



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



“MIDNA EN LA EVOLUCION; HAPLOGRUPOS NATIVO - AMERICANOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

IXCHEL MORENO TORRES

ASESOR DE TESIS:
DR. JOSE FRANCISCO MONTIEL SOSA



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" mtDNA en la evolución; haplogrupos nativo-americanos"

que presenta la pasante: Ixchel Moreno Torres
con número de cuenta: 9754342-8 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Marzo de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. José Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>QFB. Idalia Avila Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Ana Laura Vázquez Martínez</u>	

AGRADECIMIENTOS

A Dios...

A mi padre por el apoyo y la paciencia.

A mi madre por el amor.

A mi bro por su "guía espiritual" y la ñoña por la enseñanza.

A mamaeva y la abol por su confianza.

A Paos y Joss por su empatía, por ser parte y testigos de mi vida.

A la tía y poncho por su soporte, a Angeles y Esme por estar y escuchar.

A Raquel y Carmen por convertirse en mi "familia temporal".

Al prof. Montiel por su apoyo, amistad y gran paciencia !

A todos los que en gran o pequeña manera contribuyeron de forma personal o academica a moldearme hasta llegar al hoy.

A los que ya no están...

ナナナナナ

En el hecho se encuentra un todo;
y en gran parte de ese todo estás tú.
Ayudando a escribir palabras y pensamientos
Ayudándome a escribirme y pensarme.
En la sombra de la representación
se encuentran realidades indescriptibles e inimaginables,
acciones fundamentales, decisiones trascendentales.
Donde la voluntad marca la transición
entre el existir y el ser y el somos.
Y es ahí y en donde continúa, donde quiero estar...
Gracias por tanto
Te amo
Iván

CONTENIDO

I. Antecedentes	5
II. Justificación	8
III. Objetivos.....	10
IV. La Mitocondria	12
4.1 Características morfológicas	13
4.1.1 Antecedentes	13
4.1.2 Estructura	14
4.2 Teorías evolutivas	18
4.3 Cadena Respiratoria	20
4.3.1 Ciclo de Krebs	22
4.3.2 Complejo I	27
4.3.3 Complejo II	28
4.3.4 Poza de ubiquinona	28
4.3.5 Complejo III	29
4.3.6 Citocromo C soluble	29
4.3.7 Complejo IV	30
4.4 Fosforilación Oxidativa (sistema OXPHOS)	31
4.4.1 Complejo V	31
4.5 Estrés oxidativo	35
4.6 Apoptosis	38

V. DNA mitocondrial	43
5.1 Organización	44
5.2 Replicación	46
5.3 Transcripción	48
5.4 Traducción	53
5.5 Tipo de herencia y Transmisión de heteroplasmia	56
5.6 Efecto Umbral	58
VI. Patología mitocondrial	59
6.1 Alteraciones	60
6.1.1 Alteraciones en nDNA	62
6.1.2 Alteraciones en nDNA y/o mtDNA	62
6.2 Mutaciones puntuales	64
6.3 Deleciones	66
6.4 Depleciones	68
6.5 Enfermedades mitocondriales	69
VII. DNA mitocondrial y Evolución humana	72
7.1 Teorías acerca del origen del <i>Homo sapiens</i>	73
7.1.1 Hipótesis Savana	80
7.1.2 Hipótesis Woodland-Mosaic	81
7.1.3 Hipótesis Variable	81
7.2 MtDNA en la evolución	85
7.3 Migraciones	91
7.4 Haplogrupos mitocondriales	96
7.4.1 Fundamentos Generales en técnicas de Biología Molecular	

7.4.1.1 RFLP	98
7.4.1.2 PCR	101
7.4.1.3 Secuenciación	104
7.4.1.3.1 Sec. Enzimática	104
7.4.1.3.2 Sec. automática por fluorocromos.....	105
7.4.1.3.3 Sec. Cíclica	106
7.5 Distribución mundial	109
7.5.1 Africa	109
7.5.2 Asia	113
7.5.3 Europa	116
7.5.4 Oceanía	120
VIII. Haplogrupos nativo-americanos	121
8.1 América	122
8.1.1 Tribus de América del Norte	123
8.1.2 Población amerindia latinoamericana	125
8.1.3 Frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en América	
8.2 México	137
8.2.1 Comunidad indígena en México	139
8.2.2 Principales lenguas indígenas y su distribución	142
8.2.3 Frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en México	
IX. Conclusiones	154
X. Bibliografía	159

I. ANTECEDENTES

En la actualidad se realizan diversos estudios relacionados con el DNA mitocondrial (mtDNA). En general, se definen dos líneas de investigación:

1. Asociado a patologías
2. Asociado a estudios sobre evolución humana

Gracias a las diversas investigaciones hechas en los últimos años alrededor del mundo se ha podido estudiar la posible relación que existe entre el fondo genético mitocondrial y ciertos fenotipos de interés característico de un individuo y de una población entera. Ya que se ha secuenciado en su totalidad el genoma mitocondrial y se han asignado loci específicos para cada gen funcional, ahora es más fácil localizar mutaciones y sus posibles consecuencias. Se han observado alteraciones del mtDNA tales como grandes deleciones (de cientos pares de bases) causando fenotipos como la Oftalmoplejía externa progresiva aguda (CPEO) y el síndrome de Kearns-Sayre (Zeviani 1988); (Moraes 1989). En la última década se han caracterizado cerca de 100 mutaciones puntuales diferentes en el mtDNA, que afectan genes que codifican tanto proteínas como RNA's. Muchas otras mutaciones puntuales que involucran genes de tRNA han sido descritas y asociadas con varios fenotipos clínicos, incluyendo MERFF (Shoffner 1990) (Enriquez 1995), sordera (Guan 1998). La depleción del mtDNA se ha asociado en niños recién nacidos con disfunción renal, fallo hepático y acidosis láctica lo que puede causar la muerte en el primer año de vida (Chinnery 2000).

En cuanto a la evolución humana se han descrito haplogrupos bien definidos por región geográfica, ya que el mtDNA tiene una herencia particular de origen materno, su falta de recombinación biparenteral hace que sus mutaciones se conserven de generación en generación (Elson 2001) Los estudios más recientes acerca de haplogrupos nativo-americanos en México revelan que son más frecuentes los haplogrupos A y B y con menos frecuencia el haplogrupo C y el D el menos frecuente.

Esto puede explicarse por las migraciones humanas que poblaron América que cruzaron el estrecho de Bering desde Asia (donde éstos haplogrupos

aparecen con una frecuencia bastante considerable) (Torrioni 1994). Se ha observado que la frecuencia de estos haplogrupos se invierte al descender geográficamente del continente Americano; así encontramos en lugares como Argentina que el haplogrupo más frecuente es el D y el menos el A, esto se explica gracias a la teoría de que fueron 3 ondas migratorias y no una; la 1° hace 34 000 años, 2° hace 15000 años y la 3° hace 9 500 años (Wallace 1999) aunque esta teoría es refutada con otras en las que se propone solo una onda migratoria.

Abarcando estas dos líneas de investigación ahora se estudia la relación entre los haplogrupos mitocondriales y patologías asociadas, en donde se trata de explicar el por qué de la alta incidencia de algunas enfermedades en cierta población determinada.

II. JUSTIFICACIÓN

Como se puede observar las líneas de investigación actuales en el mtDNA son: a) el estudio de la posible asociación de alteraciones en el mtDNA asignadas a ciertos haplogrupos y fenotipos patológicos que presente un paciente, con el propósito de entender mejor la etiología de la enfermedad, prevención y cura; b) las patologías relacionadas con alteraciones en el mtDNA asignadas al haplogrupo perteneciente del enfermo, esto es para entender mejor la etiología de las enfermedades su prevención y cura; y al que comprende el análisis de las frecuencias de haplogrupos mitocondriales en mutaciones de mtDNA en poblaciones nativas de las diferentes regiones para su posible asociación con fenotipos de interés.

Así, observamos que los haplogrupos mitocondriales no han sido ampliamente estudiados en poblaciones mexicanas, es por esto que el presente trabajo pretende realizar una revisión que presente la situación actual del estudio de los haplogrupos nativo-americanos en México, destacando los principales grupos de investigación, poblaciones estudiadas, y resultados obtenidos. Entre los cuales destaca la frecuencia específica de cada región con fines de análisis y comparación.

III. OBJETIVOS

Revisar la situación que guarda el actual estudio en el mtDNA con respecto a los haplogrupos nativo-americanos a nivel mundial

Revisar los estudios realizados en México de los haplogrupos nativo-americanos mitocondriales

Mostrar en relación a la revisión previa, los estudios de frecuencias de haplogrupos nativo-americanos en México comparándolo con los observados en el resto del continente americano.

IV. MITOCHONDRIA

4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

4.1.1 Antecedentes

El término mitocondria proviene del griego *mitos*, filamento y *chondros*, grano. Este nombre se acuñó como descripción fiel a la morfología de dicho organelo que fue descubierto y descrito por primera ocasión en 1888 por Kollinker como gránulos con carácter membranoso con un arreglo característico en el tejido muscular estriado de insecto. Desde la primera observación y gracias al avance de la tecnología y técnicas de tinción se pudo identificar de forma cada vez más clara la morfología de dicho organelo. El avance en el aspecto bioquímico se originó desde 1936 donde Otto Warburg y Walter Christian descubrieron al DPN (difosfopiridín nucleótido) o NAD (nicotín adenín dinucleótido) como constituyente esencial de las reacciones de transferencia de hidrógenos en la fermentación, y así se empezaron a dilucidar las reacciones en el proceso de fosforilación y oxidación. Años más tarde se empezaron a establecer las reacciones de oxido-reducción realizadas por la célula. Keilin, con un espectroscopio manual efectuó observaciones trascendentales que permitieron asignar a los citocromos como componentes indispensables de la respiración concluyendo que el citocromo actúa como catalizador respiratorio el cual, es funcional en estado oxidado y en forma parcialmente reducida.

Los procesos de identificación morfológica y funcional de la mitocondria ocurrieron de la mano dándose uno después de otro en forma coordinada pero no fue hasta Belitzer y Tzibacova que hicieron las primeras medidas cuantitativas y establecieron la relación del fosfato inorgánico y el oxígeno consumido (P/O) (Belitzer, Tsivakova 1939) en que más del 90 % de la energía utilizable de la oxidación de la glucosa viene del proceso de fosforilación oxidativa.

Gracias a diferentes investigaciones definieron como sustratos oxidables a intermediarios del ciclo de Krebs y como aceptores de fosfatos al ácido adenílico, a la creatina y a la glucosa. Calcularon el cociente de moléculas de fósforo utilizado las cuales más tarde se redefinieron como moles de ATP sintetizados sobre átomos gramo de oxígeno. Indiscutiblemente éstos descubrimientos reflejaban la capacidad acoplante de la mitocondria, así como la capacidad del sustrato para proveer la energía para la síntesis de ATP y que contribuye a las subsecuentes reacciones de oxido-reducción en posteriores transportes de hidrógeno. En consecuencia se estableció la importancia de la mitocondria en la función celular y la relación entre su fisiología y su estructura.

4.1.2 Estructura

La ultraestructura de la mitocondria fue descrita por Palade y Sjostrand en 1952-1953 identificando que la mitocondria consiste de dos sacos membranales uno metido en otro. El contorno de la membrana externa es liso y la membrana interna presenta invaginaciones que forman crestas . En 1962 Fernández Moran publicó su trabajo sobre subpartículas mitocondriales. Actualmente se estudia los complejos dentro de la membrana interna en los que se realiza la fosforilación oxidativa (Vázquez 2002).

La mitocondria es un organelo celular que se distribuye dentro del citoplasma, su número es variable siendo más abundantes en tejidos con mayores requerimientos energéticos como músculo cardiaco, riñón, etc. en los cuales se encuentran entre 800 y 2500 mitocondrias por célula.

Existen en casi todas las células eucariotas (excepto eritrocitos y algunos protozoos). Su forma tiene relación directa con el tejido en donde se encuentran pudiendo adoptar forma de grano, bastón o filamento (Geneser, 2002).



Figura 1.1.0 a) micrografía electrónica de corte longitudinal de mitocondria de una célula pancreática de murciélago (biologicalmang.metroglobal.com); b) corte longitudinal de mitocondria en hepatocito (gaia.ibmc.up.pt/group/ngbm)

Con la microscopía electrónica, se observa que la mitocondria muestra una estructura rodeada por 2 membranas fosfolipídicas denominadas: membrana externa y membrana interna, ambas con un grosor aproximado de 90 Å. Se pueden observar puntos de contacto entre ellas por lo que se dice que es una sola membrana o “membrana unitaria”. La membrana externa es lisa continua y presenta una permeabilidad poco selectiva debido a la presencia de proteínas “porinas” las que forman poros permitiendo el paso de sustancias de hasta 10 kD. También contiene proteínas translocadoras aunque su selectividad es debida principalmente al tamaño de partícula.

Entre la membrana externa y la membrana interna se encuentra el espacio intermembranal. La membrana interna en cambio tiene apariencia rugosa, es altamente selectiva e impermeable a la mayoría de las moléculas e iones ya que su selectividad depende de la presencia de translocadores y acarreadores específicos. La funcionalidad de la mitocondria recae casi principalmente en las características físico-químicas de las membranas. La membrana interna es rica en cardiolipina y forma pliegues denominados crestas, teniendo una relación directa la cantidad de crestas por mitocondria con el requerimiento energético de ésta, pudiendo cambiar drásticamente de forma, tamaño o número. Ésta membrana marca el límite externo de la matriz mitocondrial que presenta finas granulaciones a las que se asocian acumulaciones de iones en particular de calcio (Vázquez 2002) (Geneser 2002). Para identificar la estructura de la membrana interna se realizaron diversos experimentos pero el más representativo fue el de Fernández Morán que aisló pequeñas esferas a las que llamó partículas elementales (después llamadas partículas F_1) con un diámetro de 10 nm unidas a la membrana interna a través de un tallo al que se le denomina F_0 . El complejo formado por F_0 que fija a F_1 aparecen en intervalos regulares de 10 nm y se ha demostrado que es el asiento de la síntesis de ATP. Ahora con las técnicas recientes se ha caracterizado que esta fracción corresponde al complejo número V de la fosforilación oxidativa en la que se forma ATP.

Dentro de la matriz mitocondrial se encuentran diversos complejos proteicos como el piruvato deshidrogenasa y enzimas del ciclo de Krebs así como de las rutas metabólicas de la degradación de ácidos grasos (β -oxidación) y de la oxidación de aminoácidos - en general todas las rutas metabólicas de oxidación ocurren dentro de la mitocondria excepto la glicólisis que ocurre en el citosol. La membrana selectiva interna segrega los intermediarios y las enzimas de las rutas metabólicas del citosol de aquellos que ocurren en la matriz mitocondrial.

Sin embargo los transportadores específicos acarrearán piruvato, ácidos grasos y aminoácidos. De manera similar ADP y P son transportados específicamente dentro de la membrana y el nuevo ATP sintetizado es transportado hacia fuera.

Se han descrito 5 complejos proteicos formados por diversas subunidades de diferente naturaleza (ya sea provenientes del DNA nuclear o del DNA mitocondrial) en las cuales se realizan las diversas reacciones de oxidoreducción y fosforilación de la respiración celular (Babcock 1992)(ver sistema OXPHOS).

En el siguiente esquema se observa la estructura interna mitocondrial:



Figura 1.1.1 Esquema de los compartimentos mitocondriales.

(bio-cl.iespana.es/bio-cl/mitoc.htm)

4.2 TEORÍAS EVOLUTIVAS

El origen intracelular de estos organelos se ha explicado por la hipótesis endosimbionte (Margulis, 1981), en la que se propone que la mitocondria es descendiente de una bacteria endosimbiótica que se integró a una célula hospedera con núcleo.

Fundamentado en la hipótesis que establece que las células eucariontes en un principio eran organismos anaerobios, y que gracias a un aumento en los requerimientos energéticos de ella junto con un aumento substancial en la concentración de oxígeno atmosférico, es factible inferir que se facilitó el establecimiento de una relación simbiótica estable con una bacteria aerobia con la capacidad para realizar las reacciones oxido-reducción acopladas a la síntesis de energía química como la fosforilación oxidativa. Esta característica de la bacteria fue desviada hacia los requerimientos energéticos de la célula: a cambio la bacteria recibió los nutrientes necesarios para su propia subsistencia. (Montiel, 2002)

Sin embargo, existe otra nueva teoría en la que se supone que la mitocondria surge de un ancestro común al mismo tiempo que el núcleo de la célula eucariota (Gray 1999). En la llamada "hipótesis" del hidrógeno para el primer eucariota" (Martín y Muller, 1998) se establece que en una atmósfera rica en Hidrógeno y Bióxido de carbono una bacteria autótrofa que utilizaba éstos dos elementos estableció una relación de simbiosis con un organismo heterótrofo (α -proteobacteria) que era capaz de metabolizar carbohidratos complejos y sintetizar hidrógeno y bióxido de carbono que el huésped necesitaba para vivir.

Esta simbiosis dio origen a otro organismo el cual ya presentaba un citoesqueleto (Doolittle 1998), gracias al ambiente oxidante que predominaba en esos momentos y las rutas metabólicas que cada uno poseía, se logró la adaptación bioquímica con el revertimiento de la bomba Sodio / hidrógeno dependiente de ATP, y con ello la producción de ATP para la célula huésped (Jansen 2000) (Montiel 2002). Ahora la mitocondria adaptada totalmente a la célula es capaz de producir elementos necesarios para su función. Es decir, que es un organelo semi-autónomo que conserva su propio DNA y su capacidad de expresión. (Anderson 1981). Actualmente se han identificado procesos anaeróbicos ligados a mitocondrias en muchos organismos eucarióticos como los encontrados en varios helmintos, estos estudios se enfocan directamente en el rol bioquímico de la fumarato reductasa, la síntesis de rodoquinona y las enzimas envueltas en la producción de acetatos (acetato: succinato CoA-transferasa y succinil CoA-sintetasa) como proteínas ligadas a la actividad anaerobia primitiva de la mitocondria (van Hellmond 2003).

Otros estudios revelan que los hidrosomas que se encuentran en diversos eucariontes anaerobios fueron alguna vez mitocondrias, estos hidrosomas contienen genoma lo que supone una probable transformación, contando en sus enzimas: piruvatos, ferredoxin oxido-reductasas e hidrogenasas. La transformación filogenética de estas enzimas no se ha podido describir todavía (Embeley 2003). En cuanto al genoma se cree que varios genes bacterianos ancestrales se han transferido de la mitocondria al genoma nuclear, esto debido a la presencia de genes homólogos en el genoma mitocondrial de algunas especies y el genoma nuclear de otras especies. Aunque muchas proteínas mitocondriales son codificadas en el núcleo éstas no presentan ninguna homología con las proteínas bacterianas por lo que se cree que se originaron dentro de la célula eucariota después del proceso endosimbiótico. (Andersson 2003)

El proceso central de esta integración en cuanto a las actividades propias de la mitocondria y las celulares se describen como la transferencia de un gran numero de genes mitocondriales al núcleo; esta transferencia de material genético ha alterado la estructura y la composición del genoma nuclear, este proceso es la mayor influencia en evolución en el equilibrio energético de la célula eucariota. Así, dos tipos de secuencia derivada del mtDNA se pueden identificar en el núcleo; la primera se refiere a DNA nuclear que codifica productos de genes que alguna vez fueron mitocondriales exclusivamente, la segunda se refiere al DNA nuclear que es copia del mtDNA existente. La caracterización de los eventos que dieron lugar a tal acomodo no se han podido identificar del todo (Nang 2002).

4.3 CADENA RESPIRATORIA

La mitocondria es un organelo esencial para la función celular ya que está involucrado en procesos anabólicos y catabólicos de sustratos energéticos como lo son : lípidos, proteínas y carbohidratos. En este compartimiento se realiza la respiración interna celular para la producción final de energía reutilizable en forma de ATP. Aquí se procesan diferentes rutas metabólicas importantes como lo son: el ciclo de ácidos tricarbóxicos (o ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs)-dentro de la matriz mitocondrial, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa – dentro de la membrana interna, así como el intervenir indirectamente gracias a sus enzimas en muchas otras rutas metabólicas como el transporte de sustratos, anabolismo lipídico, etc.

Las principales rutas catabólicas se interrelacionan y concertan mecanismos regulatorios que les permiten funcionar conjuntamente y de una manera económica y auto-regulable para la producción de ATP y sus precursores biosintéticos. Las concentraciones de ATP y ADP no solo controlan los rangos de transferencia de electrones y la fosforilación oxidativa sino también el ciclo de Krebs, oxidación del piruvato y glicólisis. Así podemos observar que si el consumo de ATP se incrementa, el rango de la transferencia de electrones y fosforilación oxidativa se incrementa. De manera simultánea, el rango de oxidación del piruvato via ciclo de Krebs aumenta y esto incrementa el flujo de electrones dentro de la cadena respiratoria. Estos eventos pueden transformarse en un incremento en la glicólisis aumentando la formación de piruvato. Cuando la conversión de ADP en ATP baja la concentración de ADP, el aceptor regula la baja en la transferencia de electrones y de la fosforilación oxidativa. La glicólisis y el ciclo de Krebs pueden disminuir en actividad ya que el ATP es un inhibidor alostérico de la enzima glicolítica fosfofructocinasa-1 y de la piruvato deshidrogenasa (Hansford 1980).

Debido a esta interrelación, casi todas las rutas metabólicas principales tienen como fin la fosforilación oxidativa y por consiguiente su transporte y proceso dentro de la membrana interna mitocondrial.

4.3.1 Ciclo de Krebs

Una vez formado el Acetil CoA por medio de las diferentes rutas metabólicas (no solo glucólisis o lipólisis), los destinos de esta molécula generada en el compartimiento mitocondrial incluyen: a) la oxidación completa del grupo acetilo en el ciclo de ácidos tricarboxílicos para la generación de energía, b) en el hígado, la conversión de un exceso de acetil CoA en los cuerpos cetónicos y c) la transferencia de las unidades acetilo al citosol y posterior biosíntesis de moléculas complejas como esteroides y ácidos grasos de cadena larga. Como se muestra en el siguiente esquema:



figura 1.3.0 Funciones del Acetil CoA. (Thomas 2000)

Pero su destino principal es la oxidación completa en una serie de ocho reacciones cíclicas en el denominado ciclo de los ácidos tricarboxílicos, y se localiza en la mitocondria. Aunque algunas isoenzimas de las enzimas del ciclo se encuentran en el citosol, la localización primaria se encuentra en la matriz mitocondrial

Los productos principales de este proceso son:

- dos moléculas de CO_2
- un enlace de alta energía en forma de GTP
- cuatro moléculas reductoras (3 NADH y 1 FADH_2).

En el siguiente esquema se pueden observar las reacciones que conforman el ciclo de Krebs:

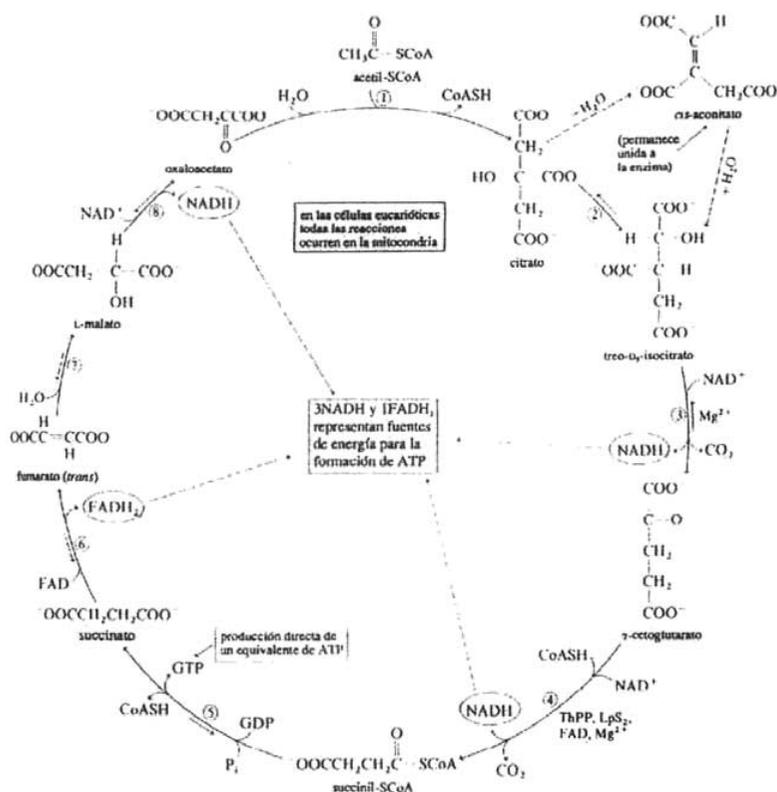


figura 1.3.1 Reacciones dentro del ciclo de Krebs. (Bohinsky 1991)

El ciclo incorpora grupos de dos carbonos en forma de AcetilCoA que se oxidan completamente a CO_2 y H_2O . Se forman 4 equivalentes de reducción (como ya se mencionó). La oxidación de cada $\text{NADH} + \text{H}^+$ da lugar a la formación de 3 moléculas de ATP en la secuencia de la fosforilación oxidativa, mientras que la oxidación de FADH_2 formado en la reacción de succinato deshidrogenasa produce dos moléculas de ATP. En la reacción de la succinil CoA sintetasa también se genera un enlace de alto contenido energético en forma de GTP. De ahí que el rendimiento neto de ATP y GTP para la oxidación completa de un grupo acetilo en el ciclo de Krebs sea 12.

Durante la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O se produce una formación neta de: 2 moléculas de ATP por glucosa en la conversión de glucosa a 2 moléculas de piruvato; 6 moléculas de ATP por glucosa como resultado de la translocación y la posterior oxidación de dos moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$ formadas en la reacción de la gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa de la ruta glucolítica; 30 moléculas de ATP por glucosa a partir de la oxidación de dos moléculas de piruvato en la reacción de la piruvato deshidrogenasa y de la posterior conversión de dos moléculas de acetil CoA a CO_2 y H_2O en el ciclo de Krebs. De aquí que el rendimiento neto de ATP durante la oxidación completa de glucosa sea de 38 moléculas de ATP (Velot 1997).

A los procesos de cadena respiratoria y fosforilación oxidativa se les relaciona dentro de la mitocondria por dos aspectos fundamentales: 1. todo el proceso se lleva a cabo dentro de la membrana interna mitocondrial y 2. involucra al mtDNA ya que parte de sus subunidades en los diferentes complejos son codificadas y traducidas dentro del mismo organelo.

Se puede decir que la cadena respiratoria es el proceso subsecuente al ciclo de Krebs, en los que hay dos tipos de reacciones acopladas: transferencia electrónica y oxidación. Todo este proceso se lleva a cabo para la formación de ATP dentro de la fosforilación oxidativa y su posterior uso como sustrato energético (así su degradación en ADP + P) para su formación nuevamente, es decir es una bomba energética. Dentro de la transferencia electrónica hay 4 componentes ligados al sistema mitocondrial que son; deshidrogenasas ligadas a NAD⁺, deshidrogenasas ligadas a flavina, proteínas ferrosulfuradas y citocromos. Todos estos componentes actúan de manera coordinada en el transporte de electrones, debido a sus diferentes propiedades. La cadena respiratoria se procesa gracias a la actividad de los éstos acarreadores electrónicos, muchos de ellos son proteínas con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar entre uno y dos electrones.

Dentro de la transferencia electrónica existen tres tipos de proceso: 1) la transferencia directa de electrones, como en la reducción de Fe⁺³ a Fe⁺²; 2) transferencia por un átomo de hidrógeno (H⁺ + e⁻); y 3) transferencia por ion hidronio (:H). Ya que se trata de un sistema de transferencia, sabemos que en términos fisicoquímicos, la tendencia relativa de cualquier par (redox) a reducirse se expresa en términos de un potencial estandar de reducción electroquímica simbolizado por ϵ medido en volts (V) (Lehninger 2000). El valor de cada potencial se mide contra el par estandar de hidrógeno (2H⁺, H₂) a concentración, temperatura y presión establecidas. Como las reacciones dentro de la cadena son acopladas mientras un par se reduce otro se oxida, así de cada sistema se calcula el potencial neto:

$$\epsilon^{\circ'} = \epsilon^{\circ'}_{\text{ox}} + \epsilon^{\circ'}_{\text{red}}$$

Dichos potenciales se presentan en el siguiente esquema con las reacciones acopladas de manera sencilla :

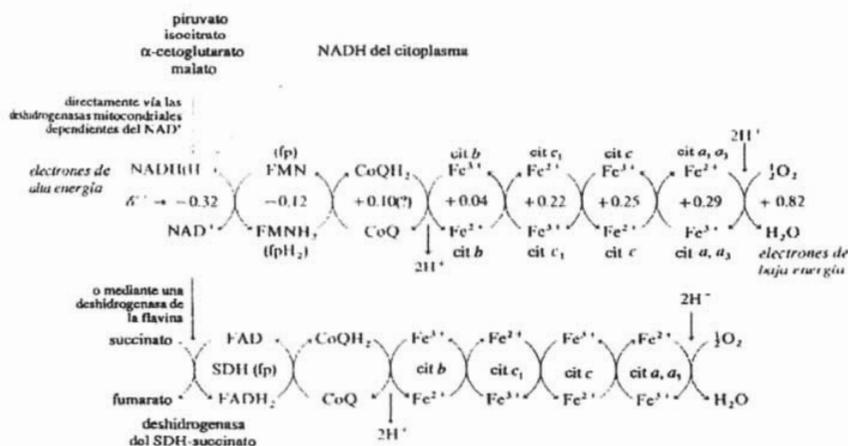


Figura 1.3.2 Representación de la cadena respiratoria asociada con la oxidación de sustrato por una deshidrogenasa dependiente de NAD y por una deshidrogenasa dependiente de flavina. No se presentan aquí las proteínas ferrosulfuradas portadoras. (Bohisnky 1991)

Como se podrá observar la organización termodinámica es evidente en que los portadores están dispuestos de tal modo que cada transferencia puede ocurrir de modo espontáneo y exergónico. Donde ΔG° es un valor negativo y la $K_{eq} > 1$ (Klotz 1961). (Como ya se mencionó anteriormente este no es el único proceso de transferencia electrónica; los demás procesos se tratarán más adelante). Los acarreadores electrónicos de la cadena respiratoria están organizados dentro de la membrana interna mitocondrial en complejos multi enzimáticos que pueden ser separados físicamente.

