S. , Faloona, F. , Mullis, K. B. , Horn, G. T. , Erlich, H. H. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnoses of sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350-1354.

*Salazar, C. M. 1995. Estudios moleculares en poblaciones mexicanas prehispánicas y actuales. Tesis de Licenciatura. UNAM.

*Sean, P. , Metzger, D. And Higuchi, R. 1991. Chelex^R 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. 10,506-513.

*Shields, F. G. , Hecker, K. , Voevoda, I. M. and Reed, K. J. 1992. Absence of the Asian-specific Region V Mitochondrial Marker in Native Beringians. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 758-765.

*Schurr, G. T. , Ballinger, W. S. , Gan, Y. , Hodge, A. J. , Merriwether, A. D. , Lawrence, N. D. , Knowler, C. W. , Weiss, M. K. and Wallace, C. D. 1990. American Mitochondrial DNAs Have Rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting They Derived from four Primary Maternal Lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 46, 613-623.

*Starikovskaya, B. Y. , Sukernik, I. R. , Schurr, G. T. , Kogelnik, M. A. and Wallace C. D. 1998. mtDNA Diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implications for the Genetic History of Ancient Beringia and the Peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1473-1491.

*Stone, C. A. and Stoneking, M. 1993. Ancient DNA from a Pre-Columbian Amerindian Population. *Am. J. Phys. Anthropol.* 86, 497-506.

*Stoneking, M., Jorde, L., Bathia, K. and Wilson, A. 1990. Geographic variation in human mitochondrial DNA from Papua New Guinea. *Genetics*. 124:717-733.

*Szathmary, E. J. E. 1985. Peopling of North America: clues from genetic studies. In: Kirk R L. Szathmary E. J. E. (eds) *Out of Asia: peopling the Americas and the Pacific*. Journal of Pacific History, Canberra, pp 79-104.

*Szathmary, E. J. E. 1993. mtDNA and the Peopling of the Americas. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 793-799.

*Taylor, R. E. , Payen, L. A. , Prior, C. A. , Sluta, P. J. Jr, Gillespie, R. , Gowlett, J. A. J. , Hedges, R. E. M. 1985. Major revisions in the Pleistocene Age assignments for North American human skeletons by C-14 accelerator mass spectrometry: none older than 11,000 C-14 years B. P. *Am. Antiquity.* 50,136-140.

*Torrioni, A. , Schurr, G. T. , Yang, C. , Szathmary, E. J. , Williams, C. R.. , Schanfield, S. M. , Troup, A. G. , Knowler, C. W. , Lawrence, V. D. , Weiss, M. K. and Wallace, C. D. 1992. Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates That the Amerindian and the Nadene Populations Were Founded by Two Independent Migrations. *Genetics.* 130, 153-162.

*Torrioni, A. , Schurr, G. T. , Cabell, F. M. , Brown, D. M. , Neel, V. J. , Larsen, M. , Smith, G. D. , Vullo, M. C. and Wallace, C. D. 1993. Asian Affinities and Continental Radiation of the Four Founding Native American mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 563-590.

*Torrioni, A. , Sukernik, I. R. , Schurr, G. T. , Starikovskaya, B. Y. , Cabell, F. M. , Crawford, H. M. , Comuzzie G. A. and Wallace, C. D. 1993. mtDNA variation of Aboriginal Siberians Reveals Distinct Genetic Affinities with Native Americans. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 591-608.

*Torrioni, A. , Chen, Y. , Semino, O. , Santachiara-Beneceretti, S. , Scott, R. , Lott, T. , Winter, M. and Wallace, C. D. 1994. mtDNA and Y-Chromosome Polymorphisms in Four Native American Populations From Southern México. *Am. J. Hum. Genet.* 54, 303-318.

*Turner, C. G. II. 1983. Dental evidence for the peopling of the Americas. In: Shurtler R Jr (ed). *Early man in the New World.* Sage, Berverly Hills, C A, pp 147-157.

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

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

*Ward, R., Frazier, B., Dew-Jager, K. and Pääbo, S. 1991. Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 8720-8724.

*Wrischnik, L. A. , Higuchi, R. G. , Stoneking, M. , Erlich, H. A. , Arnheim, N. and Wilson, A. C. 1987. Length mutations in human mitochondrial DNA: Direct sequencing of enzymatically amplified DNA. Nucleic Acids Res. 15, 529-542.

*Yang, Y. D. , ENG, B. , Wayne, S. J. , Dudar, C. J. and Saunders, R. S. 1998. Improved DNA Extraction from Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. Am. J. Phys. Anthropol. 105, 539-543.