Se han descrito 5 complejos distribuidos de manera secuencial (Babcock 1992), y éstos son :

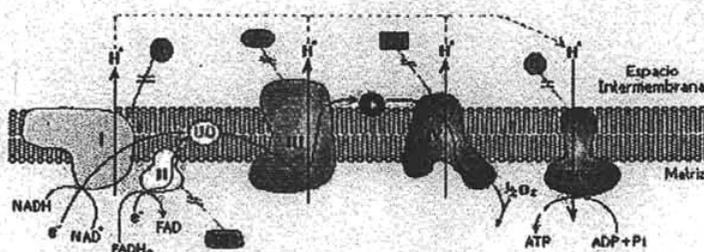


Figura 1.3.3 Distribución espacial de los complejos de fosforilación oxidativa.. Montiel Sosa.

Complejo 1. NADH ubiquinona oxidoreductasa

Complejo 2. Succinato ubiquinona oxidoreductasa

Complejo 3 o complejo bc₁. Ubiquinol citocromo c oxidoreductasa

Complejo 4. Citocromo c oxidasa

Complejo 5. ATP sintetasa

4.3.2 Complejo I

Cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona. Su estequiometría es de $4\text{H}^+ / 2\text{e}^-$. El complejo contiene 1 flavín mononucleótido, dos centros binucleares de hierro-azufre denominados N1_a y N1_b, cuatro centros fierro-azufre tetranucleados N2, N3, N4 y N5 y dos especies de ubiquinonas fuertemente unidas (Beinert 1982). Se piensa que el flujo de electrones ocurre de la siguiente manera: el NADH reduce al grupo FMN y éste a los centros N3 y N1_b en la misma subunidad. Después se reducen los centros N1_a y N4 seguidos del centro N2 y finalmente la ubiquinona. (Vinogradov 1993). Esta compuesto por 41 subunidades por lo que se ha denominado "el complejo más complejo" (Pilkinton 1993).

4.3.3 Complejo II

La succinato deshidrogenasa tiene una función dual: participa como enzima en el ciclo de Krebs y como complejo II de la cadena respiratoria por lo que lo coloca como un regulador importante del metabolismo. (Hagerhall 1997) Cataliza la oxidación de succinato a fumarato y transfiere directamente electrones a la poza de ubiquinona. Este es el único complejo que no es una bomba de protones. La enzima esta presente en la membrana como un complejo formado por varias subunidades. Contiene un dominio hidrofílico catalítico por varias subunidades que contienen una molécula de FAD unido covalentemente a un polipéptido a través de una histidina y tres centros hierro-azufre y un dominio membranal compuesto de dos subunidades que contiene un grupo hemo *b* y que confiere reactividad (Ohnishi 1987). El succinato es oxidado a fumarato por el grupo FAD quien recibe dos electrones. El resto de la cadena no esta completamente establecida pero se piensa que los electrones pasan desde FADH₂ hasta los centros de hierro-azufre 1 y 3 y éstos a su vez reducen a la ubiquinona unida al complejo (Yu 1987)

4.3.4 Poza de ubiquinona

Es una molécula hidrofóbica constituida por un anillo de quinona unida a una cadena de 10 unidades isoprenoides. Sus características hidrofóbicas le permiten difundir rápidamente en el interior de la capa lipídica permitiéndole transferir los electrones de las dos deshidrogenasas (complejos I y II) hasta el complejo bc₁ (Kroger 1973).

4.3.5 Complejo III

Cataliza la oxidación del ubiquinol y la reducción del citocromo c soluble. Esta asociada a translocación de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. Esta compuesto por 11 diferentes polipéptidos. Es un complejo dimérico constituido de tres partes : una hidrofóbica (citocromo b), una hidrofílica (citocromo c_1 y a la proteína hierro-azufre) y que corresponde a las proteínas estructurales (Leonard 1981).

4.3.6 Citocromo c soluble

Se trata de un grupo hemo unido covalentemente a una apoproteína. Esta proteína se encuentra abundantemente en el espacio intermembranal y transfiere los electrones desde el complejo III hasta la citocromo c oxidasa. (González 1988). Esquema complejo III y citocromos:

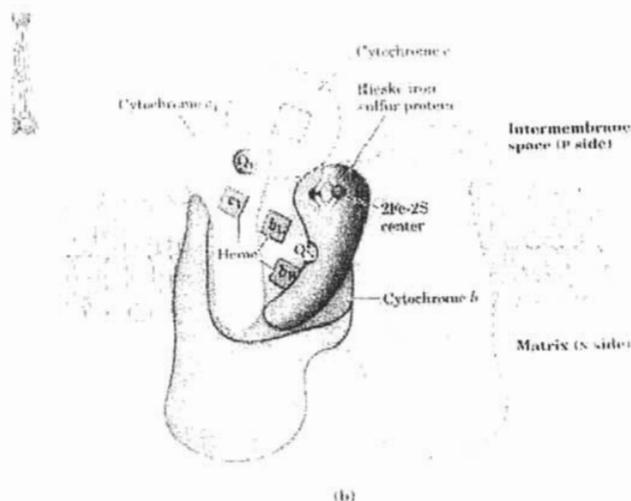


Figura 1.3.2 Complejo III con citocromos y proteínas ferro-sulfuradas. Lenhinger 2000.

4.3.7 Complejo IV

La enzima transfiere electrones desde el citocromo c reducido hasta el oxígeno y contribuye a la generación de gradiente electroquímico de protones. Los cuatro protones que se requieren para la reducción de oxígeno molecular en agua se toman de la matriz mitocondrial de acuerdo a la siguiente reacción :



El complejo esta constituido por 13 subunidades. Los centros de óxido-reducción involucrados en la transferencia de electrones son dos hemos de tipo *a* denominados *a* y *a*₃, así como dos centros de cobre denominados Cu_A y Cu_B. La subunidad I contiene al hemo *a* y al centro binuclear hemo *a*₃ - Cu_B. En este centro binuclear compartido por hemo y cobre, el oxígeno es reducido hasta agua. También en este centro binuclear se une el inhibidor clásico de esta enzima: el cianuro. (Kadenbach 1983). Una característica interesante de la citocromo c oxidasa es que presenta especificidad de tejido. Se ha encontrado que las subunidades de origen nuclear VIa, VIIa y VIII son codificadas por distintos genes dependiendo si son de corazón o músculo esquelético (Grossman 1997).

Esquema del complejo IV:

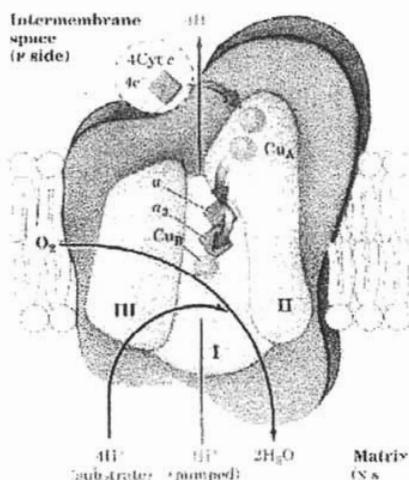


Figura 1.3.6 Reacciones que se llevan a cabo en el complejo IV y sus subunidades. Lenhinger 2002

4.4 FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

4.4.1 Complejo V

La ATP sintetasa es la enzima que aprovecha el gradiente electroquímico generado por la cadena respiratoria para fosforilar el ADP y transformarlo en ATP. Consta de 2 segmentos funcional y estructuralmente diferentes. Un segmento soluble o F_1 que contiene las propiedades catalíticas del complejo hidroliza ATP con una actividad de $100\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Está compuesto de seis subunidades diferentes: α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ y proteína inhibidora; como se muestra en la figura 1.4°,

El segmento F_0 esta compuesto de nueve o mas polipéptidos a, b ,c, d, e, F6, A6L, f y g. Todos ellos forman parte en la formación del canal de H^+ y en la unión con el segmento F_1 (De Gomez-Puyou 1998).

El proceso consiste en el acoplamiento entre el producto de la óxido-reducción de la cadena de transporte de electrones que genera un gradiente de H^+ y de carga positiva del lado que se producen (liberación al espacio intermembranal) y en el sistema que los utiliza. Así los H^+ producidos son transportados a través del segmento F_0 de la ATP sintasa y su energía utilizada por el segmento F_1 para la síntesis de ATP, estableciendo un circuito cerrado de H^+ . El complejo $F_1 F_0$ es un motor rotatorio. La rotación del complejo $\gamma \epsilon$ se hace en tres pasos de 120° cada revolución que hidroliza un ATP en cada paso.(Noji H 1997)

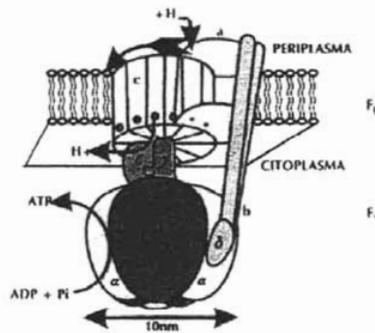


Figura 1.4.0 Esquema teórico de la composición del complejo 5. Se muestran los componentes: 3β , 3α , δ , $2b$, ϵ , γ , 2^* y $12c$ (Vázquez 2002).

En conjunto, la ATP sintetasa actúa como un complejo que convierte energía eléctrica del canal de H^+ en energía mecánica en γ que actúa como resorte de torsión de las hélices paralelas del dímero b unidas arriba por la δ y al canal por a constituyen un resorte que mueve la bisagra de β y que hace la transformación a energía química formando ATP (Sambongi 1999).

Características del motor de la ATP sintetasa

<i>Generador de fuerza</i>	Ab2 α 3 β 3
<i>Energía de rotación</i>	Por fijación de nucleótidos y salida de ATP. Flujo de H^+ a través de F_0
<i>Producto</i>	3 ATP por rotación
<i>Trayectoria</i>	De 9 a 12 subunidades c a 3 α 3 β
<i>Distancia rotor estator</i>	1nm
<i>Fuerza máxima generada</i>	50 Pn
<i>Frecuencia máx de rotación</i>	10Hz
<i>Flujo max de H^+</i>	1 000 por seg
<i>Trabajo W</i>	20 k_bT por ATP a 25°*
<i>En el canal de $\Delta\psi$</i>	3.36 kcal por mol

* nota. $1k_bT = 0.6$ kcal por mol

El siguiente cuadro sintetiza parte de la composición enzimática mitocondrial de los diversos compartimentos.

<i>Membrana externa</i>	<i>Espacio Intermembranal</i>	<i>Membrana interna</i>	<i>Matriz</i>
Monoamino oxidasa	Adenilato ciclasa	Succinato deshidrogenasa	Piruvato deshidrogenasa
Quinureina hidroxilasa	Nucleósido difosfato quinasa	F ₁ -ATPasa	Citrato cintaza
Fosfolipasa A		β -hidroxibutirato deshidrogenasa	Isocitrato deshidrogenasa
Acil graso CoA sintetasas		Citocromo <i>b, c, c₁, a, a₃</i>	α -cetoglutarato deshidrogenasa
Citocromo c reductasa		Carnitina	Acontinasa
Colina fosfotransferasa		Translocasa de nucleótidos de adenina	Fumarasa
		Translocasa de mono-, di- y tricarboxilatos	Succinil CoA sintetasa
		Translocasa de glutamato-aspartato	Malato deshidrogenasa
			Sistema de oxidación de ácidos grasos
			Glutamato deshidrogenasa
			Glutamato-oxaloacetato transaminasa
			Ornitina transcarbamoilasa

(Thomas 2000)

4.5 ESTRÉS OXIDATIVO

El stress oxidativo es un proceso ligado a la oxidación y reducción de sustancias en el metabolismo y se caracteriza por la liberación de radicales libres (ROS). La importancia del estudio del stress oxidativo es su relación con el envejecimiento y con las deficiencias en el metabolismo. Se han estudiado las fuentes que produzcan dichas sustancias como la exposición a sustancias ionizantes tales como la luz UV que es factor para el envejecimiento de la piel. Estas especies reactivas también pueden derivarse de las reacciones que generan al anión superóxido (Shigenaga 1998). Como :



O las reacciones que generan al radical hidroxilo



Sin duda las reacciones de mayor importancia en la producción de superóxidos son las reacciones enzimáticas que participan en el transporte de electrones como la cadena respiratoria. Las principales fuentes de radicales superóxidos son el complejo I y III como se muestra en el esquema siguiente:

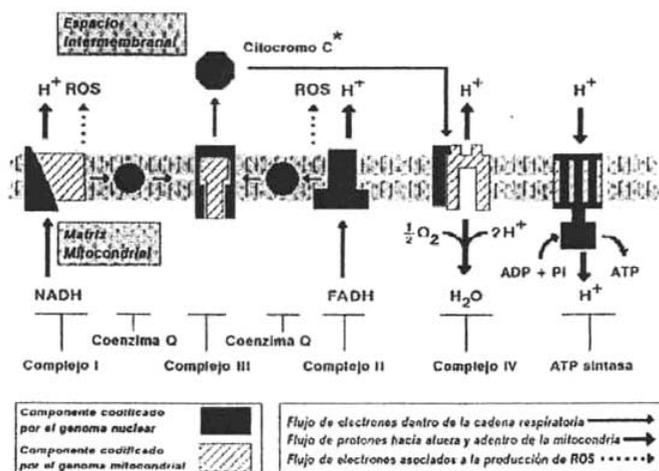


Figura 1.5.0 Fosforilación oxidativa y salida de radicales libres ROS. (Esquema modificado de Wallace DC 1997)

La contribución de las mitocondrias es la más importante dentro de las células debido a que consumen el 85% del oxígeno utilizado, dejando el resto para la β -oxidación de los peroxisomas y varias oxidasas citosólicas (Lenz 1998).

El daño se da como un desbalance entre el estado oxidado y estado reducido dentro de la célula, que se manifiesta en la generación de daño oxidativo acumulado a lo largo de toda la vida. Estas se manifiestan en alteraciones estructurales en proteínas de la cadena respiratoria así como en proteínas sinápticas del cerebro (Shimohama 1998), así como en transportadores de nucleótidos de adenina (Yan Lj 1998) que influye directamente en la deficiencia en la síntesis de ATP. Además se ha encontrado que con el envejecimiento dado al stress oxidativo se deterioran los receptores muscarínicos y adrenérgicos impidiendo el buen transporte de neuro-señales (Joseph 1996).

Este tipo de alteración no solo afecta a las rutas metabólicas por su estructura sino también a su regulación génica. Tanto mtDNA como el nDNA tienen la propensión de aceptar bases hidrolizadas u oxidadas.

Así han sido identificados el 8-hidroxi-desoxi-guanosina, la 8-oxo-2-desoxi-guanosina, 5-hidroxi-2-desoxicitidina, hidoxi-2-desoxi-uridina y la 5,6-dihidroxi-2-desoxi-uridina. (Wagner 1992). Éstas sustancias han sido encontradas en los genomas celulares pero el deficiente sistema de reparación en el mtDNA aumenta el daño potencial y permiten que se acumulen rápidamente. El efecto de la 8-oxo-dG quedó de manifiesto al demostrar que promueve las transversiones de guanina a timina (G→T). También se propone que las mutaciones puntuales e inserción y deleciones asociadas al envejecimiento, ocurren como consecuencia directa de la formación de bases oxidadas. (Cunningham 1997). En el siguiente esquema se puede observar la relación entre el daño oxidativo y el deterioro al material genético tanto nuclear como mitocondrial:

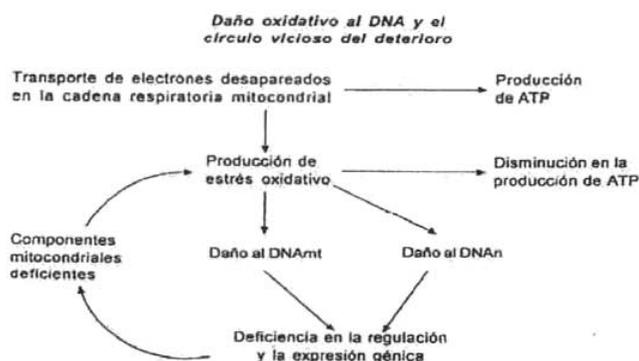


Figura 1.5.1 Daño oxidativo al DNA y el círculo viciosa del deterioro. (Zentella 2002)

4.6 APOPTOSIS

Otra función en la que la mitocondria tiene una participación fundamental es en el proceso apoptótico (por lo cual se aborda de manera breve en el presente trabajo). El término apoptosis se deriva de la palabra griega que describe las caídas de las hojas en otoño o al marchitar de una flor y se utiliza para referirse la tipo de muerte celular distinta de la necrosis. Se le llama “muerte celular programada” y sus características son:

1. Reducción del volumen celular
2. Condensación de la cromatina nuclear
3. Creación de los cuerpos apoptóticos
4. Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por las células vecinas

Se ha descrito que la muerte celular es programada dentro de la misma célula; es decir que sufre de un control génico dentro de la misma célula participando activamente en su destrucción. Esta destrucción se lleva a cabo por medio de diferentes señales que regulan la muerte de células débiles, innecesarias o dañadas del organismo. Cada día aproximadamente el 5% de las células de un organismo entran en apoptosis y su espacio es ocupado por nuevas células. Éste proceso puede durar de 15 a 120 minutos (Kerr 1972).

Existen muchos factores por los cuales la célula se puede ir a un proceso apoptótico. La sensibilidad de las células pueden variar dependiendo de factores como la expresión de proteínas pro- y anti- apoptoticas (Bcl-2 Y Bax), la severidad del estímulo y la etapa en el ciclo celular. En algunos casos el estímulo apoptótico depende de señales extrínsecas como el enlace “de la muerte” a los receptores membranales de la célula o la inducción apoptótica por linfocitos T citotóxicos.

Esto actúan cuando las células T reconocen una célula dañada o infectada por virus e inicia el proceso apoptótico a razón de prevenir células vecinas de adquirir daño. En otros casos el proceso apoptótico comienza por señales intrínsecas producidas por estrés celular; como la radiación, exposición a químicos, infecciones virales, estrés oxidativo. En todos estos casos el inicio de la apoptosis envuelve el funcionamiento de la mitocondria.

La mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de la muerte celular. Por ejemplo las proteínas anti-apoptóticas de la familia de proteínas Bcl-2, como Bcl-2 y Bcl-XL están localizadas en la membrana mitocondrial y actúan promoviendo la supervivencia celular. Muchas de las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 tales como Bad y Bax median su actividad por medio de la mitocondria interactuando con Bcl-2 y Bcl-XL o a través de interacciones con la membrana mitocondrial (Apopto 2003).

La mitocondria tiene la habilidad de promover la apoptosis por la liberación de citocromo C, que con Apaf-1 y ATP forman un complejo con procaspasa 9. Tras la activación de caspasa 9 se inicia la cascada de las caspasas. Es conocido que factores promuevan la liberación de citocromo C de la mitocondria. Bax y otras proteínas Bcl-2 muestran similitud estructural con las proteínas formadoras de poros. Por ende se sugiere que Bax puede formar un poro transmembranal que reduce el potencial membranal y libera citocromo C y AIF (apoptosis inducing factor). Es conocido que Bcl-2 y Bcl-XL actúan previniendo la formación de poros. Aunque se sabe que Bax y Bad promueven la formación de un poro de gran diámetro con la subsecuente pérdida de citocromo C. Las caspasas son una familia de proteínas que son una de las principales proteínas efectoras de la apoptosis. Las caspasas son un grupo de proteínas cisteínicas que existen dentro de la célula de forma inactiva o zimógena. Estos zimógenos pueden ser rotos para activar la caspasa y así comenzar el proceso apoptótico.

La inducción de la apoptosis via “receptores de la muerte” resulta en la activación de caspasa 8 ó caspasa 10. Estas caspasas pueden activar otras en forma de cascada. Eventualmente surge la activación de las caspasas efectoras como caspasa 3 y caspasa 6. Estas caspasas rompen las proteínas clave que desencadenan los cambios morfológicos observados en células en proceso apoptótico. (apopto 2003)

Esquema de las señalizaciones apoptóticas a la mitocondria y la liberación de citocromo C

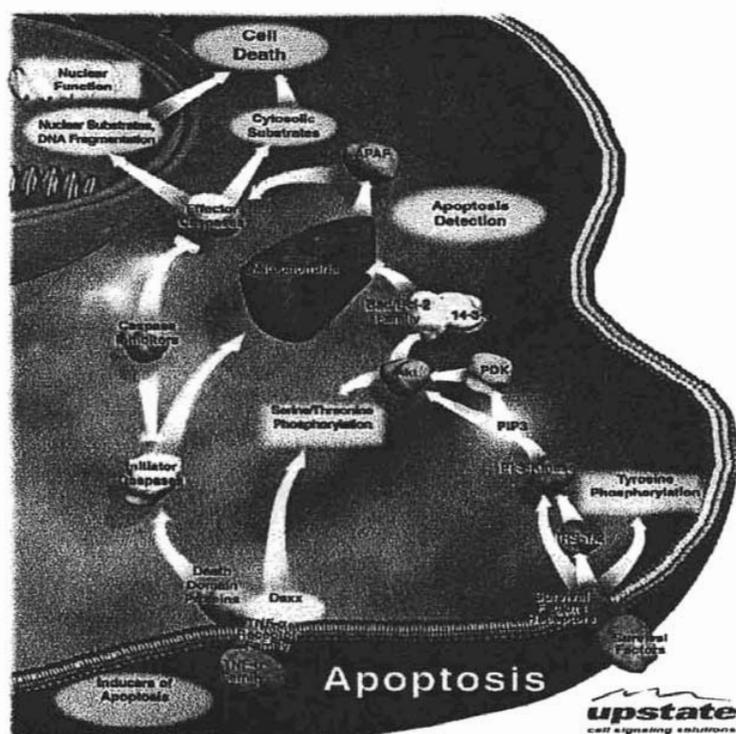


Figura 1.6.0 Señales pro-apoptóticas

Además del reconocimiento de los “enlaces de la muerte” con sus receptores existen muchos mecanismos con cuales la cascada de las caspasas se puede activar. Granzima B puede encontrarse dentro de los linfocitos T y activa directamente las caspasas 3, 7, 8 y 10. La mitocondria puede liberar citocromo C y activar caspasas 9 y 3. Este efecto es mediado a través de la formación de un apoptosoma; un complejo multi-proteico de citocromo C, Apaf-1, pro-caspasa 9 y ATP

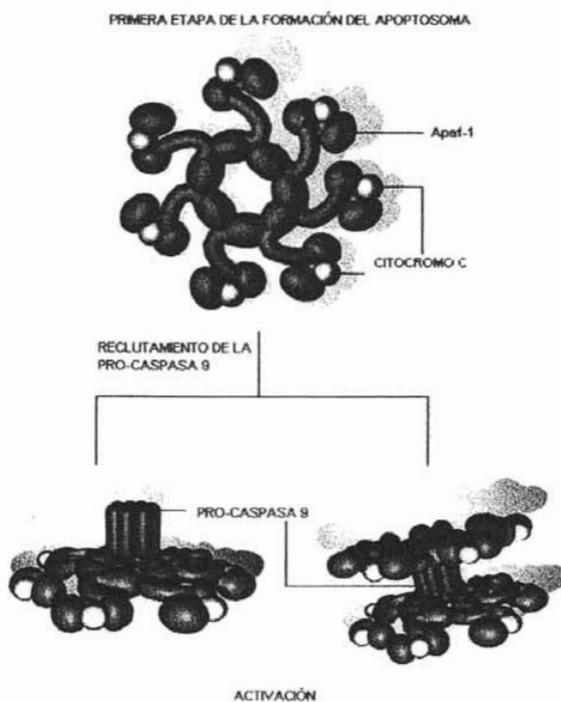


Figura 1.6.1 Formación del apoptosoma (sghmg.ac.uk/depts/immunology/dash/apoptosis/)

El citocromo C que es liberado de la mitocondria se enlaza con la proteína citosólica Apaf-1. Esta interacción resulta en un cambio conformacional en Apaf-1 que, después de estabilizarse gracias al enlace con ATP, permite la unión con otras moléculas Apaf-1. Esto provoca la formación de una estructura en forma de rueda que contiene 7 moléculas de Apaf-1, citocromo C y ATP. El apoptosoma permite el reclutamiento de 7 moléculas de pro-caspasa 9 al complejo. El mecanismo exacto de la activación de las caspasas no se conoce.

V. DNA MITOCONDRIAL

5.1 ORGANIZACIÓN

La mitocondria es un organelo que posee DNA (Anderson et al 1981). En humanos el DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular cerrada de doble hebra y se encuentra de 1000 a 10 000 copias por célula. La hebra H (heavy, pesada) y la hebra L (light: ligera). Éstas se separan por centrifugación debido a su gradiente de densidad dado por la diferencia de bases que se encuentra en cada una de ellas ya que la cadena pesada es rica en guaninas y la ligera rica en citocina (mtDNAred 2003), por lo que tenemos:

Cadena L :

Composición en bases (total bases:16569):5122 A ; 5180 C ; 2171 G ; 4096 T

Peso molecular : 5.060.609 daltons

Cadena H :

Composición en bases (total bases:16569):4096 A ; 2171 C ; 5180 G ; 5122 T

Peso molecular : 5.168.726 daltons



Figura 2.1.0 mtDNA aislado de mitocondrias de hígado. El material se trató de acuerdo al método de Kleinschmidt. Se sombreó con platino-carbón por rotación.

(www.uni.uiuc.edu/dstone/dis_genetic_test_methods.htm)

Posee 16 569 pares de nucleótidos incluido una región no codificante llamada bucle de desplazamiento (D-loop), que presenta 1123 bp de longitud y contiene los elementos de control principales para la replicación y la transcripción además de ser una región hipervariable con alta tasa de mutación (Anderson, 1981). El mtDNA contiene 37 genes: 22 para tRNA, 2 para rRNA y trece que codifican proteínas que son subunidades de la cadena respiratoria necesarias para generar ATP en la vía de fosforilación oxidativa, siete de ellas pertenecen al complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6) una proteína del complejo III citocromo b, 3 proteínas del complejo IV (CO1, COII, COIII), y 2 polipéptidos del complejo V (ATP8 Y ATP6) (Anderson 1981)

Los genes carecen de intrones y algunos de ellos están solapados por lo que alguna alteración o mutación en uno o varios genes resulta muy perjudicial y en muchos casos irreparable. Para la replicación, transcripción y traducción se requieren de muchas proteínas y enzimas codificadas en el núcleo por lo que los genes tanto de rRNA y tRNA en combinación los factores codificados en el núcleo permiten a la mitocondria la traducción de los genes que codifican proteínas en los ribosomas mitocondriales. (Montiel 2002). A continuación se presenta un esquema del mtDNA :

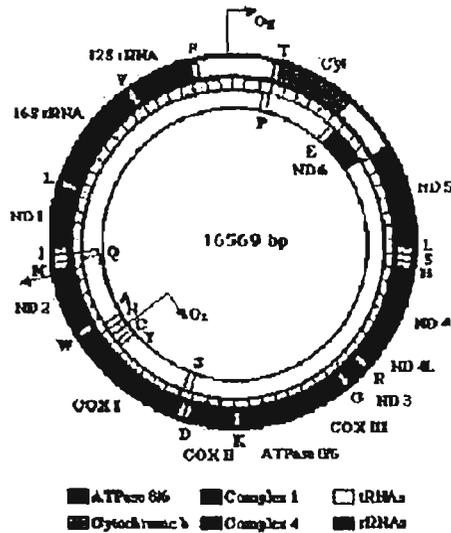


Figura 2.1.2 Genoma mitocondrial. Organización y estructura (Montiel 2002)

5.2 REPLICACIÓN

La replicación del mtDNA está asociada a la transcripción ya que se inicia con un solo promotor en la cadena ligera para los dos procesos. El resultado para la replicación son transcritos de un híbrido RNA:DNA que son procesados por la enzima RNasa MRP. Esta enzima corta el RNA en fragmentos que son luego utilizados como primers de replicación para la mtDNA polimerasa γ y sintetizar DNA.

La replicación inicia en el sitio O_H que se encuentra dentro del D-loop para la cadena pesada, gracias a la participación de un promotor de la hebra ligera (LSP). Éste es promovido a su vez por el factor de transcripción mitocondrial A (mtTFA). Una vez iniciada la replicación en O_H se sintetiza un fragmento corto de RNA; entre los bloques de secuencia conservada (CSB) II y III y se da una transición de RNA en DNA 7S por medio de la participación de una endoribonucleasa codificada en el núcleo llamada RNAasa MRP la cual permite la formación de los fragmentos de RNA con extremo 3' libre para la adición de DNA (Chang y Calyton, 1987). Entre las dos cadenas madre se encuentra la nueva hebra por lo que genera una estructura trimérica.

La replicación de la hebra L inicia cuando se expone el sitio O_L y procede en sentido inverso a lo largo de la hebra H libre. Por tanto se considera un proceso unidireccional y asimétrico con desplazamiento de hebra. La replicación es un proceso lento de $\geq 1h$ para 16kb y es un proceso relajado (Clayton 2002). Se sabe que la mayor parte de la síntesis del DNA 7S concluye en la región de las secuencias de terminación (TASS) que son las mismas secuencias de terminación de la transcripción.

El gen nuclear que codifica a la enzima γ polimerasa se localiza en la región del cromosoma 15q24-25. Esta enzima consta de 2 subunidades; una subunidad catalítica mayor (125-140 kDa) que posee la actividad de polimerización y de 3'-5' exonucleasa, y una subunidad pequeña (35-54 kDa) a la que le atribuyen funciones de reconocimiento del cebador de RNA. Posee una alta eficiencia en sustitución de bases y en actividad exonucleolítica pero baja fidelidad en secuencias de más de 4 nucleótidos. Es una transcriptasa reversa y es inhibida por azidotimina (AZT). Se han caracterizado 4 proteínas no identificadas al cual está asociada. (Yang 1998).

De este proceso en realidad se sabe poco, actualmente se estudian los mecanismos de regulación para la replicación y transcripción ya que son procesos ligados. Se cree que la replicación involucra 20 proteínas que se encuentran en la membrana interna en un complejo multi-enzimático llamado replisoma mitocondrial.

5.3 TRANSCRIPCIÓN

La cadena que por convenio se representa y sobre la que se realiza la numeración del genoma mitocondrial es la cadena L. La numeración se realiza de 1 a 16569 no existiendo intrones, al contrario de lo que ocurre en los genes nucleares. Estos genes no se encuentran todos sobre la misma cadena codificadora, sino que existen genes localizados sobre ambas cadenas (H y L). (Montiel, 2002)

La mayor parte de los genes mitocondriales son transcritos utilizando como molde la cadena H. Por lo tanto el RNA será el transcrito de la cadena H (cadena molde), mientras que la cadena codificadora de éstos genes será la cadena L. Así como cada cadena tiene su propio origen de replicación también en la transcripción se encuentran diferentes sitios de inicio. En la cadena H se localizan dos H_1 en la posición 638 en el gen de $tRNA^{FEN}$ adyacente al gen para rRNA 12S y H_2 en el nucleótido 561 adyacente al gen $tRNA^{FEN}$, mientras que en la hebra L se encuentra solo uno en el nucleótido 407, localizado en el promotor LSP en la región del D-loop a 150 pb de H_2 (Clayton 1991) Cada cadena se transcribe "en una sola pieza"; es decir, se produce una sola molécula de RNA al que se denomina transcrito primario de esa cadena. (Montoya 1982) (Montoya 2003).

En el siguiente esquema se muestra el origen de transcripción para la cadena H en H₂:

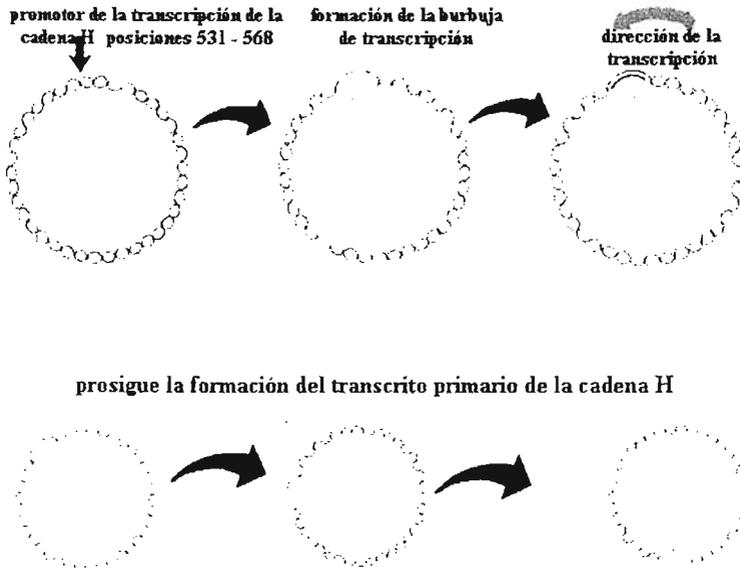


Figura 2.3.0 Esquema general del inicio de la transcripción mitocondrial.

El transcrito primario de cada cadena sufre un proceso de corte por acción de nucleasas (RNAsas) muy específicas codificadas en el núcleo, que producen una colección de RNAs y no son funcionalmente activos.

Genes transcritos de la cadena H

Mt-mRNA y como consecuencia su producto final es una proteína :

NADH deshidrogenasa: subunidad 1 (MTND1) subunidad 2 (MTND2).
subunidad 3 (MTND3). subunidad 4 (MTND4). subunidad 4L (MTND4L).
subunidad 5 (MTND5)

Citocromo c oxidasa : subunidad 1 (CO I). subunidad 2 (COII). subunidad 3 (COIII)

ATPasa: subunidad 6 (ATPasa 6) subunidad 8 (ATPasa 8)

Citocromos: citocromo b

Genes cuya transcripción origina mt-rRNA

RNA ribosomal 12S , RNA ribosomal 16S

Genes cuya transcripción origina mt-tRNA

tRNA-Phe: tRNA-Val: tRNA-Leu (1 y 2): tRNA-Ile: tRNA-Met: tRNA-Trp:
tRNA-Asp: tRNA-Lys: tRNA-Gly: tRNA-Arg: tRNA-His: tRNA-Ser (2): tRNA-
Thr

Genes transcritos de la cadena L :**mt-mRNA****NADH deshidrogenasa: subunidad 6 (MTND6)****mt-tRNAs****tRNA-Ala: tRNA-Asn: tRNA-Gln: tRNA-Cys: tRNA-Tyr: tRNA-Ser (1): tRNA-Glu: tRNA-Pro****Gen que origina un pequeño RNA mitocondrial : RNA-7s**

Se ha identificado una variación dentro de la transcripción de rRNA y mRNA en la cadena pesada; esto se le ha atribuido a que el factor H₁ que transcribe exclusivamente para rRNA terminando en tRNA^{LEU} y el factor H₂ que transcribe para todos los demás RNA's (Montoya 2003) . Para el inicio de la transcripción es necesario la asociación del mtTFA y al parecer induce cambios conformacionales necesarios para el acceso de la RNA polimerasa y dependiendo de su concentración promueve la activación de uno u otro sitio de inicio siendo H₁ más fuerte que H₂. Recientemente se ha propuesto la participación de un segundo factor de inicio de la transcripción mtTFB. En cuanto a la terminación puede ser mediada por un factor llamado mTERF (factor de terminación de la transcripción mitocondrial) (Kruse 1989) (Montiel 2002). Como se ha descrito anteriormente se están realizando diversas investigaciones para describir la regulación bioquímica de dichos factores y promotores tanto de la replicación como de la transcripción. Los descritos actualmente son NRF₁ (nuclear receptor factor) (que también activa la expresión de 5-aminoleulinato sintasa, enzima limitante de la velocidad de la síntesis de grupos hemo para los citocromos de la cadena respiratoria), NRF₂, mtTFA, mtTFB₁, mtTFB₂, COLBP (proteína de enlace L de la citocromo oxidasa).

Esta regulación indudablemente está mediada por la misma célula y la misma mitocondria controlada por los requerimientos energéticos del tejido; es por eso que se propone la regulación transcripcional y replicacional a la concentración de ATP. Es por eso que se requiere de señalizaciones intergenómicas, nucleares y mitocondriales correspondientes al fenotipo y genotipo mitocondrial. (Carreño Márquez 2000)

5.4 TRADUCCIÓN

En cuanto la traducción mitocondrial en general se sabe poco; ésta se realiza dentro de los ribosomas mitocondriales gracias a muchos factores codificados en el núcleo. Como ya se ha mencionado los mRNA's de mamífero carecen de secuencias líder que faciliten la unión al mito-ribosoma y carecen de *cap* por lo que los mRNA's mitocondriales presentan baja eficiencia traduccional. El único factor de iniciación de la traducción identificando hasta la fecha es el mtIF-2. (Liao y Spremulli, 1990). Participan en la elongación tres factores proteicos: mtEF-Tu (mapeado en el cromosoma 16q11.2), mtEF-Ts y mtEF-G. Las secuencias de los tRNA's mitocondriales en mamíferos son diferentes a los citoplasmáticos por el hecho de que carecen de varios de los llamados nucleótidos poco comunes. También difieren en las dimensiones del tallo y bucles y existe evidencia de que algunas mutaciones puntuales en los tRNA afectan el proceso de aminoacilación. Se ha encontrado que los codones que se codifican para traducir el rRNA nuclear no son los mismos para traducir el rRNA mitocondrial (Vázquez 2002) es decir, el patrón de reconocimiento es diferente, el codon de UGA en lugar de la señal de término codifica para triptófano, AUA codifica para metionina y CTn (n= cualquier nucleótido) para leucina en lugar de treonina. Esto se conoce como el mecanismo "dos de tres" que significa que solo los dos primeros nucleótidos definen que aminoácido debe tomar el tRNA, el tercero ya no es importante.

	U	C	A	G	
U	UUU	UCU	UAU	UGU	U
	UUC <i>phe</i>	UCC	UAC <i>tyr</i>	UGC <i>cys</i>	C
	UUA <i>leu</i>	UCA <i>ser</i>	UAA <i>Stop</i>	UGA <i>trp</i>	A
	UUG	UCG	UAG <i>Stop</i>	UGG <i>trp</i>	G
C	CUU	CCU	CAU <i>his</i>	CGU	U
	CUC <i>leu</i>	CCC <i>pro</i>	CAC	CGC	C
	CUA	CCA	CAA <i>gln</i>	CGA <i>arg</i>	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU <i>ile</i>	ACU	AAU <i>asn</i>	AGU <i>ser</i>	U
	AUC <i>ile</i>	ACC <i>thr</i>	AAC	AGC	C
	AUA <i>met</i>	ACA	AAA <i>lys</i>	AGA <i>Stop</i>	A
	AUG <i>met</i>	ACG	AAG	AGG <i>Stop</i>	G
G	GUU	GCU	GAU <i>asp</i>	GGU	U
	GUC <i>val</i>	GCC <i>ala</i>	GAC	GGC	C
	GUA	GCA	GAA <i>glu</i>	GGA <i>gly</i>	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G

Figura 2.4.0 Código mitocondrial. (www.mun.ca/biologia/scarr/mtDNA_code.htm)

En resumen tenemos que las proteínas codificadas en el mtDNA son:

Complejo	No. de subunidades	Subunidades codificadas en mtDNA
I	>25	7
II	4	0
III	9	1
IV	13	3
V	12	2

Se acepta que el control de la traducción representa el tercer nivel de regulación de la expresión genética mitocondrial, en particular en la eficiencia de la traducción. Se ha sugerido que la recuperación de una cadena respiratoria funcional se puede deber a ésta eficiencia (Hanna y Nelson 1999).

Es por eso que se sugiere un mecanismo de señalizaciones bioquímicas trans-genómicas que se regulan entre sí y así pueden dar una eficiencia en los procesos del mtDNA y de la cadena respiratoria en general; traducándose en una efectiva formación y almacenaje de energía en forma de ATP y por consecuencia una eficacia en el funcionamiento celular y del organismo en general. A continuación se presenta el esquema general de regulación inter-genómica.

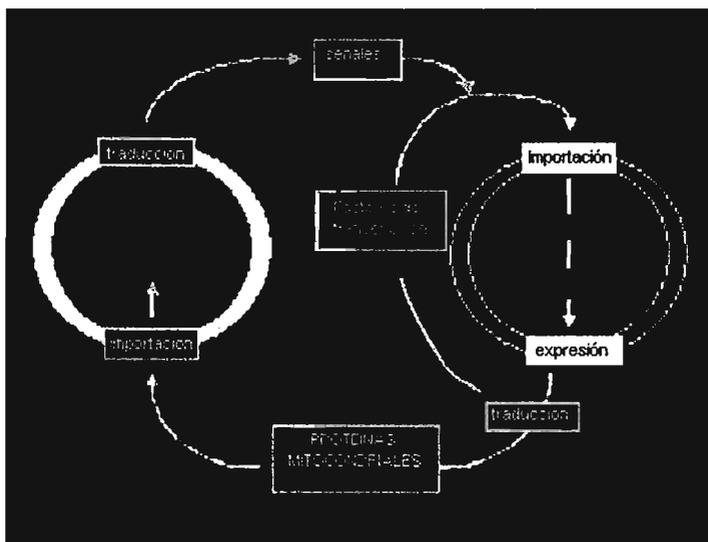


Figura 2.4.1 Esquema general de la regulación trans-genómica. (Carreño 2003)

5.5 TIPO DE HERENCIA Y TRANSMISIÓN DE HETEROPLASMA

Durante las primeras investigaciones relacionadas al tipo de herencia mitocondrial llamó mucho la atención el hecho de que las alteraciones en el mtDNA se heredaran de forma atípica, luego se corroboró que es debido a que se segregan por vía materna. Si bien el espermatozoide contiene mitocondrias en la parte media de cuerpo, en la fecundación solo entra la cabeza donde se localiza la información genética así, las mitocondrias que heredan los humanos son provenientes del oocito, por lo que el mtDNA solo se hereda por vía materna. Así, los hombres afectados con mtDNA mutado no pueden transmitir su defecto genético (Jenuth 1996).

Existen de 2 a 10 copias de mtDNA por mitocondria y de 100 a 10 000 mitocondrias por célula dependiendo del tejido que se trate. Las copias del genoma mitocondrial pueden ser iguales en un sujeto (homoplasma) o ser diferentes (heteroplasma) en una fracción variable. Esta variación puede presentarse en células de diferentes tejidos o del mismo tejido en un solo individuo. (Lewin 1996). Una mujer con heteroplasma presenta un patrón de herencia altamente variable y parte de su descendencia puede ser sana y parte alterada, en consecuencia los padecimientos que herede no siguen las leyes mendelianas de la herencia.

Se propone que durante el desarrollo de la línea germinal femenina existe una reducción y una amplificación en el mecanismo denominado "cuello de botella". En este se explica que el número de moléculas de mtDNA en cada ovocito se reduce dramáticamente durante la división celular en una especie de "dilución" antes de la subsiguiente replicación hasta alcanzar un número final de cerca de 100 000 en cada ovocito maduro; esto causa las principales diferencias en heteroplasma entre los ovocitos individuales. (Chen 1995):

Gracias a diversos estudios se ha podido dilucidar que la mayor variación entre la descendencia de una mujer se presenta en sus ovocitos primarios durante la embriogénesis temprana en donde esta etapa resulta crucial en la determinación de heteroplasma heredada (Jenuth 1996).

Otra variación se encuentra en la relación entre el nivel de mtDNA mutado en una mujer con una mutación patogénica en su mtDNA y el riesgo de que su descendencia esté afectada, al menos para algunas mutaciones (Chinnery 1998). Hay proporción significativa de mujeres con mutaciones en su mtDNA que al parecer no transmiten el defecto a su descendencia (Montiel 2002).

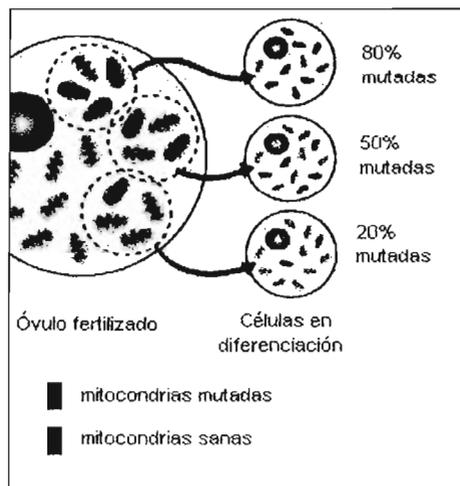


Figura 2.5.0 Transmisión de heteroplasma. (modificada de mdausa.org/publications/mitochondrial_myopathies.htm)

5.6 EFECTO UMBRAL

La proporción mínima de mtDNA mutado necesaria para alterar el metabolismo oxidativo a un nivel suficiente que produzca la disfunción de un órgano o tejido se conoce como efecto umbral y depende de los requerimientos energéticos de cada tejido. El corazón, cerebro, músculo esquelético tienen grandes demandas de energía oxidativa y por tanto bajos umbrales. Esta variabilidad es parte de la explicación de la variación en los fenotipos clínicos en los pacientes con el mismo defecto de mtDNA (Castro-Gago 2000).

El mtDNA mutado puede segregarse en diferentes etapas durante la embriogénesis, durante la diferenciación celular y por la misma división celular y replicación en el mtDNA; el efecto de tales procesos puede ser amplificado si existe un mecanismo de selección en contra o a favor del mtDNA mutado. Por lo general los genomas mutados se pierden en tejidos de elevada división celular como la médula ósea. Por el contrario células de diferenciación terminal como neuronas y músculos acumulan mtDNA mutado a través del tiempo lo que puede contribuir con la manifestación tardía y poca manifestación patológica en algunos pacientes con alteraciones en mtDNA (Montiel 2002).

VI. PATOLOGÍA MITOCONDRIAL

6.1 ALTERACIONES

Como ya se ha mencionado el genoma mitocondrial, es un genoma circular de 16 569 pb. Éste reducido tamaño hace que los genes que carecen de intrones se encuentren codificados en una alta densidad. La gran cantidad de información codificada en ambas cadenas hace que cualquier tipo de alteración (tanto mutaciones puntuales, como deleciones o inserciones de secuencias) tenga más probabilidad de afectar a un gen. Además, el hecho de que se considere un DNA “desnudo” o sea, a la falta de proteínas protectoras histonas dentro del mtDNA contribuye a que las mutaciones se conserven y se transmitan. En condiciones normales esta susceptibilidad mitocondrial se contrarresta al considerar que una célula somática tiene varios miles de mitocondrias y a la heteroplasmia.

El mtDNA tiene una tasa de mutación 17 veces mayor a la del genoma nuclear. La fracción hipervariable o D-loop dentro del mtDNA es la parte del genoma que muta con mayor frecuencia (Wallace DC 1992). La diferencia en esta tasa de mutación entre el mtDNA y el nDNA parece estar relacionada con la elevada incidencia de daño oxidativo que se estima es 10 veces mayor al nDNA. Siendo la mitocondria el organelo encargado de realizar la fosforilación oxidativa así como en la integración de casi todas las rutas metabólicas, el stress oxidativo es una de las principales fuentes de mutación en el mtDNA (como se menciona en el capítulo 1: stress oxidativo) y es la razón por la cual una mutación específica en la mayoría del mtDNA's de un tejido con alta demanda energética produce enfermedad es decir, una patología mitocondrial.

Las proteínas codificadas por el mtDNA representan solo el 10% de todas las proteínas mitocondriales. La mayoría de las proteínas mitocondriales son codificadas en el nDNA sintetizadas en el citoplasma y transportadas a la mitocondria y su respectivo ensamblaje para realizar su función.

El doble control génico así como la complejidad de los eventos posteriores a la traducción requeridas para el transporte y correcto ensamblaje de las proteínas sintetizadas en el citoplasma explican porqué la herencia de las enfermedades mitocondriales puede ser debida a diferentes factores.(Schatz 1991). Debido a la gran cantidad de procesos que influyen en un óptimo funcionamiento de las rutas metabólicas y en general al funcionamiento de las células, en todas estas etapas existe la propensión al error y la consecuencia falla de uno o varios de estos mecanismos.

La primera enfermedad clasificada fue en 1962 en una mujer con hipermetabolismo (Luft 1962). Para 1980 los progresos en este campo fueron tales que se hizo una clasificación bioquímica de las enfermedades ya que se describieron muchas mutaciones puntuales asociadas a enfermedades mitocondriales, esta clasificación es :

- Defectos en el transporte
- Defectos en la utilización del sustrato
- Defectos en el ciclo de Krebs
- Defectos en la cadena respiratoria
- Defectos en el acoplamiento oxidación-fosforilación
- Defectos en la ATP sintetaza
- Alteraciones en el nDNA

6.1.1 Alteraciones en nDNA

1. Incluyen los defectos en el transporte de sustrato que alteran los mecanismos de transporte activo necesarios para introducir metabolitos del citoplasma a la mitocondria y viceversa. Por ejemplo: alteraciones en el ciclo de la carnitina, en los acarreadores, transportadores y translocadores. Estas alteraciones pueden ser cualitativas o cuantitativas (Graham 1997).
2. Dentro de los defectos en la utilización de sustrato se encuentran las alteraciones en enzimas de las vías metabólicas necesarias para el procesamiento de sustratos a AcetilCoA, como el complejo de la β -oxidación o de la piruvato deshidrogenasa. Se ha descrito que este tipo de mutaciones tiene un tipo de herencia autosómica recesiva (Devivo 1996)
3. Los defectos en el ciclo de Krebs son raros y aislados, el más común es la deficiencia de fumarasa y aconitasa que produce encefalomiopatía graves (Haller 1991)

6.1.2 Alteraciones en nDNA ó mtDNA

4. Estas alteraciones comprenden la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa. Como se ha descrito con anterioridad cada complejo dentro de la cadena respiratoria esta compuesto por ninguna o varias subunidades traducidas tanto mitocondria como en el núcleo; esto da defectos en los complejos que se han caracterizado con varios síntomas entre los que destacan: miopatías, ataxia, sordera, ceguera, demencia, encefalomiopatías, convulsiones, intolerancia al ejercicio, coma, vómito, hipotonía. (Morgan 1988)

Los defectos patogénicos en el mtDNA afectan al menos a 1 de cada 15000 adultos de la población (Chinnery 2000) y 1 de cada 8000 incluyendo niños. Se caracterizan porque todas son producidas por la deficiencia en la producción de energía es decir, de ATP. Las moléculas mutadas tienen más eficiencia en replicación ya que predominan y se conservan por su pequeño tamaño. Éstas se caracterizan por ser de difícil diagnóstico y afectan en mayor proporción a los infantes. Así de 100% de niños enfermos el 36% presentan la enfermedad a edades menores de un año, 44% de 1 a 2 años y el 20% en edades mayores a 2 años (Montoya 2003). Las patologías mitocondriales se pueden deber a mutaciones puntuales, deleciones o depleciones en el genoma mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales son la mayoría casos de encefalomiopatías y son muy variables tanto a nivel clínico como genético. El mismo síndrome clínico puede ser causado por diferentes defectos genéticos (genes nucleares o mitocondriales), pero el mismo defecto genético puede presentarse en una diversidad de síntomas. Por lo general, los adultos que presentan enfermedad mitocondrial tienen defectos en mtDNA mientras que en los niños es más probable que tengan defectos en mtDNA ó nDNA.

Como se muestra en la siguiente figura 3.0, el patrón de herencia mitocondrial es materna. La madre transmite la enfermedad a toda su progenie y las hijas a su vez a la suya; mientras que el varón no transmite la enfermedad a su descendencia. Se han encontrado casos en diversas investigaciones aisladas que el patrón de herencia puede ser paterna; no se sabe mucho al respecto.

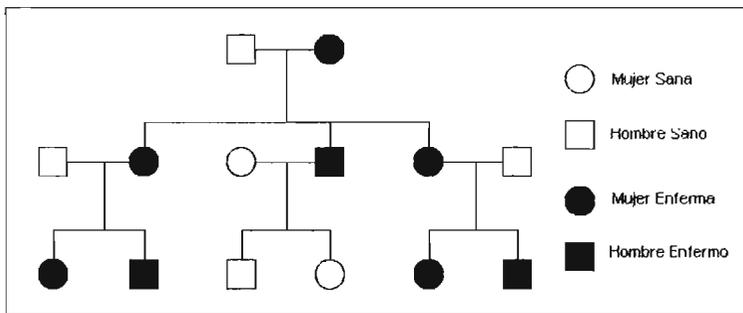


Figura 3.0 Pedigree de enfermedades mitocondriales

6.2 MUTACIONES PUNTUALES

En la última década se han catalogado cerca de 100 mutaciones puntuales. Una de las más comunes son encontrar familias con LHON (Neuropatía Óptica hereditaria de Leber), las cuales usualmente se presentan en hombres adultos entre los 18 y 30 años de edad . Se caracteriza por daño subagudo en la visión bilateral causada por una atrofia óptica bilateral severa (Wallace 1988) (Howell 1991). Los síntomas asociados son hiperreflexia, ataxia cerebral, neuropatía periférica o anomalíadas cardíacas. Este síndrome está asociado con 12 mutaciones siendo las 3 principales por ser las cuales presentan la pérdida de la visión: G3460A en ND1, G11778A en ND4 y T14484C en ND6 que codifican para proteínas de subunidades del complejo I. Las otras mutaciones están asociadas con citocromo b y COX1 (Riordan-Eva 1995).

El NARP (neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa) esta asociado con la mutación T8993G en el gen de la subunidad 6 de la ATPasa y se caracteriza por una alteración multisistémica que incluye retardo en el desarrollo, ataxia, convulsiones, debilidad en extremidades superiores (Holt 1990)

El síndrome de Leigh de herencia materna (MILS) es la expresión clínica más severa de NARP. Se presenta en la infancia con retardo en el desarrollo, hipotonía, ataxia. Hace algunos años se creía que la diferencia entre los síntomas de MILS y NERF se debía a la cantidad de heteroplasmía y por ende al porcentaje de mtDNA mutado por tejido; en la actualidad esto no se acepta del todo ya que se han presentado casos en los que hermanos heteroplasmicos con el mismo porcentaje de mutación no presentan los mismos síntomas clínicos por lo que se asocian con otros factores (Santonelli 1993).

En el sitio A8344G en tRNA^{LYS} se encuentra otra mutación a la cual se le atribuye el síndrome MERRF (Shoffner 1990). Los síntomas mas frecuentes son contracciones musculares, ataques de epilepsia, ataxia cerebral y Miopatía, también pueden presentar otros síntomas como demencia, pérdida del oído, neuropatía. Se presenta generalmente en la infancia y se asocia a otras dos mutaciones en la posición 8356 (Silvestri 1992) y otra en 8363 (Ozawa 1997).

La enfermedad mitocondrial más común es el MELAS. Se ha observado que la actividad del complejo I está particularmente reducida. Los pacientes con éste síndrome tienen la mutación en A3243G en tRNA^{LEU (UUR)} y otros presentan mutaciones en 3771 del mismo gen (Goto 1991). Otras pueden ser: 3252 (Morten 1993), 3271, (Kobayashi 1987) y 3291 (Goto 1999)

6.3 DELECCIONES

Las enfermedades producidas por deleciones se deben ala pérdida de varios cientos de pares de bases. Una de éstas enfermedades se le conoce como CPEO y se caracteriza por presentar a los pacientes Oftalmoplejía externa progresiva, ptosis, debilidad severa variable en los miembros superiores. Se presenta en la adolescencia y su curso es progresivamente lento. Se diagnostica con una biopsia en músculo y existe una deleción de aproximadamente 4972 pb en donde se afectan 12 genes (Moraes 1987).

Otro síndrome asociado con pérdidas en el mtDNA es el síndrome de Kearns-Sayre (SKS) y está definido por 3 características constantes: aparece a los 20 años de edad, presenta Oftalmoplejía externa progresiva y retinopatía pigmentaria. Además puede acompañarse de problemas cardiacos, síndrome cerebral y una concentración de proteína mayor a 100 mg/dL en el fluido cerebro-espinal. El pronóstico para los pacientes que sufren esta enfermedad es poco alentadora ya que es progresivamente lenta y la mayoría de ellos muere a la tercera o cuarta década de vida (Zeviani 1990).

El síndrome de Pearson también se encuentra en este tipo de alteraciones. Se presenta en la infancia y se caracteriza por una anemia refractaria sideroblática, vacuolización de los precursores de la médula y alteración exócrina pancreática. No llegan a la adolescencia (Larsson NG 1990).

MINGIE (encefalomiopatía y alteración mioneurogastrointestinal) es otro síndrome que presenta en los pacientes Oftalmoplejía externa progresiva, debilidad de las extremidades, neuropatía periférica, gastroenteropatía con diarrea crónica y pseudo obstrucción intestinal, leucodistrofia y acidosis láctica.

Otra alteración ligada a la delección de parte de mtDNA se refiere al envejecimiento ya que hay una región de 4977 pb que se pierde con mayor frecuencia en personas de tercera edad analizadas y que asociada al estrés oxidativo y mal funcionamiento de receptores y funciones mitocondriales (Wallace DC, 1997).

Como ya se mencionó anteriormente, el estrés oxidativo y el envejecimiento son factores muy importantes en la promoción de delecciones. Así, en el envejecimiento es común encontrar una delección de 49997 bp en el mtDNA dando como resultado muchas alteraciones en la cadena respiratoria y fosforilación oxidativa. El esquema se muestra a continuación:

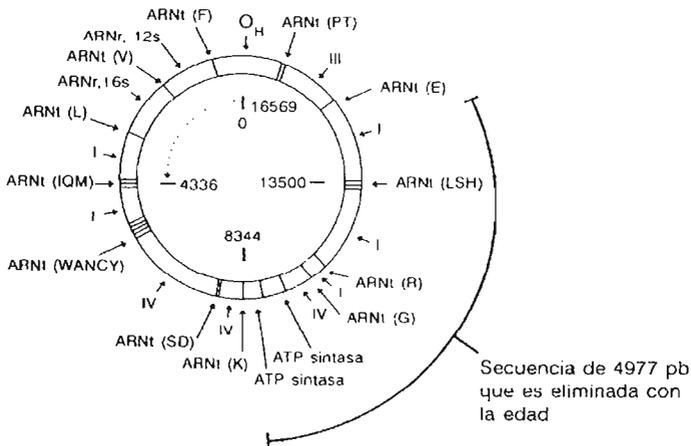


Figura 3.1 Delección en mtDNA, común por envejecimiento. (Esquema modificado de Wallace 1997)

6.4 DEPLECIÓN

Estas alteraciones se caracterizan por la disminución del número de copias de mtDNA por mitocondria y por ende por célula. Esto se puede deber a diversos factores que no se han descrito del todo incluyendo factores nucleares como se ha descrito en la alteración de los genes de desoxiguanosina kinasa (dGK) y timidina kinasa (TK₂) en la mitocondria lo que al parecer produce un disminución y pérdida de mtDNA. Los síntomas se pueden producir desde el nacimiento hasta la adolescencia siendo antes de los dos años la edad más común de presentar este tipo de enfermedad. Se localiza en 2/3 de los casos músculo y 1/3 de casos en hígado. Se han caracterizado 3 mutaciones que se asocian a esta enfermedad donde 2 se encuentran en secuencias de bases conservadas del D-loop; región encargada del control de la replicación , transcripción del mtDNA. Estas mutaciones son: T119C y T408A. También se han descrito disfunciones en citocromos (Barthélémy et al 2002). Como se ha podido observar las enfermedades producidas por alteraciones en el mtDNA se deben a muchos factores tanto nucleares, bioquímicos o mitocondriales y en general se producen los mismos síntomas con diferencia de intensidad dependiendo del porcentaje de heteroplasmia y del tejido afectado. El problema que se presenta en la actualidad es que algunas enfermedades no dependen del porcentaje de heteroplasmia ya que un miembro de familia con el mismo porcentaje que otro presenta la enfermedad. Este como otros problemas se plantean en la patología mitocondrial.

En el siguiente esquema se muestran los lugares de las mutaciones más comunes dentro de las enfermedades mitocondriales:

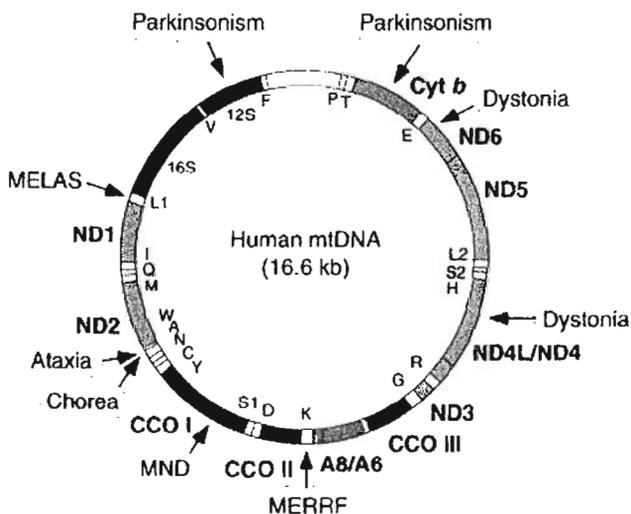


Figura 3.2 Enfermedades mitocondriales.

En el siguiente cuadro se resumen las mutaciones en mtDNA:

DNA nuclear

Afectan cadena respiratoria

Síndrome de Leigh: deficiencia en el complejo I (mutaciones en subunidad A/DQ cromosoma 5), en complejo II (mutaciones en Fp subunidad SDH crom.

5)

Atrofia óptica y ataxia: complejo II (mutaciones en subunidad Fp SDH crom.

5)

Afectan ensamblaje de subunidades de cadena respiratoria

S. de Leigh: complejo IV (mutaciones en gene codifica SURF 1 crom. 9q1

Cardioencefalomiopatía: complejo IV (mutaciones en gene que codifica SCO2)

Deleciones múltiples en mtDNA

Oftalmoplejía externa autosomal dominante: cromosomas 10q24, 3p14-21, 4q)

Encefalomiopatía mitocondrial neuro-gastrointestinal: deficiencia en timidina fosforilasa (mutaciones en el gen específico en cromosoma 22q13.32-qter)

Defectos en mtDNA

Reordenaciones (deleciones y duplicaciones)

CPEO, S. de Kearns-Sayre, diabetes, sordera

Mutaciones puntuales

Genes que codifican proteínas:

LHON : G11778A; T14484C; G3460A

NARP/Síndrome de Leigh : T8993G/C

Intolerancia al ejercicio y mioglobinuria: mutaciones en citocromo b

Genes de tRNAs

MELAS: A3243G; T3271C; A3251G

MERFF: A8344G; T8356C

CPEO: A3243G; T4274C

Miopatía: T14709C; A12320G

Cardiomiopatía: A3243G; A4269G

Diabetes y sordera: A3243G; C12258A

Encefalomiopatía: G1606A; T10010C

Sordera sensoneural sin síndrome: A7445G

Genes de rRNA

Sordera no sindrómica inducida por aminoglicosido: A1555G

(Montiel 2002)

VII. mtDNA Y EVOLUCIÓN HUMANA

7.1 TEORIAS ACERCA DEL ORIGEN DEL *Homo sapiens*

Los humanos hemos buscado nuestros orígenes durante casi todo el tiempo de la existencia misma. Actualmente existen diversas ramas del conocimiento que tienen líneas de investigación en donde se trata de dilucidar lo que ocurrió en aquellos tiempos; antropólogos, historiadores, paleontólogos, arqueólogos, lingüistas y genetistas entre otros desarrollan nuevas teorías que pueden explicar éste hecho desde su punto de vista aunque aún ninguna teoría a sido comprobada del todo. A la rama de la antropología que se encarga de la búsqueda y el estudio de fósiles antiguos y su análisis para deducir el origen del hombre moderno se le llama: paleo-antropología.

En 1859 Darwin publicó el libro "El origen de las especies" donde resume años de investigación acerca de la evolución biológica y postula diferentes puntos que hoy son aceptados y otros refutados. Entre muchas cosas postuló la selección natural como factor determinante en el proceso evolutivo; hecho que hoy se acepta. Desde los tiempos de Darwin la ciencia y la tecnología han avanzado mucho lo que permite la remodelación y recomposición de nuevas teorías, tal es el caso de teoría Shift (Darwin papers 2003) que engloba el conocimiento de varias disciplinas como biología, química y medicina, y resume el proceso evolutivo en cuatro factores principales:

1. Procesos selectivos
2. Intermediarios hormonales
3. Procesos heterocronicos
4. Factores ambientales

Estos factores indiscutiblemente juegan un papel fundamental en la evolución de las especies y por ende en su adaptación, así se explica el origen de la especie *Homo sapiens sapiens*. Dentro de los procesos selectivos hay que mencionar a la selección natural darwiniana, en donde se postula que la naturaleza elimina a los individuos incapaces de sobrevivir (débiles) y a los no adaptados a reproducirse (Darwin 1871). Otro proceso selectivo es el sexual en donde la posibilidad del macho al elegir "a la mejor hembra" para reproducirse, así como a la hembra elegir a su macho, constituye un factor determinante ya que la progenie proviene de la mejor hembra y el mejor macho; discriminando especies no adaptadas (Miller 1994, 2000). En cuanto a los intermediarios hormonales ésta se refiere a la adaptación del individuo en su medio una vez que ya sobrevivió a los procesos de selección anterior; es decir relaciona al individuo con su hábitat por adaptaciones bioquímicas y fisiológicas (Hassler 1992).

Los procesos heterocronicos son aquellos que incluyen el desarrollo y maduración del individuo para su posterior reproducción ya que si no ocurre este desarrollo integral no se puede conservar la especie, no se adapta y no se reproduce (Gould 1977).

Los factores ambientales influyen en cada una de las etapas anteriores significativamente. En cuanto "ambiente" significa tanto aspectos físicos (Geschwind and Galaburda 1987) como sociales; a la idiosincrasia de cada especie e individuo ya que el medio dicta la vía de adaptación que la evolución tiene que ir tomando para conservar a la especie.

Todo esto se ha podido observar a través del tiempo gracias al récord de fósiles que los investigadores han hallado a medida que el tiempo y la ciencia avanzan, en donde se relaciona una especie y otra contra el tiempo que los separa de un ancestro común. En cuanto a la evolución del *Homo sapiens* en realidad no se sabe mucho y no se ha llegado a una conclusión, ni dentro de la genética ni dentro la paleo-antropología.

El descubrimiento de fósiles antiguos llevó a los investigadores a formularse diferentes hipótesis acerca de la evolución de nuestra especie, ésta tomó más fuerza a partir del siglo XX en donde se propuso que las características físicas y biológicas de los hombres modernos empezaron a evolucionar hace 5 millones de años. Al *Homo sapiens* se le clasifica dentro de los Primates ya que comparten similitudes tanto físicas como de comportamiento. Se incluyen 280 diferentes especies, en donde se encuentran mamíferos como: lemures, orangutanes, chimpancés, simios, etc. Algunas de las características que se comparten son: capacidad de adaptación a un clima específico, visión estereoscópica, el sentido del olfato, el tamaño del cerebro (aproximadamente), similitud morfológica en manos y pies, viven en sociedades complejas y con algunos compartimos el 98% de información genética

Para poder entender el origen del *Homo sapiens* es fácil inferir que tendremos que tener un ancestro común con los demás Primates. Así siguiendo adelante en la taxonomía el suborden es Antropoidea en donde se encuentran chimpancés, simios y humanos; como la similitud entre los simios y los humanos es más cercana que con respecto a los chimpanzees juntos nos encontramos dentro de la superfamilia Hominoidea.

Los fósiles de antropoides más antiguos encontrados se sitúan entre 50 y 33 millones de años. La vida de los antropoides se divide en dos épocas:

1. Del viejo mundo. denominados *catarrhine* encontrados en Africa y Asia
2. Del nuevo mundo. denominados *platyrrhine* encontrados en América

Esto se ha podido deducir de un fósil de primate del viejo mundo encontrado en Egipto en una región al norte llamada Al Fayyun . Se cree que durante la época del mioceno (entre 24 y 5 millones de años antes de la actualidad) los antropoides evolucionaron dando como resultado la especie *Proconsul* el cual se dispersó a través de Africa llegando a Asia y a Europa.

Especies de *Proconsul* evolucionaron en *Afropithecus* el cual también se dispersó dando como resultado tres géneros: *Kenyapithecus* en Africa hace 18 millones de años, *Griphopithecus* en Asia hace 15 millones de años y *Dryopihecus* en Europa hace 12 millones de años. En realidad se han encontrado fósiles de cada uno de ellos pero no se ha podido comprobar de cual género proviene el ancestro común entre los simios africanos modernos y el humano.

Otras especies que se ha encontrado son *Australopithecus*, *Ardipithecus* y *Paranthropus* de los que se tiene referencia hace 5 millones de años. Sus características son más parecidas al *Homo sapiens* ya que son los primeros fósiles de los que se tiene evidencias de bipedalismo. Se han encontrado fósiles de *Australopithecus* en Etiopía, Tanzania, Kenya, Sudáfrica y Chad.

Se han caracterizado varias especies, en el siguiente cuadro se presentan:

Especie de Australopithecus	Año de descubrimiento	Lugar de descubrimiento	Millones de años antes de la actualidad
Anamesis	1965 y 1994	Kanapoi, Kenya	4.2 y 3.9
Afarensis	1974	Hadar, Etiopia	4.4
Africanus	1924	Taung, Sudáfrica	3.5-2.5
Más recientes:			
Aethiopicus	1985	Turkuana, Kenya	2.7
Boisei	1956	Tanzania, Etiopia	2.3-1.2
Robustus	1938	Transvaal	1.8-1.3

NGS

Las características de los *Australopithecus* y por lo que se les confiere la etapa de transición entre los géneros *Kenyapithecus*, *Griphopithecus* y *Dryopithecus* al *Homo* son: bípedos, tienen caninos pequeños, la forma craneal de 390 a 550 cu cm de espacio para el cerebro, su peso se estima entre 27 a 49 kg, median de 1.1 a 1.5 cm, tienen dimorfismo sexual, dedos largos, entre otras. El tamaño difiere según la especie y otro hallazgo importante que confirma el bipedalismo de *A. afarensis* son unas huellas ancestrales situadas hace 3.6 millones de años descubiertas en Laetoli,

Kenya por un paleo-antropólogo inglés llamado Mary Leakey.



Figura 4.1.0 Huellas de *A. afarensis*

Los *Australopithecus aethiopicus*, *boisei*, *robustus* tienen características más parecidas a los *Homo sapiens* así, algunos paleo-antropólogos los definen en otro género llamado *Paranthropus*. Aún con los anteriores hallazgos no se ha podido confirmar si los *Homo sapiens* provienen de los *Paranthropus* o de los *Australopithecus*, de hecho hay diferentes teorías en las que se cree que los *Paranthropus* no provienen de los *Australopithecus* sino que evolucionaron de forma paralela.

El género *Homo* se ha descrito hace 2 millones de años, su evolución se divide en tres etapas; la tardía (hace 2 millones de años); la media (de 2 a 1.8 millones de años) y la reciente (hace 1.6 millones de años). Existe mucha controversia acerca de este hecho. Los fósiles encontrados en 1960 en Tanzania contaban con 590 a 690 cm³ de diámetro craneal lo que significaba que no pertenecían al género *australopithecus* (Olduvai). Con estos restos denominaron un nuevo género llamado *Homo habilis* por su relación con el uso de artefactos o herramientas. Muchos científicos cuestionan este hecho ya que se tiene record de la utilización de herramientas por otras especies antes de este tiempo, por lo que dicen que no es suficiente hecho para definir otro género.

En el siguiente esquema se observan las características físicas de estas tres diferentes especies :



Figura 4.1.2 Diferencias físicas entre *Australopithecus africanus* (en el centro), *Homo erectus* (izquierda) y *Homo sapiens* (derecha).

Las especies de *Homo* del periodo tardío son: *H habilis* (encontrado con artefactos y herramientas) y *H rudolfensis*; dentro del periodo medio se distinguen *H erectus*, *H heidelbergensis*, *H ergaster*. También existe debate en cuanto a éste hecho es decir, no se ha podido comprobar si cada especie de *Homo* del periodo medio proviene uno del otro o evolucionaron de forma paralela. El dato preciso de la primera existencia de *Homo sapiens* no se ha encontrado, ni una especie de transición entre *Homo heidelbergensis* y el *Homo sapiens*. Ya que los fósiles encontrados son solo piezas de un rompecabezas y en realidad no hay nada en concreto, se han descrito tres hipótesis que explican la evolución del género *Homo* (Pilbeam 1970):

7.1.1 Hipótesis Savana

El clima global se enfrió y por ende se volvió más seco durante el fin de la época Mioceno que ocurrió entre 8 y 5 millones de años. De acuerdo con la hipótesis savana éstos climas destruyeron y cambiaron radicalmente los bosques Africanos, así los simios que vivían del lado oeste quedaron separados del resto de las especies en donde todavía subsistían parte de los bosques. Los simios de oeste se tuvieron que adaptar a un nuevo entorno; grandes extensiones de savana. Esto favoreció el desarrollo de especies en tierra y no en la copa de la árboles, así es como los simios terrestres mejoraron su capacidad de organización para defender territorio y en la búsqueda de alimento.

Sus habilidades pudieron desarrollarse en tal modo que les permitió descubrir el uso de herramientas y que posteriormente esto se haya reflejado en el desarrollo de cerebros más grandes y complejos.

Crítica: En 1994 un científico Francés descubrió fósiles de *Australopithecus* en donde se puede inferir que el clima entre Africa del este no era muy diferente al Africa del oeste. También se ha descrito que grandes extensiones de savana no se produjeron en Africa si no hasta hace 2 millones de años.

7.1.2 Hipótesis woodland- mosaic

Ésta es muy parecida a la hipótesis anterior solo que aquí se sugiere que los simios evolucionaron en un ambiente rico en árboles y pasto abundante; esto favoreció el cambio de la vida en árboles a tierra y así adaptarse al bipedalismo y la posibilidad de encontrar mayor alimento.

7.1.3 Hipótesis variable

Propone que los *australopithecus* y todas las especies de Primates que vivieron en ese tiempo experimentaron un serie de cambios ambientales; abundancia de bosques, savanas, regiones secas etc. Por lo que su adaptación contribuyó a las habilidades de sobrevivir en todas las circunstancias. Esto explicaría la habilidad del hombre actual a adaptarse en diferentes ambientes.

En 1896 en la Cueva Felhofer del Valle Neander, se descubrieron restos fósiles de un nuevo espécimen al que llamaron Neandertal y lo situaron hacía 200 000 años. Las características de esta nueva especie son : capacidad craneal de alrededor 1500 cu cm, posición erguida y contaban con una sociedad es decir, hay evidencias de que practicaban rituales además de sofisticadas herramientas de trabajo.

A pesar de estas similitudes los neandertales difieren con el *Homo sapiens* en : diferente proporción entre cráneo y cabeza, no tienen barbilla, grandes dientes, cerebros más largos, huesos más delgados y grandes músculos, grandes cuerpos y cortas piernas entre otras. Se han encontrado varios fósiles con estas características dispersados por Europa y Asia en donde se han situado entre 36 000 y 24000 años (por lo que se cree que migraron y algunas de estas características se encuentran en hombres modernos adaptados a climas fríos). Debido a las diferencias entre el *Homo sapiens* y los neandertales científicos han propuesto que no se trata de un género diferente y lo llaman *Homo neandertalensis*. (Hubin y Spur)



Figura 4.1.2 Diferencias craneales entre neandertal y *Homo sapiens*

Los estudios físicos que realizan los paleo-antropólogos para reconocer el año promedio dentro de los cuales se encuentran los fósiles varían, se utilizan técnicas como la de potasio-argón que se fundamenta en la variación del campo magnético de la tierra, ya que con el paso del tiempo se han invertido; por ejemplo en el proceso de la erupción de un volcán, el centro magnético más cercano a éste dictará la dirección de la lava.

Otro método bastante conocido es el de carbono 14 el que es confiable para fósiles entre 10 000 y 40 000 años BP; las muestras de hueso analizadas con carbono 14 pueden presentar datos falsos si la muestra es contaminada o si no cae dentro del rango establecido. El método de racemización se basa en la propiedad de las proteínas y algunas moléculas a migrar a través del tiempo dependiendo de ciertas condiciones como temperatura, así se puede inferir las condiciones climáticas que prevalecían cuando el fósil fue depositado. Otro método es el Uranio que es soluble en agua y se descompone en torium y protractirium los cuales no son solubles en agua; así cuando se mide la cantidad de uranio y sus productos se puede inferir el tiempo en el cual se degrado y así el tiempo en el que el fósil se formó. Aún contando con este tipo de métodos de identificación del tiempo existen muchos huecos en las diferentes eras de la evolución de la tierra y en particular en el Pleistoceno en donde se cree que el género Homo evolucionó. Otro tipo de indicios se encuentra en los récords de civilizaciones antiguas. (Ian Tattersall 1995).

Gracias a todos estos elementos se ha propuesto diferentes árboles evolutivos del *Homo sapiens* como el siguiente:

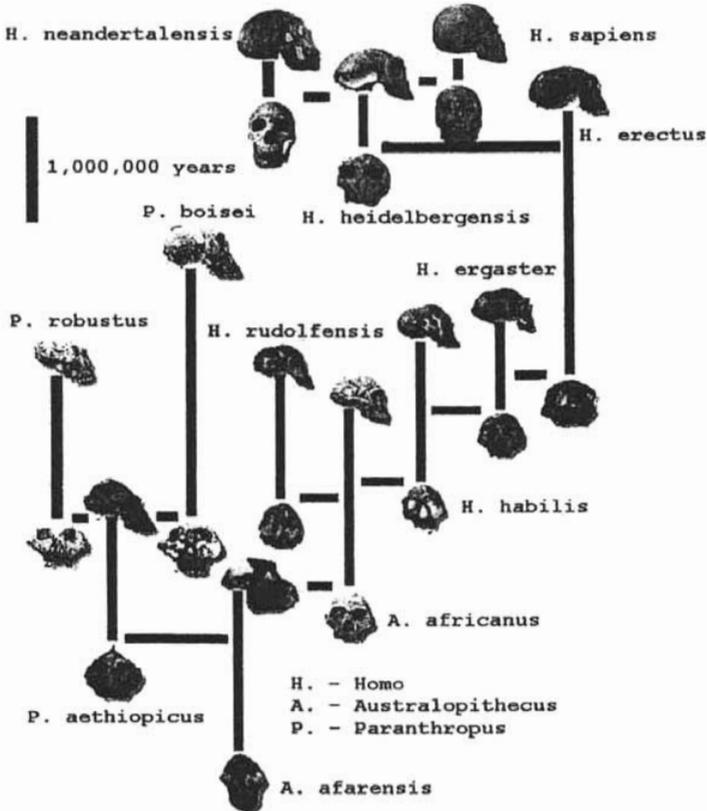


Figura 4.1.3 Esquema teórico del origen del *Homo sapiens*

7.2 mtDNA EN LA EVOLUCIÓN

Dentro de los procesos evolutivos también se ha modificado la genética a través del tiempo. Se ha estudiado tanto el DNA nuclear como el mtDNA para encontrar la relación entre la información genética del pasado y la actual (variación genética) y así poder encontrar nuestra línea evolutiva. En este tipo de estudios el mtDNA se analiza con mayor frecuencia por su sencillez en comparación al nDNA, ya que es un DNA circular de solo 16569 pares de bases y no está protegido con proteínas histonas, muta rápidamente (más que el nuclear) y no se recombina; esta cualidad en especial elimina la dificultad de analizar árboles genealógicos enteros y solo se enfoca en las madres e hijas dado a su particular tipo de herencia.

El mtDNA es más fácilmente aislado de huesos antiguos ya que en una célula existe solo un nDNA y varias copias de mtDNA por lo que se han analizado fósiles de neandertales y de hombres modernos. La secuencia analizada es una zona de 1 100 pb llamada D-loop que no codifica para ninguna proteína y tiene una tasa de mutación más alta que el resto de mtDNA.

El primer neandertal del cual se extrajo mtDNA fue del espécimen encontrado en la caverna Feldhofer en Alemania y revela una edad de 40 000 (Schmitz 2002). Investigadores examinaron dos secuencias de la zona D-loop y las compararon con cientos de secuencias (de la misma zona) en hombres vivos y descubrieron grandes diferencias entre el mtDNA neandertal y el nuestro (Krings 1999)



Figura 4.2.0 Fotografía hueso de fémur del neandertal de Felhofer. Museo Lande. Bonn, Alemania. (neandertal/modern.com/genetic2.htm)

En los más recientes estudios se encontró un promedio de 35.3 diferencias entre neandertales y humanos vivos, comparados con los 10.9 diferencias de estas secuencias en la actualidad; lo que pone a discusión si los neandertales han contribuido en nuestro pool génico.

Esto hace concluir que los neandertales son más antiguos en nuestra línea evolutiva sin que esto quiera decir que pertenecen a una especie distinta ya que la diferencia entre genomas no es mucho mayor que la encontrada en diferentes subespecies de chimpancés (Wolpoff 1999) (Relethford 2001).

Si los neandertales son nuestros ancestros, se espera encontrar la máxima relación entre éstos y los hombres europeos actuales que ahora ocupan su territorio. Pero el neandertal de Feldhofer no tiene estrecha relación con el moderno europeo por lo menos no más que con humanos de otra región; esto sugiere que al momento de migrar la secuencias de mtDNA fueron fluyendo y cambiando a través del tiempo (Relthford 2001)

Los análisis hechos al neandertal Feldhofer encuentran sustento en otra investigación hecha a un hueso fechado hace 42 000 BP, situado en el Paleolítico Medio encontrado en la cueva Vindija en Croacia (Krings 2000). Solo 9 diferencias separan al neandertal de Vindija y el de Feldhofer. Pero el mtDNA de estos dos neandertales muestran una diferencia de 35 con los humanos modernos. Otro estudio a un hueso de infante fechado hace 29 000 años encontrado en la cueva Mezmaiskaya al norte de Rusia muestra solo 12 diferencias con Feldhofer y 22 diferencias con los humanos de hoy en día. Por este tipo de estudios se estima que las líneas de evolución entre neandertales y humanos modernos se ramifican entre 365 000 y 853 000 años BP. Este tipo de estudio está basado en el rango de cambio del mtDNA a través del tiempo en la región D-loop; y es derivado de las mutaciones que se acumulan desde que las líneas de evolución entre humanos y chimpancés se separaron. Recientes descubrimientos en fósiles hacen estimar hace 6 millones de años ocurrió esta divergencia (Brunet 2002).

Uno de los problemas que se encuentra en la utilización de este método como único es que no es válido cuando dos líneas se inter-ramifican es decir, cuando se comparan líneas entre especies se buscan dos especies diferentes. Investigadores de mtDNA neandertal asumen que los neandertales y los humanos modernos no se inter-ramifican, lo que no está comprobado. Otra diferencia radica en la secuencia de la región control en donde algunos nucleótidos mutan lentamente y otros rápidamente llamados "hotspots" (Stoneking, 2000). Algunos de estos hotspots generan mutaciones somáticas y se presentan más comúnmente en ancianos por lo que no pasan a la siguiente generación (Nekhaeva 2002).

Y el problema mayor es que no hay un mtDNA control; del cual se pueda comparar (Lambert 2002). Aunado a factores demográficos como migraciones y expansiones en el tamaño de una población puede afectar el rango de cambio. La selección natural puede alterar también este rango en un locus específico afectando el rango donde las mutaciones fueron eliminadas o dispersadas en un pool génico (Jorde 1995). Secuencias de la región control tomadas de hombres modernos de la era Paleolítica en Inglaterra y Australia muestran que humanos modernos prehistóricos tienen secuencias de mtDNA que concuerdan con humanos vivos hace al menos 12500 años. (Adcock 2001).

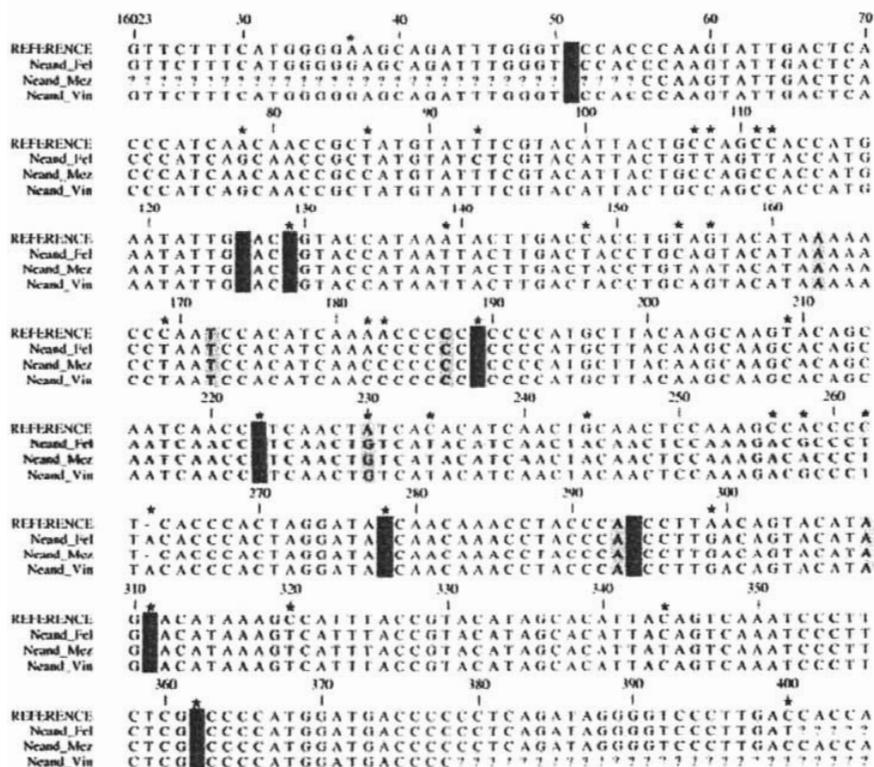


Figura 4.2.1 Alineación del mtDNA humano de referencia contra tres secuencias publicadas de neandertal. Neander_Fel (Neandertal Feldhofer), Neand_Mez (Neandertal Mezmaiskaya), Neand_Vin (Neandertal Vindija). Los asteriscos muestran posiciones en nucleotidos donde los neandertals muestran polimorfismos en comparación con la secuencia de referencia. Los colores muestran la región hipervariable I (HVRI) como se muestra: amarillo 2-3, naranja 3-4, rojo 4-5.

Además de las discrepancias ya mencionadas existen anomalías encontradas dentro del modelo “reloj molecular” de mtDNA utilizado en la mayoría de las investigaciones para conocer el tiempo en que la mutación ocurrió. Una de las discrepancias existe entre los rangos de mutación del mtDNA observados en las escalas de tiempo en la evolución (ej. Entre dos diferentes especies y entre una familia) (Parson TJ 1997).

Si el mayor rango de mutación observado en un pedigree se utilizara para calcular la edad de la hembra más reciente, ella habría vivido hace 6000 años. Esto demuestra que las escalas se pueden aplicar solo con diferentes relojes moleculares. Otras discrepancias en el reloj molecular de mtDNA son atribuidas a la heterogeneidad entre los sitios es decir, en las diferencias en el rango de mutación en diferentes posiciones del mtDNA (Hasegawa M 1993) preferencialmente en la zona hipervariable incluyendo los hotspots, variables de selección y hasta una posible recombinación. Estudios han sugerido la recombinación de mtDNA biparental lo que alteraría los resultados obtenidos hasta ahora; aunque la recombinación ocurriría en un porcentaje muy bajo si a través del tiempo ocurrió se podría interpretar erróneamente como heterogeneidad (y viceversa) alterando los árboles filogenéticos posibles (Wiuf C 2001). Con el paso del tiempo se han hecho muchas investigaciones para reducir el rango de error y dilucidar varias posibles respuestas.

El primer artículo publicado acerca del origen de hombre utilizando al mtDNA como marcador fue en 1987 por Cann. En él se analizaron 20 afro-americanos utilizando RFLP y Southern blot. Aunque este procedimiento haya permitido analizar solo del 2%-3% de la variación de la secuencia del mtDNA, reveló que entre el 60% y el 100% del mtDNA de la población del sur del Sahara (sub-Saharan) eran caracterizados por el corte de la enzima *HpaI* en el nucleótido 3592. En otros estudios se reveló que esta alteración se presenta en muy baja frecuencia fuera de Africa, mayormente en las poblaciones que históricamente se conoce tuvieron mezcla con Africanos (como Arabes e italianos del sur). Es así cuando se analizó mayor cantidad de mtDNA se observó que éste contenía el mayor número de polimorfismos que el mtDNA de cualquier otra parte del mundo, por lo tanto el más divergente filogenéticamente de acuerdo con la genética de poblaciones. Así surgió la hipótesis del origen Africano del hombre moderno u *Homo sapiens*. Y se le denominó: La Eva mitocondrial.

A partir de la publicación de éste artículo numerosos investigadores han rechazado o aceptado esta hipótesis. La realidad es que aún con técnicas de investigación más avanzadas (más de 1980) no se ha podido refutar la hipótesis y con la secuenciación completa del mtDNA se ha podido confirmar la relación directa entre el número y posición de las mutaciones y polimorfismos del mtDNA y el tiempo en el que se produjeron.

Ahora se secuencian mtDNA's de todo el mundo y se realizan árboles filogenéticos entre ellos para encontrar su relación y las posibles rutas que tomaron desde Africa para poblar todo el mundo.

7.3 MIGRACIONES

Los paleo-antropólogos que estudian este tipo de fenómeno siempre se encuentran en debate. Las diferencias recaen en el hecho en si la evolución del hombre se llevó acabo en un solo lugar dentro de Africa o dentro de una basta región de Africa y Eurasia; es decir las opiniones difieren en como grupos de hombres modernos en Africa pueden ser los ancestros de todos las especies antes de homo sapiens, las que eventualmente se extinguieron.(NGS)

Para todos aquellos que piensen que los hombres modernos se originaron solo en Africa y luego se distribuyeron alrededor del mundo apoyan la hipótesis "Fuera de Africa" y para todos aquellos que apoyen la hipótesis de que los hombres modernos evolucionaron en diferentes lugares se encuentran dentro de la hipótesis "multiregional". Los investigadores en diferentes disciplinas han estudiado genéticamente y antropológicamente los fósiles de los ancestros del *Homo sapiens* para aceptar o refutar cualquiera de las dos teorías. El hecho es que con los datos obtenidos no se puede rechazar ninguna de las dos y no se ha podido comprobar el origen de las razas humanas.

De acuerdo con la hipótesis fuera de Africa los humanos modernos salieron de Africa y poblaron regiones en donde existían humanos arcaicos; estos son los neandertales y algunas especies de *Homo erectus*. Los investigadores soportan esta hipótesis en el hecho de encontrar fósiles de humanos modernos relativamente modernos por lo que se infiere un ancestro común desde 200 000 años ya que las similitudes físicas entre los humanos modernos y los pre-modernos son muy diversas, además de encontrarse ya similitudes geográficas.

En cuanto a la hipótesis multiregional también conocida como la hipótesis de la continuidad postula que los *Homo erectus* se dispersaron a través de Eurasia hace 1 millón de años. Especies se adaptaron de acuerdo a su medio dando características anatómicas únicas que se preservaron a través del tiempo; también conocieron especies que compartían su región por lo que se relacionaron cambiando genes entre ellos. Este intercambio de genes heredables se le conoce como fluidez génica o "gene flow". Gracias a esto los *Homo erectus* pasaron por diversas características físicas como el cambio del tamaño del cerebro, gradualmente esto resultó en la evolución de el hombre modernos en Europa y Asia.

Otra teoría se ha postulado a falta de elementos para revocar o afirmar las teorías anteriores a esta se ha llamado la teoría "comprometedora". En ella se dice que los humanos modernos pudieron emerger de Africa; éstos grupos se dispersaron y eliminaron a las especies humanas más arcaicas en ciertas regiones como Europa pero en regiones como Asia la fluidez génica ocurrió entre poblaciones locales resultando en características regionales permanentes.

Cualesquiera que sean las teorías acerca de las migraciones humanas y de la evolución de nuestra especie se sugiere la expansión de un ancestro común. En la hipótesis multiregional se dice que esto ocurrió hace cientos miles de años con la fluidez génica dentro de todas las especies que existían en ese entonces. La hipótesis fuera de Africa soporta el hecho que nuestra especie resulta de un ancestro común reciente y la teoría comprometedora acepta las dos teorías como razonables y compatibles como posible explicación a los orígenes del hombre moderno.

En 1994 Aurora Martínez Nájera descubrió fósiles en la Gran Dolina al norte de España con una antigüedad de 780,000 años, siendo los fósiles de humanos más antiguos descubiertos en Europa. Incluyen cuatro individuos entre los que se destaca un niño pequeño con el cráneo intacto. Paleo-antropólogos creen que se puede tratar de un ancestro de humanos modernos y de Neandertales, aunque otros dicen que son tan pocas evidencias que no se puede asegurar.

En cuanto a lo que se refiere con migraciones, paleo-antropólogos concuerdan con el hecho de que ocurrió en la época del Pleistoceno dentro del periodo Cuaternario de la era Cenozoica. En el siguiente cuadro se muestra la clasificación del tiempo en términos de evolución de especies:

Eon	Era	Period	Epoch	Approx. time boundaries*	Life forms originating
Phanerozoic	Cenozoic	Quaternary	Holocene	10,000	
			Pleistocene	1,600,000	Human Beings
		Tertiary	Pliocene	5,000,000	
			Miocene	24,000,000	Grazing and
			Oligocene	38,000,000	Carnivorous
			Eocene	55,000,000	Mammals
	Mesozoic	Cretaceous		138,000,000	Primates, Flowering Plants
				205,000,000	Birds
		Jurassic		240,000,000	Dinosaurs, Mammals
		Permian		290,000,000	
				330,000,000	Reptiles
	Paleozoic	Carboniferous	Pennsylvanian	360,000,000	Fern Forests
			Mississippian	410,000,000	Amphibians, Insects
		Devonian		435,000,000	Vascular Land Plants
Silurian			500,000,000	Fish, Chordates	
Ordovician			570,000,000	Shellfish, Trilobites	
Proterozoic			900,000,000	Algae	
			2,500,000,000	Eukaryotic Cells	
Archean			3,800,000,000	Prokaryotic Cells	
			4,500,000,000	Formation of the Earth	

* Beginning date for each period or epoch.

© Microsoft Corporation. All Rights Reserved.

Figura 4.3.0 El tiempo en la tierra. Evolución.

El pleistoceno abarca de 1.6 mda (millones de años) a 10 000 mda, y se caracteriza por tener grandes periodos glaciales (con temperaturas de 5 a 7 C°) y periodos inter-glaciales con temperaturas parecidas a las actuales lo que favoreció el crecimiento de plantas y animales cambiando así los niveles de metanos y de dióxido de carbono en la atmósfera. Un ciclo glacial comprende un periodo glacial y un inter-glaciación. Se ha determinado que el ciclo glacial más largo durante esta época duró de 100 000 a 130 000 años y al menos 25 ciclos glaciales han ocurrido en 2 millones de años. El cambio de la orografía en el mundo fue inminente, aún en las áreas que no fueron cubiertas con hielo provocando densas lluvias y creado lagos que en la actualidad son grandes desiertos en países como Estados Unidos, Africa y Australia. En Sudamérica el clima era más frío y seco lo que generó bosques lluviosos y grandes terrenos de pasto. El hielo cubrió principalmente parte de Canadá y Estados Unidos así como casi todo el norte de Europa. Los cambios climáticos originados obligaron a diversas especies de animales a migrar o evolucionar y otras especies se extinguieron como el tigre dientes de sable, el mamut, el oso gigante y el mastodonte.

En cuanto a los humanos los géneros *Homo* y *Australopithecus* siguieron evolucionando teniendo datos de *Homo sapiens* hace 35 000 años. Es hace pensar que nuestra especie estuvo en contacto con los grandes mamíferos que caracterizaron a la época del pleistoceno. Prueba de esto son los dibujos más antiguos encontrados en la cueva de Lascaux en Francia con una antigüedad de 13 000 años (al término de la dicha época del pleistoceno). Otro indicio de Arte paleolítico, como se ha designado a la serie de pinturas y esculturas encontradas principalmente en Francia, es la prueba pintura llamada : "Física de la evolución del hombre" y se le atribuye al hombre de Cro-Magnon; el hombre moderno más reciente que vivió al oeste y al sur de Europa durante el último periodo glacial.

Se caracteriza por usar ropa y usar utensilios. En el siguiente mapa se puede observar la tierra durante el último periodo glacial del pleistoceno:



Figura 4.3.1 La tierra en el pleistoceno tardío

Dichos cambios climáticos favorecieron la migración del hombre a través de los continentes. Así se proponen varias ondas migratorias en diferentes periodos de tiempo, como se muestra:

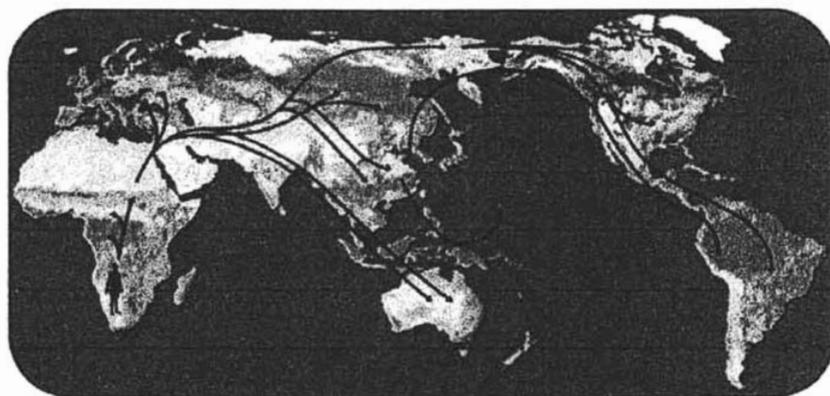


Figura 4.3.2 Posibles rutas migratorias. (Modificado de client.henninger.com/.../maps/)

Estas teorías de ondas migratorias están basadas en restos de fósiles y restos de asentamientos de individuos que pudieron ser de *Homo sapiens*. Investigaciones que se muestran a continuación utilizando mtDNA, apoyan esta hipótesis.

7.4 HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES

Como se ha descrito anteriormente el mtDNA es susceptible a sufrir mutaciones por diferentes motivos. Así análisis moleculares han demostrado que la mayor parte de las secuencias del mtDNA (y su variación) son acumuladas secuencialmente a lo largo del patrón de herencia maternal a partir de sets de mtDNA fundadores, esto durante y después de los procesos de colonización de las diferentes regiones geográficas. Esta es la razón por la cual haplogrupos de mtDNA (grupos de mtDNA relacionados por que comparten mutaciones antiguas y heredables) son geográficamente y étnicamente específicas (Torrioni 2003)

Los polimorfismos en el DNA nuclear; fueron las primeras variantes que se identificaron; algunos de estos corresponden a sustituciones de nucleótidos; identificables porque alteran el sitio de reconocimiento de las endonucleasas de restricción, es decir, se modifica la secuencia específica de nucleótidos dando como resultado una variación de la longitud del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP's).

El primer estudio relacionado directamente con la identificación de haplogrupos de mtDNA en Europa se hizo utilizando la técnica de RFLP a la región hipervariable I y II (HVS I y II) del mtDNA a individuos americanos con descendencia europea en una muestra al azar dentro de la población, así se identificaron sitios específicos de corte en la región. Después se comparó con patrones de corte de mtDNA que tenían otros lugares del mundo. El estudio reveló cuatro haplogrupos específicos (número estable de sitios polimorficos) en Europa: H, I, J y K. Después se encontraron otros haplogrupos como: T, U, V, W y X, solo en el continente europeo (Torroni A 2003). Estos análisis se realizaron utilizando las técnicas de RFLP, PCR y electroforesis principalmente, en la región hipervariable (HVS I y II) del D-loop en el mtDNA.

Desde entonces se han clasificado y caracterizado más haplogupos específicos de diferentes regiones. Conforme aumentaron las muestras de mtDNA fue cada vez más difícil su clasificación y habían haplogrupos que compartían haplotipos (alteraciones específicas). En la actualidad no se secuencian solo las regiones hipervariables, ya que como se mencionó anteriormente puede estar sujeta a errores al realizar los árboles filogenéticos por su gran tasa de mutación y los hotspots que contiene, así que se secuencia todo el mtDNA.

Las técnicas empleadas para la clasificación correcta de los haplogrupos actualmente son : RFLP y/o secuenciación, con amplificación en PCR.

7.4.1 Fundamentos generales de técnicas en biología molecular.

7.4.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism)

Como es sabido, este método consiste en romper el mtDNA en fragmentos específicos gracias a las enzimas de restricción que reconocen sitios de corte en las dos hebras de DNA. Generalmente cortan una sección entre 4 a 6 bp. Una vez obtenido el mapa de restricción (identificación de las secuencias de corte dentro del DNA) se procede a determinar la secuencia de DNA entre los puntos que están suficientemente cercanos (aprox. entre 300 bp). Esta secuencia tendrá tanto al gen que codifica para cierta proteína más intrones, reconociendo la secuencia de polipéptidos se podrá determinar la longitud del gen y poder aislarlo de los intrones y así purificarlo ó amplificarlo.

En cuanto a las mutaciones, las enzimas de restricción pueden cortar o no una secuencia dependiendo si la mutación se encuentra en ese sitio. Para este proceso es necesario agregar a la muestra de DNA purificada un Primer (cebador que reconoce la primera secuencia de bases antes de la mutación) y así la endonucleasa se ancla en el lugar de corte. Si la mutación está presente la enzima no va reconocer las bases de inicio y por consiguiente no va a cortar la muestra, si por el contrario la mutación no está presente la enzima cortará.

Este patrón dependerá del sitio de reconocimiento y la enzima utilizada; así tendremos enzimas que corten cuando la mutación este presente y viceversa. En el capítulo siguiente se clasifican las enzimas de restricción utilizadas para romper el mtDNA en sitios de mutaciones firma para cada haplogrupo.

En el siguiente esquema se presentan ejemplos de los diferentes tipos de enzimas de restricción y el patrón de corte:

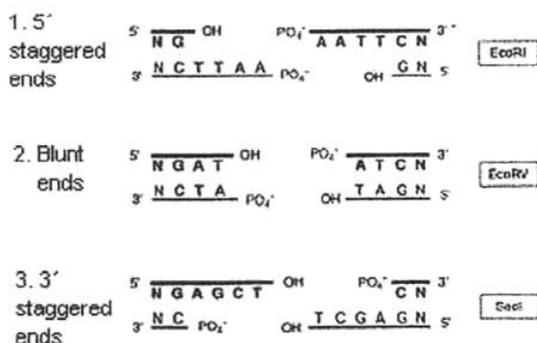


Figura 4.4.0 Clasificación de enzimas de restricción según el corte. (Técnicas en Genética 02/03. Tema 2: Enzimas útiles en Biología Molecular)

Las enzimas de restricción son extraídas principalmente de bacterias, en la actualidad diferentes laboratorios procesan estas enzimas y las venden comercialmente como es el caso Promega.

En el siguiente esquema se muestran las enzimas de restricción que comercializa Promega y son las más utilizadas, también se muestra su secuencia de corte.

Table 23C. Alphabetized List of Recognition Sequences for Enzymes Available from Promega

A*AGCTT	Hind III	C*TTB	Bst99 I	G*GTNACC	BstE II
AAT*AIT	Ssp I	C*YCGRG	Ava I	G*GWCC	Aag II, Sst I
A*CCGGT	Age I	GAANDAN _n	Mbo II	G*GYCC	Ban I
ACTGGN*	BstB I	GAANN _n NTTC	Xba I	GRGCY*G	Ban II
A*CCGCT	Mlu I	GAATGDN _n *	BspM I	GT*AC	Rsa I
A*GTAGT	Spe I	G*AAATC	EcoR I	G*TCGAC	Sbf I
A*GATCT	Bgl II	GAGGT*G	Acl II	GTCTC(H*)	Ahr28 I
A*CC*GCT	Eco47 III	GACN _n N _n NGTC	EcoHK I	G*TCGAC	Ahr44 I
AG*CT	Alu I	GACN _n NGTC	Tth111 I	GT*MKAC	Acl I
AGG*CGT	Sau I	G(A/D)*CG(T/C/D)	Hsp92 I	GTT*AGC	Hpa I
AGT*ACT	Sca I	GAG*GTC	EcoRI	GTY*TAG	Hinc II
A*TCGAT	Cla I	GAGCT*G	Bcl I	F*GATCG	Xho I
ATGCA*TT	Nsi I	G*ANTC	Nsi I	RGCCO*Y	Ise II
A*YDAN	Vsp I	GAT*ATC	EcoRV	IAC*GTA	SnaB I
CAG*CTG	Pvu II	*GATC	Mbo I, Sau3A I	T*CCCGA	Acl III
CA*TAG	Nde I	G*ATTC	Dpn I	T*CGA	Xba I
CAN*	Hsp92 II	GATNN _n ATC	BstBR I	TCG*CGA	Nru I
CCAN _n NTGG	BstX I	GCAGC(N _n T)	Bst7 I I	T*CTAGA	Xba I
CCAN _n NTGG	AacBI I	GCATG*G	Bsu I, Sph I	T*GTACA	Bcl I
C*CATGG	Nco I	G*CCGGC	NcoII	TGG*CCA	BstI
C*CCGGG	Xma I	GCC*GGC	Nsi I, Turbo TM Nsi I	T*TAA	Tsu9 I
CCC*GGG	Sma I	GCCN _n NGGC	Bgl I	TT*CGAA	Cap45 I
CCGC*GG	Sac II	GCGAT*CGC	Sgf I	TTT*AAA	Dra I
C*CGG	Hpa II, Msp I	GCG*G	Cfo I, Hhe I		
CC*SGG	Nci I	G*CGCCG	BspH II		
CCTNAGG	Bsu36 I	GC*GGCCG	Nci I		
CC*WGG	BstO I	G*CTAGC	Nhe I		
C*CWYGG	Spy I	GDGCH*G	Bsp1286 I		
CGAT*CG	Pst I	G*GATC	BamHI		
C*GGCCG	Eco52 I, BstZ I	GGATG(N _n *)	Fok I		
CG*GWDCG	Csp I	GG*CC	Hae III		
CGRY*CG	BsaO I	GGCCN _n NGGCC	Sfi I		
CMG*CKG	MspA I I	GG*CGCC	Nci I, Turbo TM Nci I		
C*TCGAG	Xho I	GGGCC*G	Apa I		
CTCTCTTAA*GGTAGC	PpoM I	G*GNCC	Sau96 I		
CTGCA*G	Pst I	G*GTACC	Acc65 I		
C*TNAG	Dde I	GT*AC*G	Kpn I		

Key: D = A or G or T
H = A or C or T
K = G or T
M = A or C
N = A or C or G or T
R = A or G
S = C or G
W = A or T
Y = C or T

Note: The locations of cleavage sites falling outside of the recognition site are indicated in parentheses. For example, GTCTC(1/5) indicates cleavage at:
5' GTCTC(N_n)...3'
3'...CAGAGNNNNN_n...5'

Figura 4.4.2 Sitios de reconocimiento de algunas enzimas de restricción

Una vez obtenidos los fragmentos de secuencia requeridos se pueden pasar a diversos procesos, para su identificación se pueden separar por su tamaño o peso en un gel de electroforesis o para su amplificación utilizando la técnica de PCR.

7.4.1.2 PCR (Polimerase Chain Reaction)

Como su nombre lo indica la reacción en cadena de polimerasas se refiere a un proceso en que las polimerasas sintetizan cadenas nuevas de un DNA molde con variación de temperatura obteniéndose muchas replicas de la secuencia deseada. Así tenemos que se trata de un proceso cíclico en el cual se varían temperaturas favoreciendo la síntesis di novo de DNA. En el siguiente esquema se resume el proceso:

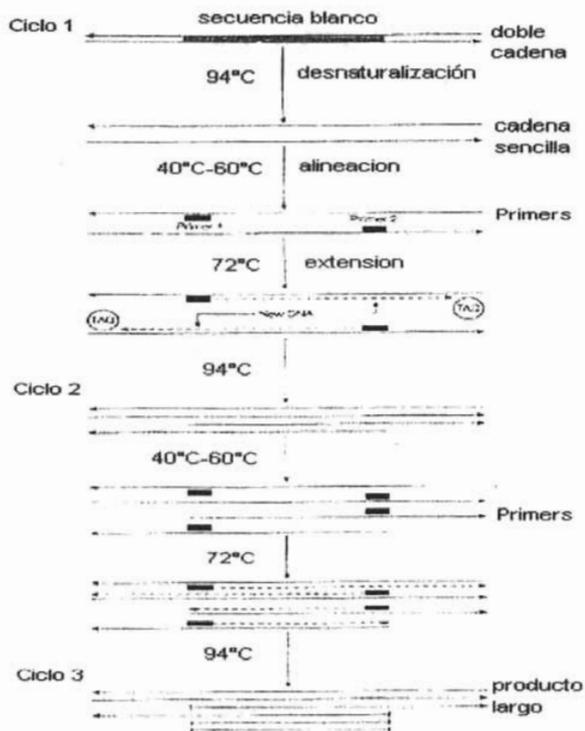


Figura 4.4.4 Representación esquemática del PCR. Técnicas en Genética 2002

La variación en los diferentes parámetros dentro de los ciclos del PCR pueden optimizar o interferir con los productos finales, es por eso que se realizan diferentes experimentos para entender los efectos que pueden provocar los cambios. De acuerdo con la secuencia específica a analizar se varía la temperatura en cada ciclo, para mtDNA cada polimorfismo y su especie amplificada tiene reportadas temperaturas base para cada ciclo. En cuanto a las enzimas estas tienen que resistir los cambios de temperatura, sin reducir efectividad.

De acuerdo con la secuencia específica a analizar se varía la temperatura en cada ciclo, para mtDNA cada polimorfismo y su especie amplificada tiene reportadas temperaturas base para cada ciclo. En cuanto a las enzimas estas tienen que resistir los cambios de temperatura, sin reducir efectividad.

Las enzimas termoestables utilizadas en el PCR son:

Enzima	Eficiencia ^a	Rango de error ^b	Rango de extensión ^c	3'-- 5'	5'-- 3'
Taq	88	2x10 ⁻⁴	75	--	Si
Tli	70	4x10 ⁻⁵	67	Si	--
Pfo	60	7x10 ⁻⁷	nd	Si	--
RTth	Nd	nd	60	--	Si

^a. porcentaje de producto por ciclo

^b. frecuencia de errores por pares de bases incorporadas

^c. promedio del no. de nucleótidos adicionados por seg

nd. no determinado

En la siguiente tabla se presenta el parámetro a medir la alteración y los posibles efectos que esto conlleva dentro de la reacción:

Parámetro	Alteración	Efecto en la reacción
<i>Alineación</i>	Aumento de Temp.	Aumenta la especificidad del primer por desestabilización de los pares de bases erróneos.
	Disminución de Temp.	Aumenta la sensibilidad de la reacción, estabilizando bases de pares correctos.
<i>DNA pol</i>	Concentración	Afecta la sensibilidad y la especificidad. Una disminución produce muy pocos productos y un aumento reduce especificidad.
	Tipo de DNA pol	Taq: muy eficiente pero con un alto grado de error; Pfu: eficiente con bajo rango de error.
$[Mg^{+2}]$	Variando $[MgCl_2]$	Una disminución, aumenta la especificidad y un aumento estabiliza la primera alineación por lo que aumenta la sensibilidad.
<i>Parámetros cíclicos</i>	Temp. de desnaturalización	Un aumento produce alta sensibilidad especialmente para G+C, sin embargo Taq pol disminuye su actividad por arriba de 93°C.
	Tiempo de extensión	A mayor tiempo incrementa la sensibilidad en cadenas largas.
	No. de ciclos	Como la sensibilidad del ensayo depende de la eficiencia enzimática así como del no. inicial de moléculas de DNA a polimerizar; es solo necesario incrementar el no. de ciclos por arriba de 35 si la reacción contiene $<10^5$ moléculas iniciales.

Existen más de un método para realizar el PCR ya sea cuantitativo o en tiempo real.

Una vez obtenido un gran número de copias de la secuencia requerida se pueden utilizar diversos métodos de identificación, ya sea electroforesis o secuenciación automática. En la actualidad se utiliza la secuenciación automática por su eficiencia y rapidez, el problema es que no todos los laboratorios cuentan con este tipo de equipo. La secuenciación se puede utilizar de manera directa en el mtDNA sin utilizar enzimas de restricción lo que facilita la experimentación y lo hace más específico.

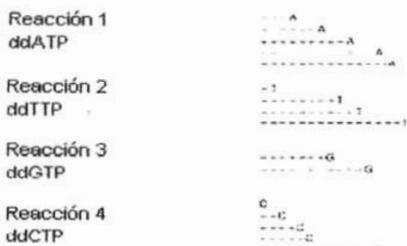
7.4.1.3 Secuenciación

En la actualidad hay 3 métodos de secuenciación. Estos son: secuenciación enzimática, secuenciación automática con fluorocromos y secuenciación cíclica.

7.4.1.3.1 Secuenciación enzimática

La secuenciación enzimática se basa en el uso de dideoxinucleótidos utilizando una hebra molde, se sintetiza una nueva hebra en sentido 5'→3'. La característica de los dideoxinucleótidos es que tienen en la posición 3' del azúcar un hidrógeno en lugar del OH lo que impide la formación de enlaces fosfodiéster. Así en la nueva síntesis, la catálisis terminará al incorporarse el dideoxinucleótido. Consta de 4 reacciones que se representan a continuación:

secuencia blanco 5'- GAATGGTCATAGTCTA-3'
 secuencia sintetizada 3'- CTCACCACTATGACAT-5'



Lectura:

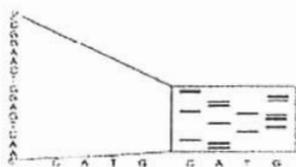
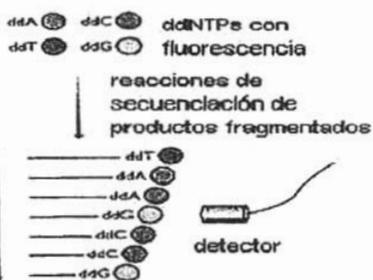


Figura 4.4.5 secuenciación enzimática

7.4.4.3.2 Secuenciación automática por fluorocromos :



Las bandas de fluorescencia pasan
 a través del detector

Lectura:

CACCCGATCGAAATTAAGTTCCTAAAGTTAAGCTTGG

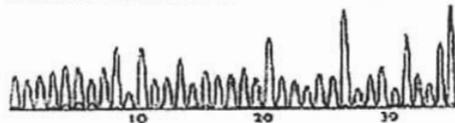


Figura 4.4.6 Secuenciación por fluorocromos

7.4.1.3.3 Secuenciación cíclica



Figura 4.4.7 Secuenciación cíclica

En el método de secuenciación cíclica, se realiza un PCR con solo 1 primer y un dideoxinnucleótido. El resultado es un cúmulo de cadenas terminadas en la base del dideoxinnucleótido; estas cadenas junto con los productos de las reacciones de los demás dideoxinnucleótidos se procesan en electroforesis.

Una vez encontrados sitios específicos y estables de polimorfismos (mutaciones firma) los haplogrupos se clasifican de acuerdo al continente. Mientras se avanzó en la clasificación de mutaciones firma se encontraron con mtDNA's que compartían 2 o más mutaciones estables y fue necesario secuenciar una región más amplia del D-loop (o de cualquier región del mtDNA) (Wilson 2002) o realizar una secuenciación completa del mtDNA y así poder observar otro tipo de mutaciones o polimorfismos que clasifiquen mejor la muestra. Con este tipo de análisis surgen los "subhaplogrupos". También se ha encontrado haplogrupos relacionados filogenéticamente más estrechamente que otros aún dentro del mismo continente a los que se han llamado "clados".

Con la información anterior es posible calcular la antigüedad de cada haplogrupo o subhaplogrupo utilizando el valor de ρ , que se refiere a la distancia transicional promedio a partir de una secuencia fundadora supuesta y estimada por un valor de la tasa de mutación de 1 cada 20180 años. Par el cálculo se utiliza la fórmula siguiente:

$$\rho = \Sigma nt / N$$

Donde t = número de mutaciones que presenta un haplotipo a partir de una posición preestablecida como origen, n = número de muestras que comparten el haplotipo y N = número total de muestras en el subhaplogrupo investigado (Froster 1996).

Obteniéndose los años aproximados a partir de cuando la mutación o polimorfismo fue heredable, se pueden realizar árboles filogenéticos que relacionen haplogrupos , subhaplogrupos y clados de mtDNA. Existen diversos softwares creados con tal motivo. Así es posible identificar clados fundadores y el gene flow que cada población posee.

Tenemos que los haplogrupos de cada región son :

Africa: L (L1,L2,L3)

América: A, B, C, D y X

Asia: A, B, C, D, N, M, F, Z, G y Y

Europa: H, I, J, K, T, U, V, W y X

Oceanía: M, F y B

De acuerdo con la información obtenida en relación a la antigüedad de las alteraciones y mutaciones en la secuencia de mtDNA y haplogrupos, se ha propuesto un mapa de migraciones humanas:

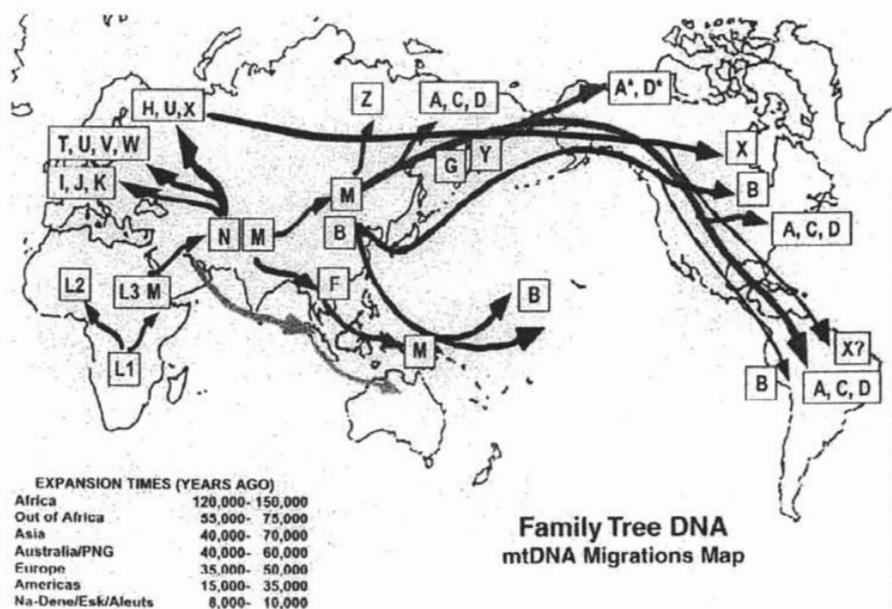


Figura 4.4.8 Distribución de haplogrupos en el mundo y posibles rutas migratorias. (www.roprld.com.mtdna.htm)

Greenberg, Turner y Segura proponen la hipótesis de las tres oleadas migratorias mencionado que los pobladores de América llegaron del Noreste de Asia en diferentes épocas, integrados en tres grupos. Esta hipótesis se sustenta en la homogeneidad en los grupos lingüísticos, datos genéticos, morfología dental y al variación de proteínas sanguíneas. De acuerdo a estos autores, la primera oleada migratoria a América fue aproximadamente 15,000-30,000 años y dio origen a los Amerindios.

Este grupo tiene una extensa diversidad lingüística y se distribuye en todo Sur, Centro y parte del Norte de América; la segunda oleada se realizó hace aproximadamente 10,000-15,000 años por el grupo Na-Dene, distribuidos actualmente al Norte de Canadá y el Sudeste de los EUA, mientras que la migración más reciente fue aproximadamente 6,000-9,000 años y la realizó un grupo de Esquimales-Aleutianos, distribuidos actualmente en la parte Norte de Canadá y Groenlandia (Schurr 1990).

7.5 DISTRUBUCIÓN MUNDIAL

La distribución de haplogrupos en el mundo aparenta ser muy específica pero se ha visto que algunos continentes comparten los mismos haplogrupos, como Europa con el este de Asia y América con el Oeste de Asia. De aquí se derivan las teorías migratorias. A continuación se presentan los estudios más recientes de frecuencias de haplogrupos en cada continente, relacionando con migraciones y evolución humana. (América se estudiará en el capítulo siguiente)

7.5.1 África



Es uno de los continentes más estudiados y por ende se le ha relacionado con el origen de la "Eva mitocondrial". El estudio e identificación de los haplogrupos africanos es un campo bastante amplio por la diversidad de regiones y tribus.

En un artículo recientemente publicado se analizan muestras de mtDNA de 74 individuos de dos poblaciones; Kung y Khwe al norte de Sudáfrica. Estas revelan la presencia del haplogrupo L y en particular de los subhaplogrupos L1 y L2. También se analizaron los haplotipos de varios individuos y en comparación con otros datos, se revela que los pigmeos de Biaka (estudiados anteriormente) presentan los polimorfismos más antiguos seguidos por los Kung y Khwe. Por lo que se clasifican dentro de las poblaciones más antiguas de Africa estimándose en 125 500 a 165 500 años. Esta fecha se sitúa dentro de un periodo de tiempo más amplio del publicado en 1995 en donde se sitúan dentro de 98 000 a 130 000 años. En este artículo se muestran haplogrupos en población Senegalesa que no pertenecen al haplogrupo L por lo que se infiere que los haplogrupos que no presenten el sitio HpaI np 3592 podrían ser tipos de mtDNA ancestrales de Europeos y Asiáticos (Chen 2000). A continuación se presentan los subhaplogrupos y mutaciones firma característicos de la población africana:

Subhaplogrupo	Mutaciones firma
L1	16390G
L2	16390 ^a

En 1995 el grupo de investigadores contituido por Chen, Torroni, Excoffier, Santachiara-Benerecetti y Wallace publicó un artículo en el cual confirman la antigüedad de los polimorfismos africanos. La variación en la secuencia de mtDNA se examinaron en 140 africanos, incluyendo Pigmeos de Zaire, la República de Centro Africa, Mandenkalu, Wolof y Pular del Senegal. Más del 76% de los mtDNA's africanos (100% de Pigmeos y 67.3% de Senegaleses) forman el haplogrupo L definido por el corte de HpaI. Mutaciones adicionales subdividen el haplogrupo en dos (actualmente reconoce la tercera: L3). Una inserción homoplásica en la región intergénica entre tRNA^{tyr} y citocromo oxidasa I (COX I) se observa en el 17.6% de Pigmeos. Esta inserción es una de las mayores observadas en mtDNA humano. Otro 25% de Pigmeos mostró una delección de 9bp entre los genes citocromo oxidasa II (COX II) y Trna^{Lys}, un polimorfismo que se ha encontrado en haplogrupos americanos y asiáticos. Además del haplogrupo L se observaron haplogrupos similares a los observados en Europeos y Asiáticos.

Esto sugiere que los haplogrupos africanos sin el sitio HpaI en 3595 pueden ser tipos ancestrales de los cuales los europeos y asiáticos provienen.

Comparaciones entre las divergencias en las secuencias de africanos y no africanos confirma que las poblaciones africanas exhiben la variación más grande de mtDNA, resultado que soporta la hipótesis que los Africanos representan el grupo humano más antiguo y que todos los humanos modernos tienen un origen reciente y común Africano.

7.5.2 Asia



Este continente es especialmente

importante por ser territorio clave para confirmar o refutar las teorías migratorias, de Africa para el resto del mundo y de Asia hacia América. Su amplio territorio se divide en tres regiones: Eurasia, Asia central y Asia del oeste. En la actualidad se investigan gran cantidad de tribus y poblaciones étnicas de todas las regiones de Asia. Estas investigaciones generalmente se realizan fuera de Asia ya que por su economía no cuentan con el equipo necesario para realizar sus estudios sobretodo del las regiones de Asia Central

La Academia de Ciencia Rusa este año realizó un estudio analizando 480 mtDNA's de comunidades que comparten una lengua: el Altaico, como son: Altainos, Khakassianos, Burianos, Sojots, Tuvinianos, Todjins y Tofalas que se encuentran al sur de Siberia. El 81% revelaron tener haplogrupos característicos del Este de Asia (M, M7, M8, M9, M10, C, D, G, Z, A, B, F, N9a, Y) y 17% de haplogrupos del oeste de la región Eurasia (H, U, J, T, I, N1a, X). Se puede observar la gran influencia del oeste de Eurasia en comunidades del este de Sayan y Altai (12.5% a 34%) mientras que en comunidades Balkai es de menos del 10%.

El alto porcentaje encontrado de haplogrupo C y D les permitió concluir que los Sibereanos del Sur cuentan con gran diversidad de genes y gran heterogenidad que se le atribuyen a la geografía y se cree que esta región fue colonizada en una fase "moderna" de Eurasia (Kong 2000)

En otro estudio de la misma región de Asia (oeste), el Colegio Dental de Tokio identificó analizando 169 haplotipos mitocondriales definidos por 147 posiciones, y 145 tipos fueron observados en solo 1 individuo; los otros 24 tipos se comparten por 2 o más individuos, de acuerdo con la diversidad y con la comparación entre haplotipos de Japoneses, Chinos y Coreanos se encontraron 3 nuevos subhaplogrupos y varios haplotipos característicos de las comunidades Japonesas y Coreanas. Estos son : G4a, G4b y N9b. (Maruyamas 2002)

En el Instituto de Biología Celular de Estonia se analizaron muestras de mtDNA de dos tribus de India, se secuenciaron las regiones hipervariables y el cromosoma Y, los resultados revelaron que varias tribus Indias derivan de habitantes del Pleistoceno que poblaron esa región por migraciones desde África y recibieron muy poca influencia extranjera. Esta población provee el inóculo de la diferenciación subsecuente de los genes pool característicos del este y el oeste de Eurasia. (Kivisild T 2003)

Un poco más tarde de ser publicado este artículo el mismo Instituto publicó el posible árbol filogenético de mtDNA del Este de Asia, utilizando el método de secuenciación completa, en donde se confirma que esta región del mundo está cubierta por dos superhaplogrupos M y N. A partir de ellos surgen diferencias entre los pobladores del norte y de sur donde surgen nuevos subhaplogrupos: M7, M8, M9, N9 y R9. El haplogrupo M7 es muy frecuente al este de Asia mientras que los haplogrupos M7a y M7b2 se encuentran en las poblaciones Japonesas y Coreanas. (Kivisild 2002)

En el Departamento de Biología de la Universidad de Turku en Finlandia se analizaron 101 muestras de Coreanos. El 91% mostró que pertenecen a los haplogrupos M, C, D, G, A, B y F. Ninguno de los individuos pertenece al haplogrupo E. Sin embargo 3 individuos mostraron la presencia simultanea de los haplogrupos E y G, para caracterizarlos dentro de su haplotipo se secuenció la región hipervariable (HVS D). Estudios posteriores indican que posiblemente esta combinación de haplogrupos provenga de un ancestro común al oeste de Asia ya que estos polimorfismos se han encontrado en individuos japoneses. (Snall N 2002). En el siguiente cuadro se resumen la secuencia de mtDNA analizada, la temperatura de alineación del primer en PCR, los polimorfismos asiáticos específicos y las enzimas de restricción utilizadas:

5'-3'	Polimorfismos Asiáticos
16435-16527,724-706	207h, 64i, 712i
534-553,1696-1677	1403a,748b, 663e, 1463e, 1536f, 712i
3281-3298,4508-4489	3537a, 4411a, 3315e, 3842e
4831-4847,5917-5898	5176a, 5261e, 5742i, 5269l
5971-5988,7608-7588	6931g, 6409l, 7461l
7392-7410,8628-8608	8165e, 8250e, 8391e,7617f,8150i,7859j,8592j,7461l
8829-8845,10107-10088	9009a, 10028a,9380f,9746k,9751l
9911-9932,10728-10712	10364e,10689e,10725e
11673-11691,12576-12557	10026h,12407h
12861-12877,13950-13932	12990a,13068a,13031g,13103g,13268g,13004j, 13096k
13914-13930,15865-15845	14015a,14322a,14509a,15606a,14567i,14279j, 14869j,15195j
15553-15569,16547-16527	16254 ^a ,16390b,15883e,16398e,16517e,16000g, 16490g,15925i,16049k,16089k,16208k,16718l

Los fragmentos de PCR son indicados por los coordinados de nucleótidos de avance (antes de la coma) y de reversa (después de la coma) según Anderson 1981. Los sitios polimorficos están indicados por su nucleótido inicial y la letra que indica la enzima utilizada: a= *AluI*; b= *AvaI*; c = *DdeI*; d = *FnuDII*; e = *HaeIII*; f = *HhaI*; g = *HinI*; h = *HpaI*; i = *HpaII*; j = *MboI*; k = *RsaI*; l = *TaqI*. Modificado de Schurr 1990.

7.5.3 Europa



Gracias a su economía, este continente es uno de los más estudiados y se han analizado mtDNA's en casi todos los países de este continente. Uno de los artículos publicados este año en donde relaciona migraciones de África a Europa y de Europa hacia América es el realizado por la Universidad de Madeira en Portugal

En él se analizan 155 muestras de mtDNA de población del archipiélago de Madeira y de la isla de Acores. Este archipiélago se encuentra en el Océano Atlántico a 800 km de El Jadida, Marruecos y fue colonizado por los Portugueses en el siglo quince. Este archipiélago es importante para la historia de las migraciones ya que jugó un papel principal en el intercambio comercial y de esclavos a través del Atlántico desde Europa y desde África.

Los resultados rebelaron la alta frecuencia de haplogrupos africanos como L1 y L3, por lo que se infiere que el pool génico de esta población fue donado principalmente por africanos del sur del Sahara y no vía Portugal; en comparación con otro estudio realizado en las Islas Canarias (colonizadas por España) que se encuentran a 500 km al sur del archipiélago de Madeira y a 330 km de El Aayun Marruecos (es decir, más cerca del continente Africano) presenta una alta frecuencia de haplogrupos europeos, en particular el U6b1. Analizando los datos se puede corroborar la importancia comercial y el flujo de población que durante los siglos posteriores al quince Madeira obtuvo. (Brehm 2003)

Diversos artículos han sido publicados comprobando la presencia de siete haplogrupos en toda Europa, uno es el escrito por la Academia de Ciencias en Rusia. En éste se analizaron 637 individuos, 436 polacos y 203 rusos (región europea). Se encontró que no existen diferencias significativas entre las dos poblaciones que sugieran diferentes pool génicos y presenta similar distribución de frecuencias en los haplogrupos. Lo relevante del estudio radica en la diferencia lingüística de la región, ya que Polonia y Rusa se encuentran compartiendo fronteras pero no comparten el mismo Idioma (Malyarchuk 2002). Caso contrario muestra el artículo presentado por el Departamento de Biología Molecular del Hospital de Toloun-La Seyne en Francia. En él se describe el análisis de muestras de mtDNA de dos poblaciones al norte de Italia, la primera Posia (situado en los alpes cerca de Vicenza) y Barco di Pravidomini (cerca de Venecia).

Las dos poblaciones comparten la misma lengua: Veneto pero la distribución en la frecuencia de haplogrupos cambia de una región a otra siendo más frecuente en Posia el haplogrupo T y en Barco di Previsdomini el J. Teniendo en cuenta los resultados es fácil suponer que la frecuencia de haplogrupos depende más de la distribución geográfica que de la lengua que se domine (Mogentale-Profizi 2001)

De acuerdo con la distribución de las frecuencias de haplogrupos europeos una investigación con la colaboración de varios Institutos al Este de Europa analizaron muestras de población eslovena y bosnia encontrándose la mayoría dentro de los haplogrupos característicos de la región pero cerca del 2% entraron dentro de los haplogrupos Africanos o de Eurasia. Esto indica que los caldos que poblaron el centro y el este de Europa como Alemania, Polonia, Rusia y Finlandia penetraron en territorios del sur tan lejanos como los Balcanes. Sin embargo se observaron diferencias entre bosnios y Eslovenos en cuanto haplotipos lo que sugiere que al menos dos ondas migratorias se requirieron para poblar esta península (Malyarchuk 2003)

A continuación se presentan los oligos para la identificación de cada haplogrupo:

Grupo 1715 4577 7025 8249 9052 10394 12308 13366 16065 16389
DdeI NlaIII AluI AvaII HaeIII DdeI HinfI BamHI HinfI BamHI

H			0			0				
I	0		1	1		1				1
J			1			1			0	
K			1		0	1	1			
T			1			0		1		
U			1			0	1			
V		0	1			0				
W			1	1		0				
X	0		1			0				

1/0. Presencia/ Ausencia del sitio.

Modificada de Benedictis 1999

7.5.4 Oceanía



En 2002 el
Departamento de

Antropología de la Universidad de Temple, Philadelphia publicó un estudio realizado en las Islas Salomón. Estas se encuentran en entre Polinesia y Malesia. Actualmente se cree que estas islas (en particular Santa Cruz) fueron pobladas por ancestros de malayo-polinesios hace 3000 años. Hechos arqueológicos demuestran que las islas pudieron ser colonizadas por poblaciones Austronesias tiempo más tarde y de manera más complejos (Friedleander 2002)

Se analizaron los haplotipos y se midieron filogenéticamente con Bandlet median network y se obtuvieron 2 líneas filogenéticas; unas que contenían una deleción de 9 bp en una región del D-loop y otras no. Esto indica dos diferentes orígenes en dos diferentes poblaciones con diferente divergencia en expansión. No es fácil deducir de donde y cuando surgieron las migraciones hacia la isla. En otro estudio realizado en la regiones del Norte de Australia se analizaron muestras de la población Walbiri y se encontraron 34 secuencias distintivas por haplotipo encontrados en 10 diferentes haplogrupos comunes en Asia. Aún así muchos otros son únicos de la población, aparentemente éstas son divisiones de clados que incluyen otros aborígenes australianos. La similitud de estos haplotipos sugiere que los aborígenes de Australia y de Papa Nueva Guinea pertenecían a una sola población que posteriormente se diversificó geográficamente. Con este estudio se pudo corroborar los haplotipos únicos de la población Aborigen de Australia. (Huoponenk 2001)

VII. HAPLOGRUPOS NATIVO-AMERICANOS

8.1 AMÉRICA

Nativo-Americanos es el término que se refiere a la gente indígena u oriunda del continente Americano. También se les conoce como Indios Americanos y comprende a la gente del norte, centro y sur de América. La población nativo-americana antes del primer contacto con europeos se estima en 90 millones; 10 millones en Norte América (sin abarcar México), 30 millones en México, 11 millones en Centro América, 445 000 en las Islas del Caribe, 30 millones en la región andina de Sudamérica y 9 millones en el resto de Sudamérica. Estas cifras son relativas porque cuando los europeos empezaron a llevar un censo gran parte de la población había muerto, ya sea en combate o por epidemias.



Los nativo-americanos son más

parecidos físicamente a los pobladores asiáticos que a los pobladores de cualquier otra región del mundo. Esto se asume por el hecho de que descienden de asiáticos que cruzaron el Estrecho de Bering (Beringia) alrededor de 30 000 años en la Época del Pleistoceno. Sus características físicas son: piel morena, ojos cafés o negros y pelo lacio negro. Estas características pueden diferir actualmente por la adaptación al medio o por ser mezclas con europeos o africanos.

La mayoría de estudios relacionados con nativo-americanos utilizando mtDNA y el cromosoma Y, son realizados en los Estados Unidos de Norteamérica. Actualmente algunas Universidades de las Islas del Caribe y de Sudamérica en países como Colombia, Buenos Aires y Brasil han realizado estudios de frecuencias de haplogrupos en diversas tribus lo que ha permitido tener una visión más amplia de la frecuencia de los cinco haplogrupos encontrados en el continente (A, B, C, D y X) (Torrioni, 2002) y así poder suponer las rutas migratorias desde Asia y a través del Norte al Centro y Sur de América.

En América existen o existieron tribus indígenas en casi todas las regiones, solo en Norteamérica existen más de 60 y en Latinoamérica más de 100. Muchas tribus que existieron en la antigüedad se extinguieron y solo se tienen récord de ellas a través de cementerios o ruinas.

A continuación se presentan las tribus conocidas que habitaron la región norte de América (por orden alfabético, excluyendo México)

Abenaki USA	Big Trout Lake CANADA
Achigo CANADA	Caldwell First Nation CANADA
Acoma USA	Cayuga USA
Afroamerican AMERICAS	Cherokee USA
Aleut USA	Cheslatta Nation CANADA
Algonquin CANADA	Cheyenne USA
Anishinaabe CANADA	Chicano USA
Apache USA	Chippewa CANADA
Assiniboin CANADA	Cree CANADA
Athabaskan USA	Dene CANADA
Atikamekw CANADA	Dine USA

Gitskan CANADA	Nishnawbe Aski CANADA
Grassy Narrows First Nation CANADA	Nunavut CANADA
Haisla CANADA	Nuu Chah Nulth CANADA
Haudenosaunee* NORTH AMERICA - CANADA - UNITED STATES	Oglala Sioux UNITED STATES
Hawaiian UNITED STATES	Ojibwa CANADA
Hopi UNITED STATES	Oneida* CANADA - UNITED STATES
Innu CANADA	Onondaga UNITED STATES
Inuit* CIRCUMPOLAR – CANADA	Opatchust CANADA
Kanaka Maoli UNITED STATES	Opetchesht CANADA
Kitamaat CANADA	Pottawatomie CANADA
Kodiak UNITED STATES	Quinault UNITED STATES
Lac Seul First Nation CANADA	Sachigo Lake CANADA
Lakota Nation UNITED STATES	Saddle Lake Cree CANADA
LubiconCreeCANADA	Sagkeeng First Nation CANADA
Lummi UNITED STATES	Saulteaux CANADA
Makah UNITED STATES	Seneca UNITED STATES
Manitoba CANADA	Shoshone UNITED STATES
Me wuk UNITED STATES	Teton Sioux UNITED STATES
Métis CANADA	Treaty Six First Nations CANADA
Mikmaq CANADA	Tuscarora UNITED STATES
Mississauga CANADA	Utah Navajo UNITED STATES
Mohawk CANADA	Washitaw UNITED STATES
Montagnais CANADA	Western Shoshone UNITED STATES
Mushuau Innu CANADA	Wet suwet en CANADA
Muskogee Creek UNITED STATES	Yankton Sioux UNITED STATES
Nakoda CANADA	Yukon CANADA
Navajo UNITED STATES	Yup'iks UNITED STATES
	Yupiaq UNITED STATES

En Latinoamérica existe una población de cerca de 48,959,838 Amerindios. Distribuidos de la siguiente manera:

Bolivia	4,283,200	Salvador	293,000
Ecuador	3,340,000	Honduras	245,000
Guatemala	4,200,000	Nicaragua	152,000
México	23,500,000	Panamá	126,480
Perú	10,288,850	Paraguay	66,662
Argentina	197,500	Venezuela	331,929
Brasil	220,000	Antillas	215,000
Colombia	500,000	Guyana	38,367
Costa Rica	32,000	Suriname	4,850
Chile	925,000		

Esta población esta conformada por las siguientes tribus:

Afroamerican AMERICAS	Ava Canoeiro BRAZIL
Aguaruna PERU	Awa Guaja BRAZIL
Akurio SURINAME	Ayllu BOLIVIA
Amarakaeri PERU	Aymara* BOLIVIA - CHILE - PERU - SOUTH AMERICA
Arasaire PERU	Bribri PANAMA
Arawak* FRENCH GUIANA - SURINAME	Cakchiquel GUATEMALA
Aschuar PERU	Canar ECUADOR
Ashaninka PERU	Carib SURINAME
Asuai ECUADOR	Chane ARGENTINA
Atacama CHILE	

Chorti HONDURAS	PARAGUAY
Collas ARGENTINA	Guayami PANAMA
Coya ARGENTINA	Huambisa PERU
Cumanagoto VENEZUELA	Huehuetenango GUATEMALA
Embera PANAMA	Ingariko BRAZIL
Enxet PARAGUAY	Ishör PARAGUAY
Garifuna* GUATEMALA - HONDURAS - NICARAGUA	Iyojwaya ARGENTINA
Genipapo Kanindé BRAZIL	Jibaro PERU
Gnobe PANAMA	Kaiua BRAZIL
Guambiano* ARGENTINA - BOLIVIA BRAZIL - COLOMBIA PARAGUAY	Kali'na FRENCH GUIANA
Guarani* ARGENTINA - BOLIVIA - BRAZIL -	Kalinya SURINAME
Kayová Guarani BRAZIL	Karaja BRAZIL
Kekchí GUATEMALA	Karina* SURINAME - VENEZUELA
Kogí Arzaria COLOMBIA	Maya* BELIZE - GUATEMALA
Kolla ARGENTINA	Mayagna NICARAGUA
Kollagua PERU	Mbya Guarani* ARGENTINA - PARAGUAY
Komlek ARGENTINA	Miskitu* NICARAGUA - HONDURAS
Krikati BRAZIL	Mocovi ARGENTINA
Kuna PANAMA	Nahuat EL SALVADOR
Laymi BOLIVIA	Naso PANAMA
Lenca HONDURAS	Ngobe Bugle PANAMA
Lokono* FRENCH GUIANA - SURINAME	Niwakle ARGENTINA
Macuxi BRAZIL	Ona ARGENTINA
Mapuche* ARGENTINA - CHILE	Oyana SURINAME
Marka BOLIVIA	Paez COLOMBIA
	Pahikweneh FRENCH GUIANA
	Paraiba BRAZIL

Pehuenche CHILE	Toba ARGENTINA
Pilaga ARGENTINA	Torrapán HONDURAS
Piro PERU	Tremembé BRAZIL
Pitaguary BRAZIL	Trio SURINAME
Potiguara BRAZIL	Tucajana SURINAME
Puquina PERU	Pataxó BRAZIL
Qaqachaka BOLIVIA	Pech HONDURAS
Quechua* ARGENTINA - BOLIVIA - PERU	Pehuenche CHILE
Queuco CHILE	Pilaga ARGENTINA
Quiché GUATEMALA	Piro PERU
Rama NICARAGUA	Pitaguary BRAZIL
Ranquel ARGENTINA	Potiguara BRAZIL
Rapa Nui CHILE	Puquina PERU
Shipibo PERU	Qaqachaka BOLIVIA
Shuar PERU	Quechua* ARGENTINA - BOLIVIA - PERU
Shuar Achuar ECUADOR	Queuco CHILE
Solola GUATEMALA	Quiché GUATEMALA
Sumu NICARAGUA	Rama NICARAGUA
Suyu BOLIVIA	Ranquel ARGENTINA
Tairona COLOMBIA	Rapa Nui CHILE
Tapeba BRAZIL	Shipibo PERU
Tapite ARGENTINA	Shuar PERU
Taurepang BRAZIL	Shuar Achuar ECUADOR
Tawahka HONDURAS	Solola GUATEMALA
Tehuelche ARGENTINA	Sumu NICARAGUA
Teko FRENCH GUIANA	Suyu BOLIVIA
Terena BRAZIL	

Para encontrar la relación entre la población americana con la asiática, se realizó un estudio de la variación de la secuencia de mtDNA en 167 amerindios (norte, centro y sur) y 7 poblaciones de Asia con un número total de 153 asiáticos. Se utilizaron 14 enzimas de restricción encontrándose un total de 67 sitios polimorficos, que definieron 50 combinaciones de alelos y una deleción de 9pb.

Las combinaciones se agruparon en cuatro grandes grupos, que se definieron como se muestra:

Haplogrupo	Nucleótido	RFLP	Ubicación	Secuencia
A	16290T	HaeIII+663	L396	CCAGCCTAACCAGATTTCAA
	16319		H1067	GGGGTATCTAATCCCAGTTT
B	16189C	Deleción	L8192	GCTCTGAAATCTGTGGAG
	16217C	9 pb	H8361	TATTTAGTTGGGGCATTTCAC
C	16298C	Alul+13262	L12978	CAAGCCTCACCCACTACTA
	16327T		H13773	GGTAGAGGGGATTGTTGTT
D		Alul-5176	L5042	CCCACATAGATGAATAATA
			H5442	GCGATGAGTGTGGGAGGAA

Así se caracterizan las mutaciones firma que definen cada haplogrupo:

Haplogrupo	Mutación firma
A	16290T,16319 ^a
B	16189C, 16217C
C	16298C, 16327T

Presentando los siguientes subhaplogrupos:

Subhaplogrupos	Mutaciones o polimorfismos
A1	16517,663+ HaeIII,13259+ HincII, 5176+ AluI
A2	663+ HaeIII, 13259+ HincII, 5176+ AluI
B1	663-HaeIII, 16517+HaeIII
B2	663-HaeIII, 16517-HaeIII
C1	663,16517+ HaeIII, 13259-HincII, 5176+AluI
C2	663,16517- HaeIII, 13259-HincII, 5176+AluI
D1	663-HaeIII, 16517+HaeIII, 13259+HincII, 5176-AluI
D2	663+HaeIII, 16517+HaeIII, 13259+HincII, 5176-AluI

Al encontrar los porcentajes de frecuencias de haplogrupos en casi todas las regiones de América, se ha podido discutir posibles teorías acerca de la migración asiática a este continente. En Norteamérica se han realizado diversos estudios analizando cementerios antiguos donde yacían restos de indios americanos como el de la región de Great Basin al oeste de Nevada. Los restos datan de 350 a 9200 años BP y en comparación con las frecuencias de la gente que ocupa actualmente esa región, resulta muy divergente; sugiriendo que existe una discontinuidad entre los pobladores antiguos y los modernos.

Este hallazgo comprueba una hipótesis anterior en la que se postula que la gente que habitó esa región se expandió recientemente y no desde la antigüedad. Las frecuencias de los pobladores antiguos muestran mayor semejanza con la presentada actualmente en California (por lo que probablemente migraron para el oeste y no al suroeste de la región) (Kaestle 2001). Otro cementerio analizado es el no. 36 Norris Farm al centro de Illinois con muestras que datan hace 700 años. Aquí se encontraron frecuencias de haplogrupos parecidas a las actuales obteniéndose los 5 haplogrupos característicos de América en donde el más frecuente es el A (Stone and Stoneking 1999).

Para analizar las teorías migratorias la Universidad Federal de Rio Grande del Sur en Porto Alegre Brasil, analizó 720 muestras nativo-americanas en donde el resultado analizando polimorfismos, distribución, árboles filogenéticos, simulaciones computarizadas sugieren que los 4 haplogrupos provienen de Asia.

En el Estrecho de Beringia se formó una especie de “cuello de botella” donde solo ciertos haplogrupos cruzaron hace 30 000 o 40 000 años y luego se expandieron contribuyendo al pool génico y luego al gene flow que precedió a las siguientes rutas migratorias (Bonatto 1997). Así la diversidad génica surgió de diferentes migraciones y donde la expansión génica se pudo dar no entre los primeros pobladores sino entre la descendencia de ellos. (Lorenz 1997). Otra diferencia se observa comparando tribus de Siberia y del norte de Norteamérica. Pueblos como Koryaks, Altaians del norte y Kets (Siberia) presentan frecuencia de haplogrupos A, C y D pero solo los Altaians del norte presentan A, B, C y D. Esto sugiere que durante la primera migración Asiática solo regiones donde habitaban tribus como Koryaks y Kets poblaron América mientras que el centro y este de Asia estaban parcialmente deshabitadas y a través del tiempo se poblaron y migraron hacia América. (Sukernik 1996).

Así como existen investigaciones que comprueban oleadas de migraciones a través de América, existen otras que lo refutan. En la Universidad de Sao Paulo se analizaron 30 muestras en individuos nativo-americanos por un método inusual. Descartando los errores que pueden surgir al analizar el D-loop, decidieron secuenciar una región continua de 8.8 kb fuera de la región control. La similitud entre secuencias de los diferentes haplogrupos suponen un origen común (Silva 2002).

Las muestras obtenidas al norte de América no son suficientes para suponer años probables de migraciones Asiáticas, las investigaciones realizadas en Centroamérica, Sudamérica y el Caribe son pieza fundamental en la comprensión de las rutas que siguieron las tribus para poblar América de Norte a Sur.

José Martínez Cruzado, Genetista de la Universidad de Puerto Rico comparó la frecuencia de haplogrupos encontrados en huesos antiguos y pobladores que decían tener descendencia indígena. Los taínos fueron una tribu que ocupó la región del Caribe desde Puerto Rico hasta República Dominicana. Según la historia antigua este pueblo se extinguió poco después de la llegada de los europeos a las islas. De acuerdo con la investigación hecha por Cruzado la mayoría de la población boricua presenta haplogrupos nativo-americanos y no africanos o europeos como la historia de las migraciones de ese país harían pensar. Solo que las frecuencias son diversas a las encontradas en Norte América. En el Caribe los haplogrupos C y D son los más frecuentes mientras que el A y B se presentan en mucha menor proporción (Martínez 2001)

En Centroamérica se ha caracterizado polimorfismos específicos como el de la tribu de Chibcha de Costa Rica y Panamá. Estas poblaciones presentan una delección de 6pb que abarca los nucleótidos 106-111 y se pierde un sitio de reconocimiento para la enzima MspI en el nucleótido 104. Esta delección ha sido denominada como "delección de Huetar" por pertenecer a la población de Huetar del Centro de Costa Rica. Se sugiere que es originó en una población ancestral Chibcha y de éstas se derivaron las poblaciones modernas. Después se encontró que la delección esta asociada a los haplogrupos A y D y se han encontrado en otras tribus (Santos 1994)

En Colombia se analizaron muestras de 25 tribus que comprenden casi todo el territorio de ese país. Las frecuencias obtenidas varían de una región a otra; al suroeste los haplogrupos más frecuentes son el A y D mientras que el haplogrupo C es el más frecuente al noreste.

El haplogrupo B tiene una frecuencia alta solo algunas tribus dispersas, por lo que se sugieren diversas ondas migratorias del Norte al Sur de América (Keyeux G, et al ., 2002). De acuerdo con los datos obtenidos, se puede suponer que la alta frecuencia de haplogrupo C y D en Puerto Rico se deba a migraciones desde Sudamérica y la poca frecuencia de haplogrupo A se deba a migraciones desde México o Norteamérica (Martínez 2001).

En la Universidad de Barcelona se analizaron 233 muestras de 8 tribus de la región Beni de Bolivia, obteniendo los siguientes haplogrupos más frecuentes:

Aymara = A

Trinitario = A, B y C

Quechua = B

Ignaciano = A, B y C

Moseten = A y B

Movina=C

Yuracare = A, B y C

Se puede notar la falta de haplogrupo D en la región siendo A y B los más comunes (semejante a Norteamérica) (Bert 2001). En otra investigación realizada en Perú de la tribu Quechua que ocupa actualmente una amplia región de ese país, confirmó que el haplogrupo más frecuente en esa tribu es el B con el 54% (Rodríguez-Delfin 2001).

Brasil en un país de amplio territorio y de una historia llena de invasiones y migraciones de todas partes del mundo. En él convergen 3 razas: 1) nativo-americanos, 2) africanos (esclavos) y 3) europeos (colonia). Es uno de los paises con más diversidad cultural actual del continente. Se analizaron 247 muestras de individuos de 4 de las 5 regiones mayoritarias dentro de Brasil. Se obtuvo que un 33% de la población muestreada presentaron haplogrupos nativo-americanos, 28% africanos y 39% europeos.

Lo que confirma la gran diversidad génica dada por migraciones ancestrales y recientes. Dentro de los haplogrupos nativo-americanos el 30% pertenece al haplogrupo A, el 29% al B, el 24% al C y el 16% al D (Alves-Silva 2000)

Otro país sudamericano en muestrear parte de su población es Chile y se obtuvieron datos interesantes; haplogrupos C y D se encontraron en proporciones bajas al norte y en muy alta frecuencia al sur, mientras que el haplogrupo B tiene un gran porcentaje al norte pero casi es nulo al sur (Rocco P 2002). Datos que confirman lo anterior surgen de un estudio realizado por la Universidad de Barcelona a 60 muestras tomadas de huesos y dientes de tribus extintas en Tierra del Fuego-Patagonia. Estas son: Selknam, Yamana, Kaweskar y Aonikenk.

Los estudios rebelaron la completa ausencia de dos de los 4 haplogrupos primarios nativo-americanos: A y B. En contraste haplogrupos C y D se encontraron en todas las muestras con porcentajes del 38% y 60%. Con estos resultados en conjunto con la desaparición del haplogrupo A y B argumenta que los primeros pobladores de América entraron hace 21 000 – 14 000 años (Carlos Lalueza, 1996).

El mtDNA de 141 individuos de tres comunidades; Mataco, Toba y Pilagá fueron analizadas por RFLP. Estas comunidades se encuentran en la región del Gran Chaco. Este se localiza al norte de Argentina colindando con Bolivia y Paraguay. Los resultados rebelan que existe una alta frecuencia de haplogrupos B y D y en muy bajo porcentaje haplogrupos A y C. En cuanto a la diversidad es interesante notar que las tribus del Gran Chaco presentan la mayor variación intra-grupal y la menor diversidad inter-grupal en comparación con otras regiones de Sudamérica.

Esto se puede deber a muchos factores. La región se encuentra entre el límite de la selva amazónica y las pampas argentinas en un terreno de difícil acceso; gracias a ello el pool génico no presenta mucha variación (Demarchi 2001)

Con estos datos, la frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en América es:



Figura 5.1 Distribución de frecuencias de haplogrupos nativo-americanos en América

Como se puede observar la frecuencia de haplogrupos cambia del norte a sur. Siendo en el Norte y Centro más común los haplogrupos A y B y en el Sur C y D. Esto se puede explicar infiriendo que hubo más una onda migratoria a través de América, al menos tres. Así la diversidad génica fluyó a través del tiempo y las zonas geográficas dispersando ciertos haplogrupos a regiones específicas. Greenberg, Turner y Segura proponen la hipótesis de las "tres oleadas migratorias", mencionando que los pobladores de América llegaron en tres grupos. La primera oleada ocurrió hace aproximadamente 15,000-30,000 años y dio origen a los Amerindios. Este grupo tiene una extensa diversidad lingüística y se distribuye por toda América; la segunda oleada se realizó hace 10,000-15,000 años por el grupo de los Na-Dene, distribuidos actualmente al norte de Canadá y el sudeste de EUA, mientras que la más reciente migración fue aproximadamente hace 6,000-9,000 años y la realizó un grupo de los Esquimales-Aleutianos distribuidos en la parte norte de Canadá y Groenlandia. Esta teoría soporta la hipótesis de dos migraciones para los pobladores que cuentan con la delección de 9pb que define al haplogrupo B. Este haplogrupo no se encuentra en Siberia pero sí en la Polinesia y América por lo que se supone al menos 2 ondas migratorias (Merriwether 1996)

8.2 MÉXICO

El territorio mexicano ocupa un área de 1,964,382 km². Dentro de él la población mexicana esta compuesta mayormente por mestizos en un 60 %, indígenas en un 30%, 9% de europeos (mayormente españoles) y 1% de población de diversos orígenes. Los africanos han contribuido con la mezcla inter-racial mexicana, ya que entre 1519 y 1650 fueron traídos cerca de 120,000 esclavos y durante la colonia llegaron aproximadamente 200,000 africanos más que se situaron en las costas del Golfo de México principalmente en Veracruz (Beltrán 1944). Ya en el México independiente gente de Asia en su mayoría chinos y coreanos han llegado al país para establecerse dentro del comercio. Existe mucha población flotante, esto se debe a gente de centro y Sudamérica que radica temporalmente dentro del país antes de ingresar a los Estados Unidos de Norteamérica. Otro fenómeno migratorio atenuado en los últimos 10 años, es que gran parte de la población mexicana campesinos e indígenas de estados como Michoacán, Oaxaca y Veracruz se desplazan a EUA junto con centroamericanos por mejores oportunidades de trabajo. Esto ha disminuido en forma considerable la población indígena del país.

En la antigüedad las tribus indígenas se establecieron en pequeñas comunidades y con el descubrimiento de la agricultura (8000 a.c) se empezó a cultivar maíz, frijol y calabaza. Con el paso del tiempo las comunidades se convirtieron en grandes pueblos y posteriormente en grandes civilizaciones. La región que comprende a los cuatro grandes imperios en México y que se extendió hasta Costa Rica y Honduras es conocida como Mesoamérica. Y el tiempo en el que se divide ésta es:

Prehistoria/ 33 000 a 2500 a.c

Preclásico/ 2500 a 200 d.c

Clásico/ 200 a 900 d.c

Postclásico/ 900 a 1550

Cuatro grandes imperios surgieron en diferentes etapas: Zapoteca, Olmeca, Azteca y Maya. En general las matemáticas y el comercio fueron factores determinantes en la evolución de todos. Una de las primeras grandes civilizaciones es la Olmeca, su población habitó el territorio de Veracruz y Tabasco entre 1500 y 600 a.c, fueron los primeros en desarrollar las matemáticas y en el uso de un calendario gracias a la observación planetaria. Los Zapotecas habitaron Oaxaca en el año 500 a.c., desarrollaron uno de los sistemas de escritura más utilizados en toda América e hicieron uso de los jeroglíficos para plasmar ideas simples.

Los Mayas florecieron en el sur de México y Centroamérica entre los años 200 y 900 d.c (dentro del periodo clásico). Construyeron centros religiosos que incluían casas, templos, cortes, etc. Desarrollaron la notación jeroglífica, y el récord de la historia, guerras, rituales y mitología en estelas. Su matemática era avanzada y su religión politeísta se basaba en gran número de dioses determinados por climas y por su visión del tiempo. Elaboraron su calendario; el más exacto antes del calendario Gregoriano que nos rige actualmente. Después del año 900 los mayas migraron a la península de Yucatán y sobrevivieron hasta la llegada de los españoles; sin el esplendor de su periodo clásico. El Imperio Azteca surgió después de la destrucción de los Toltecas que sucumbieron ante la falta de alimento, migraron del norte (Hidalgo) al centro (Ciudad de México). Los mexicas (la tribu principal) eventualmente dominó otras tribus y constituyeron años más tarde el Imperio Azteca.

Alcanzaron gran nivel en organización intelectual, económica y artística. En el siglo trece se establecieron en el valle de México y sobrevivieron en esplendor hasta la llegada de los españoles.

Durante el periodo colonial la mayoría de las poblaciones indígenas adoptaron costumbres europeas lo que contribuyó a una mezcla de culturas. Pero existen poblaciones como la Lacandona y los Huicholes que debido a la dificultad geográfica para explorar sus territorios, no fueron alcanzados por los europeos. Algunas de estas regiones indígenas conservan en buen porcentaje su pureza génica. Por lo que en la actualidad existen tribus indígenas que sobrevivieron relativamente a la fusión cultural y provienen directamente de alguna tribu o civilización antigua (Museo Na-Boolum, 1940).

8.2.1 Comunidad Indígena en México

Acaxee	Extinto	Cuicatec	16,000
Amuzgo	25,000	Cuitlatec	Extinto
Aztec	1,000,000	Huastec (Maya)	80,000
Chatino	21,000	Huave (Itsmo de Tehuantepec)	20,000
Chinantec	63,000	Huichol	8,000
Chocho'	2,500	Ixcatec	Casi extinto
Chol (Maya)	80,000	Jova	Extinto
Chontal	60,000	Jumanos	Extinto
Chuj (Maya)	16,000	Kanjobal (Maya)	50,000
Cochimi	Extinto	Kiliwa	Casi extinto
Cocopa	900	Lacandon (Maya)	200
Cora	8,000	Mam (Maya)	250,000

Matlazinca	2,200	Tarascan	60,000
Maya (Yucatán)	540,000	Teco (Maya)	5,000
Mayo	30,000	Tepehuan	19,000
Mazatec	108,000	Tipai	600
Mixe	63,500	Tlapanec (Maya)	40,000
Mixtec	218,500	Tojolobal(Maya)	14,000
Opata	Desconocido	Totonac	174,000
Otomi	250,000	Trique	13,500
Papago	Desconocido	Tubar	100
Pima	1,000 +	Tzeltal (Maya)	45,000
Popoloca	23,500	Tzotzil (Maya)	111,000
Popoluca	26,000	Yaqui	18,000
Seri	400	Zapotec	309,000
Suma	Extinct	Zoque	5,352
Tarahumara	53,000		

Se distribuyen de la siguiente manera :

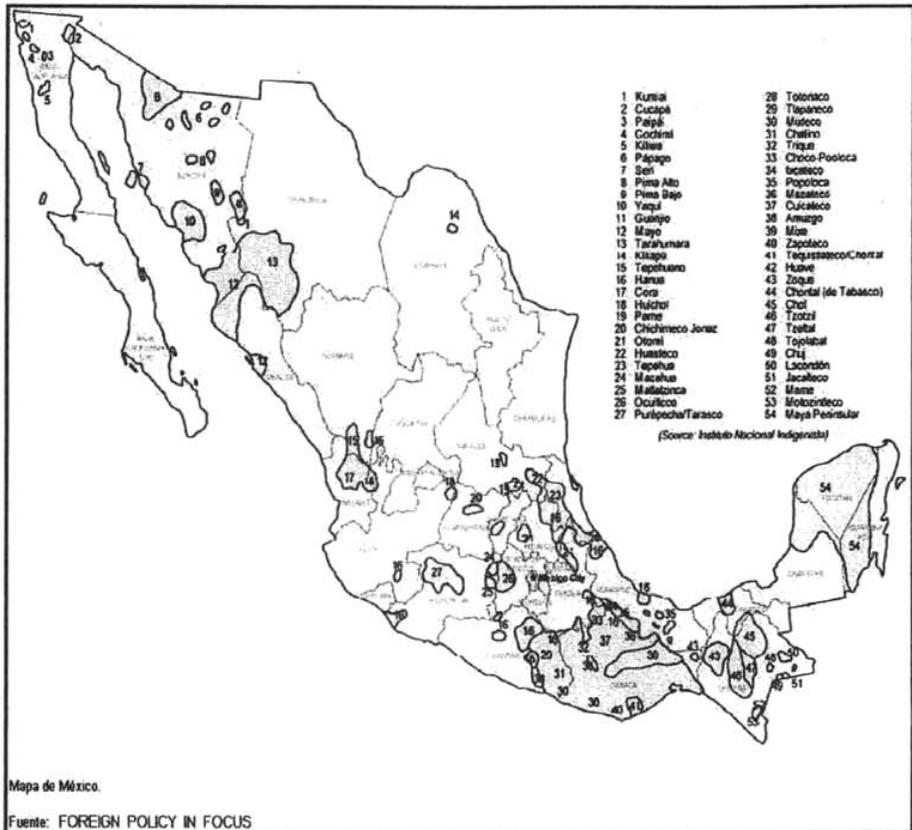


Figura 5.3 Tribus Indígenas en México

Para el estudio genético de las diversas poblaciones se toman en cuenta diferentes criterios de selección, uno de ellos es el estudio de las lenguas o Idiomas que hablan, ya que grupos que hablan lenguas similares o que provengan de la misma raíz podrían exhibir similitudes génicas (Lorenz 1996).

En 1987 Greenberg propuso una clasificación de las tribus americanas en base a la raíz de lengua que se habla. Así en nuestro país se hablan más de cincuenta lenguas indígenas, con mayor número de hablantes se encuentra el náhuatl, hablado por más de un millón de personas, el maya por casi 777 mil, el zapoteco por más de 415 mil y mixteco por casi 390 mil.

8.2.2 Principales lenguas indígenas y su distribución

1. Cochimí	14. Cora	27. Chinanteco
2. Pai-pai	15. Tepehuán	28. Chontal
3. Kiliwa	16. Hña hñu	29. Tzotzil
4. Kumiai	17. Chichimeca-Jonaz	30. Tzeltal
5. Cucapa	18. Náhuatl	31. Chol
6. Seri	19. Huasteco	32. Tojolabal
7. Pima	20. Purépecha	33. Mame
8. Mayo	21. Mixteco	34. Maya
9. Yaqui	22. Mazahua	35. Kekchi
10. Cahita	23. Totonaca	36. Ixil
11. Kikapú	24. Zapoteco	37. Quiché
12. Tarahumara	25. Mixe	38. Popoluca
13. Huichol	26. Zoque	39. Tepehua

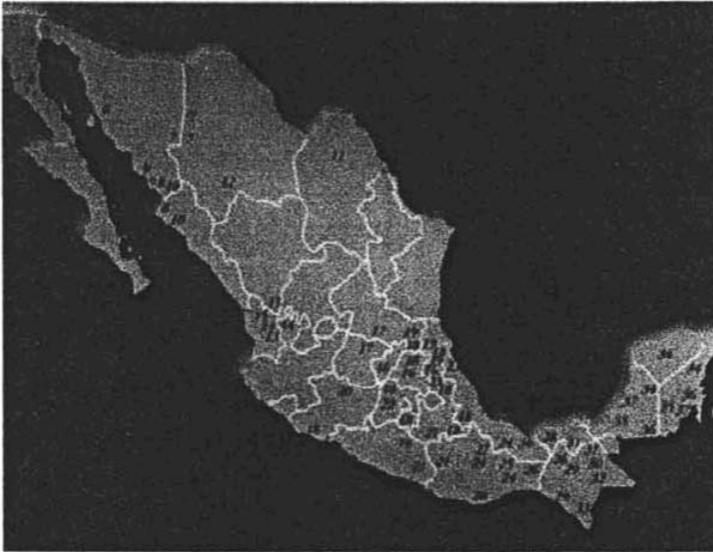


Figura 5.4 Distribución de Lenguas a través de México

Por lo que se puede observar una lengua se comparte en muchas regiones y por diferentes tribus, por lo que se puede inferir que provienen de una sola comunidad. Los estudios en mtDNA se realizan entre tribus que comparten una sola lengua y entre otras. Es por eso que la lengua es un parámetro bastante importante para ser tomado en cuenta y estudiar poblaciones que provienen de lenguas madre y así observar su patrón de variación génica, así como sus migraciones.

8.2.3 Frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en México

El estudio de la frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en México es realizado principalmente por EUA. ha participado en gran manera el Departamento de Antropología de la Universidad de California y el Departamento de Genética y Medicina Molecular de la Universidad Emory de Medicina en Atlanta. En la ciudad de México han participado la Escuela Nacional de Antropología e Historia y el Departamento de Biología en la Facultad de Ciencias, UNAM. Actualmente se realizan estudios de frecuencias de haplogrupos en Centro Médico Nacional Siglo XXI y el Instituto de Fisiología Celular.

El primer artículo publicado en el cual se estudió la frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en México fue en 1994 por el American Journal of Human Genetics en un artículo compartido entre Torroni A, Chen YC y Wallace DC entre otros. En él se examinan 60 nativo-americanos de la región Mixe; mixteca alta y baja y del valle Zapoteco (que comprenden el estado de Oaxaca y Guerrero) por medio de PCR/RFLP. Los resultados obtenidos muestran una alta frecuencia de haplogrupo A (66%) , una relativa frecuencia de B (18%) y muy ligeramente de C (16%). El haplogrupo D no se presentó (Torroni 1994). En otro estudio reciente de frecuencias de haplogrupos en los mismos grupos indígenas se muestra que el haplogrupo A efectivamente es el más frecuente, pero hay evidencia de la presencia de haplogrupo D2 de manera muy ligera (tesis maestría).

Población	No.de muestras	A1	A2	C1	C2	D1	D2	Otros
Mixteca alta	16	(3) 18.75	(3) 18.75	A	(1) 6.25	A	A	(9) 56.25
Mixteca baja	11	(1) 9.09	(6) 54.54	A	(1) 9.09	A	(1) 9.09	(2) 18.18
Mixteca costa	7	A	(2) 28.57	A	(2) 28.27	A	(1) 14.28	(2) 28.27

A.- ausente; Otros.- No se hizo la determinación del haplogrupo B por lo que se puede incluir en este grupo

De acuerdo con los resultados se puede observar que la frecuencia de haplogrupos es muy heterogénea. Aún así existe la presencia de los cuatro haplogrupos fundadores. Estas poblaciones comparadas con la Pima de Arizona y la Maya de Yucatán entre otras.

Los Pima de Arizona, relacionados lingüísticamente con los anteriores, presentaron los mismos haplogrupos, al igual que el Mixe, sugiriendo un posible ancestro común. Los Mayas fueron más parecidos a los Paleo-indios del Norte de América. Estos resultados sugieren que los Mayas y los Aztecas han sido derivados de poblaciones diferentes (Torróni 1994)

En 1996 se estudiaron 500 muestras de nativo-americanos de EUA incluyendo algunas comunidades del centro y noreste de México. Se analizó la frecuencia de haplogrupos en relación a lengua que se habla. Se obtuvieron diferentes resultados, entre ellos la frecuencia de haplogrupos de las comunidades mexicanas es como se espera siendo la de mayor porcentaje el haplogrupo A aunque en otras es el haplogrupo D. Existe correspondencia entre las afiliaciones lingüísticas y las frecuencias de haplogrupos de mtDNA en ciertas tribus, mientras que la proximidad geográfica parece ser la responsable de similitud génica entre otras tribus. Con esto se explica que poblaciones indígenas que hablan una lengua común o una derivada de ésta no presenten frecuencias de haplogrupos similares. Y tribus que hablan lenguas diversas por la proximidad geográfica pueden tener frecuencias de haplogrupos similares. (Lorenz 1996).

En un artículo publicado este año se examinan mtDNA 's de diversos pobladores que según la historia son descendientes de los Hokoman y Anasaki, así como de los Uto-Aztecan y Athapaskan del Sur. Estas comunidades comparten un gran territorio que va del Suroeste de EUA hasta Baja California incluyendo los estados de Sonora y Chihuahua.

Los Yumans habitaron el suroeste de EUA llegando a México. Sus lenguas se dividen en 4 ramas: 1)Kiliwa,2)Pai,3)River, 4)Delta. Kiliwa es la rama más divergente y Cochimi la más cercana aunque no se clasifica dentro de la familia Yuman. Los Seris habitaron Baja California y Sonora pero hablan una lengua diferente. La relación entre los Seri y los Yuman no esta bien definida aunque se sugiere que vienen de un ancestro común. Se cree que los proto-Yuman (Kiliwa y Cochimi) dieron origen a la población del Norte por expansión. El origen de las lengua Uto-Aztecan (3500-2500 BP) no se ha definido.

En el siguiente mapa se muestra la localización geográfica de las tribus del noroeste de México:

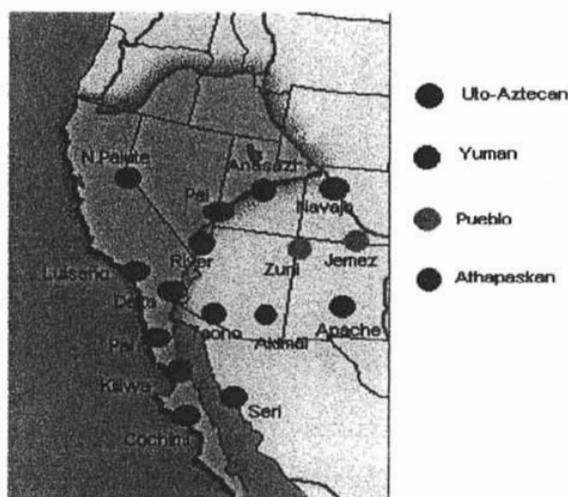


Figura 5.5 Pueblos Indígenas al Noroeste de México

Las comunidades que comparten el idioma se extienden desde Centro-América hasta el estado de Nevada, EUA. Se argumenta que su origen pudo ser en Baja California o México Central. El grupo Pueblo se estableció en el norte (hace 3000 BP) y en sociedades compactas y no comparten el idioma pero su visión del mundo es más parecida a los Athapaskan aunque su aparición es mucho más reciente hace unos 500 años. De acuerdo al estudio de frecuencias de haplogrupos se obtuvieron los siguientes resultados:

Comunidad	Lenguaje	N	A	B	C	D
Zuni	Zuni	26	0.154	0.769	0.077	0
Jemez	Taonan	36	0	0.889	0.028	0
Akimal	Uto-Aztecan	43	0.047	0.535	0.395	0
Taono	Uto-Aztecan	37	0	0.568	0.78	0.054
N. Paiute	Uto-Aztecan	94	0	0.426	0.096	0.479
Nahua	Uto-Aztecan	31	0.613	0.323	0.065	0
Pai	Yuman	27	0.074	0.667	0.259	0
River	Yuman	22	0	0.636	0.364	0
Delta	Yuman	23	0	0.565	0.435	0
Kiliwa	Yuman	7	0	1	0	0
Cochimi	Yuman	13	0.77	0.462	0.462	0
Seri	Yuman	8	0	0.125	0.875	0
Navajo	Athapaskan	64	0.516	0.406	0.047	0
Apache	Athapaskan	38	0.632	0.132	0.184	0.053

Los resultados muestran una inusual falta de frecuencia de haplogrupo A en casi todas las comunidades menos en Apache y Navajo. El haplogrupo D se presenta solo en dos comunidades (Taono y Paiute) de las 5 analizadas que comparten la misma lengua. En general todos presentan el haplogrupo B y solo los Kiliwa no presentó el haplogrupo C.

De acuerdo al análisis de distribución este reveló que el gene flow que surgió a través de las comunidades con el paso del tiempo es debida mayormente a la forma de vida o a la geografía más que al lenguaje. Se realizaron las secuenciaciones de los haplogrupos B y se realizó un árbol filogenético de acuerdo a los haplotipos. Se identificaron 46 haplotipos para el haplogrupo B y 9 para el haplogrupo A.

De acuerdo con los resultados las hipótesis son las siguientes: La gran frecuencia de haplogrupo B se debe a que la región fue colonizada por tribus con alto porcentaje de haplogrupo B (explicada por la segunda oleada migratoria) luego estas poblaciones se diversificaron. De acuerdo a la distribución genética la región en donde se expandieron los Yumans se sitúa en Nuevo México y no en Baja California. Dentro de las comunidades que comparten la lengua Uto-Aztecán se encuentra mucha heterogeneidad y de acuerdo a la distribución de los haplotipos para el haplogrupo C, se sugiere que la expansión de los Uto-Aztecán no fue resultado de una expansión de las comunidades causada por el desarrollo del cultivo de maíz en Mesoamérica. La expansión del pueblo gracias a la agricultura hubiera involucrado la migración de mujeres (por lo que las frecuencias de haplogrupos serían más homogéneas); por el contrario la distribución pudo ser causada por una expansión en el lenguaje y cultura más que por migración humana o por una migración predominantemente masculina (Malhi 2003).

Para entender un poco más acerca de las migraciones dentro del territorio mexicano la Universidad de Texas examinó 223 muestras de las ciudades de Juárez (123) y Ojinaga (100).

Las muestras fueron tomadas de la región cosmopolita para observar la frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en el norte del país en la actualidad. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Ciudad	Americana	Europea	Africana	Desconocida
Ojinaga	91 (91%)	3 (3%)	5 (5%)	1 (1%)
Juárez	108 (87.7%)	9 (7.3%)	5 (4.1%)	(1%)
TOTAL	199 (89.1%)	12 (5.4%)	10 (4.5%)	2 (1%)

Dentro de los haplogrupos nativo-americanos se obtuvo un 75% de haplogrupo A, 26.5% de haplogrupo B, 23.3% pertenecen al haplogrupo C y el 5.8% al haplogrupo D. Se realizó la secuenciación de las muestras identificando varios haplotipos. Estos fueron utilizados para realizar un árbol filogenético (presentado dentro del artículo).

De acuerdo con los resultados, se argumenta que la poca frecuencia de haplogrupos europeos dentro de la población mexicana se debe a la colonización (la mayor migración europea) y fue realizada mayormente por machos. Una alta frecuencia de haplogrupos africanos se debe observar en las regiones del Golfo de México.

La alta frecuencia de haplogrupos nativo-americanos y la baja frecuencia de haplogrupos de otro continente se debe a que las migraciones se han realizado principalmente por hombres (esclavos y conquistadores) por lo que no se refleja en el mtDNA (Green 2000) . Sería muy útil estudiar al cromosoma Y.

En el sureste mexicano se encuentran las ruinas de una de las cuatro grandes civilizaciones antiguas de Mesoamerica. Se analizaron restos de 25 individuos que pertenecen al periodo post-clásico de la civilización Maya localizada en Xcaret, Quintana Roo. Los resultados se compararon con los estudios hechos por Torroni en la Mixteca y por Merriwether que analizó restos de individuos Mayas del periodo clásico en la región de Copán, Honduras.

Comunidad	N	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	Otras
Xcaret	25	84	4	8	0	4
Copán	9	0	0	89	11	
Mayas actuales	27	51	22.2	14.8	7.4	3.7
Mixe	16	62.5	31.3	6.2	0	
Mixteca Alta	15	73.4	13.3	13.3	0	
Mixteca Baja	14	92.9	7.1	0	0	
Zapoteca	15	33.3	33.3	33.3	0	

Con a la información obtenida podemos realizar un mapa con la frecuencia de haplogrupos de acuerdo con las publicaciones hechas en revistas internacionales hasta el momento, estas son:



Figura 5.7 Frecuencias de haplogrupos nativo-americanos en México

IX. CONCLUSIONES

Las investigaciones del mtDNA no solo han contribuido a ampliar el conocimiento de éste sino el entender su relación con la evolución humana y patología asociada. El descubrimiento y clasificación de polimorfismos específicos (haplotipos) y su distribución mundial abrieron un amplio campo de estudio para entender la relación del *Homo sapiens* y los diferentes homínidos (actuales y ancestrales) y las migraciones humanas. Esto permite formular hipótesis de las variables que afectan la evolución génica con respecto al tiempo y a la región geográfica.

Estas investigaciones complementan los estudios realizados anteriormente con DNA nuclear y los hechos con marcadores metabólicos como albúmina, también complementa estudios realizados con otras ramas del conocimientos como son paleo-antropología y lingüística .

La realidad es que el vasto conocimiento que se ha obtenido no es suficiente para arrojar una ley o teoría acerca de la evolución humana (comprobable y repetible); sin embargo mientras más campos de estudios tengamos, más estaremos cerca de dilucidar que fue lo que ocurrió hace tanto tiempo. El mtDNA es una de éstas herramientas útiles gracias a sus características; herencia exclusiva vía materna, no se recombina (o en muy poco porcentaje), es fácilmente medible (en comparación con el nuclear) y presenta una alta tasa de mutación. Esto facilita su experimentación y presenta nuevos problemas a resolver .

Lamentablemente existen muy pocas investigaciones de haplogrupos en México, ya sea nativo-americanos o de otro tipo; y publicaciones internacionales (hechas en su mayoría por extranjeros) existen aún menos.

Las investigaciones realizadas en México de haplogrupos nativo-americanos se basan principalmente en su relación con la patología y no en sí con la evolución. Así, que el paso a seguir después de la información bibliográfica que recabada, sería realizar una experimentación que de como resultado la frecuencia de haplogrupos nativo-americanos en diferentes regiones del país, ya sea de pueblos indígenas o de la población en general y su relación con los haplogrupos en Norteamérica y Centroamérica. Analizando los resultados podríamos entender un poco más las migraciones de nativo-americanos del norte al sur de América y la diversidad génica con la que cuenta el país.

Una característica principal de las poblaciones humanas es que se mueven (migran). Una de las más antiguas migraciones de las que se tiene evidencia, es la expansión que sufrieron nuestros ancestros homínidos fuera de África, probablemente hace 1.8 mda y la segunda es la expansión fuera de África de los hombres modernos, probablemente hace 100,000 años (Shwiser 1994). Recientemente la atención se ha centrado en posteriores migraciones

Para entender la especie humana se requiere del conocimiento del porque , cuando y en donde ocurrieron dichos movimientos. Sin embargo, los estudios de reconstrucción de migraciones pasadas basados en su evidencia genética o fósiles es difícil y compleja. Las limitaciones en obtención de muestras debido a regiones o un mal análisis de los resultados obtenidos dificulta el análisis global de frecuencias de haplogrupos y su interpretación. Es así que surgen varios cuestionamientos acerca de los datos obtenidos y hay serios debates en cuando y cuantas migraciones se dieron fuera de África y fuera de Siberia.

Los numerosos estudios acerca de pueblos aborígenes, han demostrado que las ramas del árbol de mtDNA (compuestas por haplotipos o haplogrupos relacionados) son específicas de cada continente, aparentemente con muy poca mezcla de haplogrupos de mtDNA entre ellos (Wallace 1999). En Africa, los 3 haplogrupos más antiguos (L0, L1 y L2), quienes forman el macrohaplogrupo L, son específicos del sur del Sahara y se disgregaron formando el subhaplogrupo L3 (también específico de Africa). Los haplogrupos M y N se alojaron al noreste de Africa y con el paso del tiempo migraron para colonizar Europa y Asia (Quintana-Murci 1999). En Europa, los haplogrupos H, I, J, N1b, T, U, V, W y X conforman el 98% de todos los mtDNA's y derivan del macrohaplogrupo N.

En Asia los haplogrupos N y M contribuyeron en radiación génica con la formación de otros subhaplogrupos. Sin embargo, en Siberia cerca de las montañas Altai y el Rio Amur, solo seis haplogrupos (A, C, D, G, Z y Y) forman el 75% de todas las muestras, en contraste, en sur del Tibet y Corea los haplogrupos A, C y G representan solo el 14%; por lo que se deduce que tuvo que haber un enriquecimiento de estos haplogrupos a través del Centro de Asia a Siberia. En cuanto los haplogrupos nativo-americanos, solo 5 haplogrupos (A, B, C, D y X) forman el 100% de la variación génica. Haplogrupos A, C y D representan el 58% de los haplogrupos siberianos que cruzaron por el estrecho de Beringia para poblar América. El haplogrupo B posiblemente llegó más tarde, ya que este haplogrupo es realmente escaso en Siberia y no se encuentra al norte de Norteamérica. En Asia, B es encontrado principalmente a lo largo de la costa Asiática y en el Pacífico. Esto hace suponer que probablemente llegó a América por la costa (Schurr 2002).

Así, en el siguiente cuadro se resume el haplogrupo étnicamente específico, las mutaciones firma, el no. de haplotipos que contiene cada haplogrupo, la divergencia entre secuencias y la divergencia en tiempo estimado de antigüedad de los haplogrupos más representativos de cada continente:

Haplogrupo	Polimorfismos	No. de haplotipos	Divergencia secuencia	Divergencia tiempo
Africa:				
L	+3592 HpaI	55	.285	98,310-129,591 (?)
Asia:				
M	+10397 AluI	85	.161	55,517-73,181
Europa:				
H	-7025 AluI	45	.090	31,034-40,909
I	-1715 DdeI	9		25,517-33,636
	-4529 HaeII			
	+10028 AluI			
	+8249 AvaII			
	+16389 BamHI			
J	-13704 BstNI	9	.074	14,483-19,091
	-16065 HinfI			
K	-9052 HaeII	6	.039	13,448-17,727
América:				
A	+663 HaeIII	24	.075	25,862-34,091
B	9-bp-deletion	19	.034	11,724-15,456
C	+13262 AluI	25	.096	33,103-43,636
D	-5176 AluI	16	.053	22,414-29,445

?. Tiempo estimado altamente debatido

Modificado de Torroni 1994

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Adcock G, Dennis E., et al (2001). "Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implications for modern human origins". *Proc Natl Acad Sci* 98:537-542
2. Alvez-Silva J, da Silva M., et al (2000). "The ancestry of Brazilian mtDNA lineages". *Am J Hun Genet* 67:000-000
3. Ames BN, Shigenaga MK., (1992) "Oxidants are a mayor contributor to aging" *Proc Natl Acad Sci USA* 663:85-96
4. Anderson S, Bankier AT., et al (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome". *Nature* 290: 427-465
5. Andersson SG, Karlberg O., et al (2003). "On the origin of mitochondria: a genomics perspective" *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci Jan* 29;358(1429):165-77; discussion 177-9
6. Apoto.(2003)., sghms.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/mito.html
7. Babcock GT, Wikstorm M ., et al (1992) "Oxygen activation and conservation of energy in cell respiration" *Nature* 356:301-9
8. Barthelemy C, Hélène O., et al (2002). "D-loop mutations in mtDNA link with mtDNA depletion?". *Hum Gen* 110:479-487
9. Beinert H, Albracht SPJ (1982) "New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria" *Biochim Biophys Acta* 1982; 683: 245-77
10. Beltrán AG., (1994). "The slave trade in Mexico". *Hispanic Am Hist Rev* 24:412-431
11. Bert F, Corella A.,(2001). "Major mitochondrial DNA haplotype heterogeneity in highland and lowland Amerindian populations from Bolivia". *Hum Biol.* 2001 Feb;73(1):1-16
12. Bohinsky R. C. (1991) "Bioquímica". Ed. Addison-Wesley Iberoamericana.
13. Bonani, and Smith FH., et al (2002). "New research at the Neandertal type site in the Neander Valley of Germany." Paper presented at the Annual Meeting of the Paleo-antropologist Denver, Marzo 19-20, 2002.

14. Bonatto SL, Salzano FM.,(1997).” Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World” *Am J Hum Genet Dec*;61(6):1413-23
15. Boyer PD ., (1997).” The ATP synthase—a splendid molecular machine”. *Annu Rev Biochem* 66:717-49
16. Brehm A, Pereira L., et al (2003).” Mitochondrial portraits of the Madeira and Acores archipelagos witness different genetic pools of its settlers”. *Hum Genet. Sep* 25
17. Brunet M, Guy D., et al (2002).” A new hominid from the Upper Miocene of Chad, Central Africa”. *Nature* 418:145-151
18. Carreño M., (2003). ”Señalización inter-genómica”. Univ Complutense Madrid.
19. Castro-Gago M, Novo-Rodriguez MI., et al (2000).”[Mitochondrial encephalomiopathies]”. *Rev Neurol* 31(3):263-82
20. Cayton DA ., (1991). ”Nuclear Gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription”. *TIBS* 16-March-1991):107-111
21. Chang DD, Clayton DA., (1987).” A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication”. *EMBO J* 6:409-417
22. Chen X, Prosser R., et al (1995).” Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes”. *Am J Hum Genet* 57(2):239-247
23. Chen YS, Torroni A., (1995).” Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups”. *Am J Hum Genet Jul*;57(1):133-49
24. Chinnery PE, Howell N., et al (1998).”MELAS and MERF-The relationship between maternal mutation load and frequency of clinically affected offspring”. *Brain* 121:1889-1894
25. Chinnery PF, Jhonson MA., et al (2000).” The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations”. *Ann Neurol* 48(2): 188-93
26. Cunningham RP., (1997).”DNA repair: caretakers of the genome?” *Curr Biol* 7:R576-9

27. Darwin Ch., (1871). "El origen de las especies"
28. Darwin papers., (2003). [www. Darwin papers.com](http://www.Darwinpapers.com)
29. De Gomez-Poyou MT, Sandoval F, et al (1998) " Synthesis and release by soluble mitochondrial F1 in complex with its inhibitor " *Eur J Biochem* 255:303-8
30. Demarchi D, Panzetta-Dutari G., et al (2000). " MtDNA haplogroups in Amerindian populations from the Gran Chaco". *Am J Phy Antro* 115:199-203
31. Devivo DC, Hirano M ., et al (1996). "Mithochondrial disorders". *Handbook of Clinical Neurology* 389-449
32. Dolittle RF., (1998). "Microbial genomes opened up". *Nature* 392(6674): 339-42
33. Embeley TM, van der Geizen M., et al (2003). " Mitochondrial and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci Jan* 29;358 (1429):191-20
34. Enriquez JA, Chomyn A., et al (1995) "mtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacyclaction of tRNA(Lys) and premature translation termination". *Nat Gen* 10(1): 47-55
35. Friedlaender JS, Gentz F ., et al (2002). "A cautionary tale on ancient migration detection: mitochondrial DNA variation in Santa Cruz Islands, Solomon Islands". *Hum Biol Jun*;74(3):453-71
36. Froster P, Harding R., et al (1996). "Origin and Evolution of Native-Americans mtDNA variation: a reappraisal". *Am J Hum Genet* 59:935-945
37. Geneser F., (2002) "Histología". Ed. Panamericana
38. Geschwind and Galaburda., (1987) <http://www.serpentfd.org/b/5-environment>
39. González-Halphen D, Lindorfer MA et al (1988) "Subunit arrangement in beef complex II" *Biochem* 27:7021-31
40. González-Oliver A, Márquez-Morfín L., et al (2001). " Founding amerindian mtDNA lineages in Ancient Maya from Xcaret, Quintano Roo". *Am J Phy Anthro* 116:230-235

41. Goto YI, Tsugane K., et al (1994). "A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial myopathy, encephalopathy lactic acidosis, and stroke like episodes (MELAS)". *Biochim Biophys Res Commun* 202:1624-30
42. Gould ., (1977) <http://www.serpentfd.org/b/5-hormones>
43. Graham BH, Waymire KG., et al (1997). "A mouse model of mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator". *Nat Genet* 16:226-34
44. Gray MW, Burger G., et al (1999). "Mitochondrial evolution". *Science* 283(5407):1476-1481
45. Green D, Derr J., et al (2000). "mtDNA affinities of the peoples of North-Central México". *Am J Hum Genet* 66:989-998
46. Grossman LI, Lomax MI (1997) "Nuclear genes for cytochrome c oxidase" *Biochem Biophys* 1352:174-92
47. Guan MX, Enriquez, JA., et al (1998). "The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445 which affects tRNA^{Ser}(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression". *Mol Cell Biol.* 18 (10): 5868-5879
48. Hagerhall C. (1997) "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme" *Bioch Biophys* 1320:107-41
49. Haller RG, Henriksson KG., et al (1991). "Deficiency of skeletal muscle succinate dehydrogenase and aconitase". *J Clin Invest* 88:1197-206
50. Hanna A, Nelson IP., (1999). "Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases". *Cell Mol Life Sci* 55(5):691-706
51. Hansford RG., (1980). "Control of mitochondrial substrate oxidation" *Curr Top Bioenerget* 10: 217-278
52. Hasegawa M., et al (1993). "Toward a more accurate time scale for human mitochondrial DNA tree". *J Mol Evol* 37:347-354

53. Hassler ., (1992) <http://www.serpent.org/b/5-hormones>
54. Hirano M, Ricci E., et al (1992). " MELAS: an original case and clinical criteria for diagnosis". *Neuromusc Disor* 2:125-35
55. Historia Museo Na-Boloom, San Cristóbal de las Casas., Chiapas, México
56. Holt IJ, Harding AE., et al (1990). " A new mitochondrial disease associated with mtDNA heteroplasmy". *Am J Hum Genet* 46:428-33
57. Huoponen K, Schurr TG., (2001). "Mitochondrial DNA variation in an aboriginal Australian population: evidence for genetic isolation and regional differentiation". *Hum Immunol Sep*;62(9):954-69
58. Instituto Nacional Indigenista., [www. ini.gob.mx](http://www.ini.gob.mx)
59. Jansen RP., (2000). "Origin and persistence of the mitochondrial genome" *Hum Reprod* 15: 1-10
60. Jenuth JP, Peterson AC., et al (1996). "Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA". *Nat Genet* 14(2):146-151
61. Jorde LB, Bamshad MB., et al (1995). "Origins and affinities of modern humans: A comparison of mitochondrial and nuclear genetic data." *Am J Hum Gen* 57: 523-538.
62. Joseph JA, Villalobos R., et al (1996) " Increased sensitivity to oxidative stress and the loss of muscarinic receptor responsiveness in senescence" *NY Acad Sci* 786:112-9
63. Kadenbach B, Jarausch J et al (1983) "Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate gel electrophoretic procedure" *Anal Biochem* 129:517-21
64. Kaestle FA, Smith DG.,(2001). " Ancient mitochondrial DNA evidence for prehistoric population movement: the Numic expansion". *Am J Phys Anthropol.* May;115(1):1-12 May;115(1):1-12
65. Kerr JFR, Wyllie AH., et al (1972) "Apoptosis: a basic biological phenomenon in wide-range implications" *J Cancer* 26:239-43

66. Keyeux G, Rodas C., et al (2002). "Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Columbian Amerindian populations" *Hum Biol* Apr;74(2):211-33
67. Kivisild T, Rootsi S., et al (2003). "The genetic heritage of the earliest settlers persists both in Indian tribal and caste populations" *Am J Hum Genet.* 2003 Feb;72(2):313-32
68. Kivisild T, Tolk HV., et al (2002). "The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree". *Mol Biol Evol.* Oct 19(10):1737-51
69. Klotz IM., (1961). "Energy Changes in Biochemical reactions". NY Acad Press
70. Kobayasi M, Morishita H., et al (1987). "Two cases of NADH-coenzyme Q reductase deficiency: relationship to MELAS syndrome". *J Pediatr* 110:223-227
71. Krings M, Geisert H., et al (1999). "DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen". *Proc National Acad Sci* 96:5581-5585
72. Krings MC, Capelli F., et al (2000). "A view of Neandertal genetic diversity". *Nat Gen* 26:144-146
73. Kroger A, Klingenberg M. (1973) "The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to electron transport activity in the respiratory chain" *Eur J Biochem* 34:358-68
74. Kruse B, Narasimhan N., et al (1989). "Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination". *Cell* 58:391-397
75. Lalueza C, Pérez A., (1997). "Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia" *Hum Mol Genet* Jan;6(1):41-6
76. Lambert DM, Ritchie PA., et al (2002) "Rates of evolution in ancient DNA from Adélie penguins." *Science* 295: 2270-2273.

77. Lenaz G. (1998) "Role of mitochondria in oxidative stress and aging" *Biochem Biophys Acta* 1366:53-67
78. Lehninger, Nelson D, Cox M-. (2000) "Principles of Biochemistry" 3 ed. Ed. Worth Publishers
79. Leonard K, Wingfield P. et al (1981) " Three dimensional structure of ubiquinol: cytochrome c reductase" *J Mol Biol Chem* 256:2245-51
80. Lestienne P. (1992) " Mitochondrial mutations in human disease: a review." *Biochem* 74: 123-30
81. Lewin L (1996) "Genes IV". Oxford Univ Press
82. Liao HX, Spremulli LL., et al (1990)."Effects of length and mRNA secondary structure on the interaction of bovine mitochondrial ribosomes with messenger RNA". *J Biol Chem* 265:11761-11765
83. Lorenz JG, Smith DG.,(1997)." Distribution of sequence variation in the mtDNA control region of Native North Americans". *Hum Biol Dec*;69(6):749-76.
84. Luft R, Ikkos D., et al (1962)." A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlates clinical, biochemical and morphological study". *J Clin Invest* 41:1776-2118
85. Malhi R, Mortesen HM., et al (2003)."Native-American mtDNA prehistory in the American southwest". *Am J Phy Anthro* 120:108-124
86. Malyarchuk BA, Grzybowski T ., et al (2002)."Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians". *Ann Hum Genet Jul*;66(Pt 4):261-83
87. Malyarchuk BA, Grzybowski T., (2003)." Mitochondrial DNA variability in Bosnians and Slovenians" *Ann Hum Genet Sep*;67(PT5):412-25
88. Margulis L., (1981) "Symbiosis in cell evolution and its environment on the early earth". Freeman
89. Martin W, Muller M. (1998)." The hydrogen hypothesis for the first eukariote". *Nature* 392(6671): 37-41

90. Martinez JC, Toro-Labrador G., et al (2001). "mtDNA análisis reveals substantial native-americans ancestry in Puerto Rico" *Hum Biol.* Aug 73,4:491-511
91. Maruyama S, Minaguchi K., (). " Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic analysis of mtDNA lineages in the Japanese population" *Intl J Legal Med* Aug:117(4):218-25 Epub 2003 Jul 05
92. Merriwether DA, Rothhammer F., (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* Dec;98(4):411-30
93. Mogentale-Profizi N, Chollet L., (2001). " Mitochondrial DNA sequence diversity in two groups of Italian Veneto speakers from Veneto". *Ann Hum Genet Mar;65(Pt 2):153-66*
94. Montiel JF., (2002) "Variabilidad genética del clado mitocondrial KU y aztenozoospermia humana". Tesis doctoral. Univ de Zaragoza
95. Montoya J, Christianson T., et al (1982). "Identification of initiation sites for heavy strand and light strand transcription in human mitochondrial DNA". *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7195-7199
96. Montoya J., (2003). "Biogénesis y Patología Mitocondrial". FESC-4 UNAM
97. Moraes CT, DiMauro S., et al (1989). " Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome". *N Engl J Med* 320:1293-9
98. Morgan-Hughes JA, Schapira AHV., et al (1988). "Molecular defects of NADH-ubiquinone oxidoreductase in mitochondrial diseases". *J Bioenerg Biomembr* 20:365-82
99. Morten KJ, Cooper JM., et al (1993). " A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy". *Hum Mol Genet* 2:2081-7
100. Nekhaeva E, Bodvak ND., et al (2002). " Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individuals cells of human tissues". *Procc Nat Acad Sci* 99:5521-5526

101. Noji H, Yasuda R., et al (1997) "Direct observation of the rotation of F1-ATPase" *Nature* 386:299-302
102. Ohnishi T. (1987) "Structure of the succinate-ubiquinone reductase (complex II)" *Bioenerg* 15:37-65
103. Ojala D, Montoya J., et al (1981). "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria". *Nature* 290(5806):470-474
104. Ozawa M, Nishino I., et al (1997). "Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: a G→A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tRNA_{Lys} in two families". *Muscle Nerve* 20:271-8
105. Parson TJ., et al (1997). "A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region". *Nat Gen* 15:363-3
106. Pilbeam D., (1970). "The evolution of man". Oxford Univ Press
107. Pinkington S. J., Arizmendi JM, et al. (1993) "Structural organization of complex I from bovine mitochondria" *Biochem Soc Trans* 21:26-31
108. Quintana-Murci L, Semino O., et al (1999) "Genetic Evidence of an early of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa" *Nat Genet* Dec 23(4): 437-41
109. Relethford JH., (2001). "Absence of regional affinities of Neandertal DNA with living humans does not reject multiregional evolution". *Am J Phys Antrop* 115:95-98
110. Riodan-Eva P, Harding AE., et al (1995). "Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations". *J Med Genet* 32:81-7
111. Rocco P, Morales C., (2002). "[Genetic composition of the Chilean population. Analysis of mitochondrial DNA polymorphism]" *Rev Med Chil* Feb;130(2):125-31
112. Rodriguez-Delfin LA, Rubin-de-Celis VE., (2001). "Genetic diversity in an Andean population from Peru and regional migration patterns of Amerindians in South America: data from Y chromosome and mitochondrial DNA". *Hum Hered* 51(1-2):97-106

113. Sambongi Y, Iko Y, et al (1999) "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthetase F0F1:direct observation." *Science* 286:1722-4
114. Santonelli FM, Shanske S., et al (1993)." The mutation at nt8993 of mtDNA is a common cause of Leigh's syndrome". *Ann Neurol* 34:827-34
115. Santos M, Barrantes R.,(1994)."D-loop mtDNA deletion as a unique marker of Chibchan A merindians". *Am J Hum Genet* 55:413-414
116. Schatz G.,(1991)." The mitochondrial protein import machinery". New York: Raven. 57-74
117. Schurr TG, Ballinger SW, et al (1990)."Amerindian mitochondrial DNA's have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages" *Am J Hum Genet* 46:613-623
118. Schurr TG, Wallace DC., et al (2002) "mtDNA diversity in Southeast Asian population" *Hum Biol Jun* 74 (3):431-52
119. Shigenaga MJ, Hagen TM, et al (1998) "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging" *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10771-8
120. Shimohama S, Fujimoto S, et al (1998) "Diferencial expression of the rat brain synaptic protein in development and aging" *Biochem Biophys* 251:394-8
121. Shoffner JM, Lott M.T., et al (1990)."Myoclonic epelipsy and regges-red fiber disease (MERFF) is associated with mitochondrial DNA tRNA^{LYS} mutation.". *Cell* 61:931-937
122. Shoffner JM, Lott MT., et al (1990)." Myoclonic epilepsy and regged-red fiber disease (MERR) is associated with a mtDNA tRNA^{lys} mutation". *Cell* 61:931-7
123. Silva WA Jr, Bonatto SL., (2002). "Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America". *Am J Hum Genet Jul*;71(1):187-92. Epub 2002 Mayo 17.
124. Silvestri G, Moraes CT., et al (1992)." A new mtDNA mutation in the tRNA lys associated with MERRF". *Am J Hum Genet* 51:1213-7

125. Snall N, Savontaus M., et al (2002). "A rare mitochondrial DNA haplotype observed in Koreans". *Hum Biol* Apr;74(2):253-62
126. Stone AC, Stoneking M.,(1999). " Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Jan 29;354(1379):153-9
127. Stoneking M., (2000). " Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots". *Am J Hum Gen* 67:1029-1032
128. Sukernik RI, Shur TG., (1996). "[Mitochondrial DNA variation in native inhabitants of Siberia with reconstructions of the evolutionary history of the American Indians. Restriction polymorphism]". *Genetika* Mar;32(3):432-9
129. Swisher., et al (1994). " Age of the earliest know hominids in Java, Indonesia" *Science* Feb 25;263 (5150): 1118-21
130. Tattersall Ian ., (1995). "The fossil trail". Oxford Univ Press Schmitz, R.W., G.
131. Thomas D., (2000) "Bioquímica". Ed. Reverté. 3° ed.
132. Torroni A, Lott MT., et al (1994). "mtDNA Clock for the Amerinds and its implications for timing their entry into North-America". *Proc Natl Acad Sci USA* 91(3):1158-1162
133. Torroni A, Wallace DC., (1995). " MtDNA haplogroups in Native Americans". *Am J Hum Genet* May;56(5):1234-8
134. Torroni A., (2003). "mtDNA haplogroups in human populations and disease studies"
135. Torroni A, Miller., et al (1994) "mtDNA análisis in Tibet: implication for the origin of the Tibetan population and this adaptation to high altitude" *Am J Phys Anthropol* Feb 93 (2); 189-99
136. van Hellmond JJ, van der Klei A., et al (2003). "Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Jan 29;358 (1429):205-13
137. Vázquez ME, Tuena M., (2002) "Mitocondria". Ed. Prado

138. Velot C, Mixon MB., et al (1997). "Model of quinary structure between Krebs cycle enzymes: a model" *Biochemistry* 36,14,271-14,276
139. Vinogradov AD. (1993) "Kinetics, control and mechanism of ubiquinone reduction by mammalian respiratory chain-linked NADH-ubiquinone reductase" *J Bionerg Biom* 25:367-75
140. Wagner JR, Hu CC., et al (1992) "Endogenous oxidative damage of deocystidine in DNA" *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3380-4
141. Wallace DC, Singh G., et al (1999) "Mitochondrial DNA variation in human evolution disease". *Gene*.238(1):211-230
142. Wallace DC., (1997). "Mitochondrial DNA in aging and disease". *Sci Am* 277:40-7
143. Wilson A, Silvia Jr., et al (2002). "Mitochondrial genome diversity of Native-Americans supports a Single Early Entry of founder populations into America" *Am J Hum Genet* 71:187-192
144. Wiuf C., (2001). "Recombination in human mitochondrial DNA ?". *Genetics* 159:749-756
145. Wolpoff, Milford H., (1999). "Paleo-anthropology" 2nd ed. Boston: McGraw-Hill.
146. Yan LJ, Sohal RS (1998) "Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging" *Natl Acad Sci USA* 95:12896-901
147. Yang MY, Bowmaker M., et al (2002). "Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand asymmetric DNA replication" *Cell* Nov 15;111(4):495-505
148. Yu CA, Yu L. (1987) "The nature of ubiquinone binding sites in the mitochondrial electron transfer complexes" *Span Sci Sec Pres* 81-99
149. Zeviani M., Moraes CT., et al (1988). "Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome.". *Neurology* 38:1339-1346

150. Adcock G, Dennis E., et al (2001). "Mitochondrial DNA sequences in ancient Australians: Implications for modern human origins". *Proc Natl Acad Sci* 98:537-542
151. Alvez-Silva J, da Silva M., et al (2000). "The ancestry of Brazilian mtDNA lineages". *Am J Hun Genet* 67:000-000
152. Ames BN, Shigenaga MK., (1992) "Oxidants are a mayor contributor to aging" *Proc Natl Acad Sci USA* 663:85-96
153. Anderson S, Bankier AT., et al (1981). "Sequence and organization of the human mitochondrial genome". *Nature* 290: 427-465
154. Andersson SG, Karlberg O., et al (2003). "On the origin of mitochondria: a genomics perspective" *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci Jan 29;358(1429):165-77; discussion 177-9*
155. Apoto.(2003),
sghms.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/mito.html
156. Babcock GT, Wikstorm M ., et al (1992) "Oxygen activation and conservation of energy in cell respiration" *Nature* 356:301-9
157. Barthelemy C, Hélène O., et al (2002). "D-loop mutations in mtDNA link with mtDNA depletion?". *Hum Gen* 110:479-487
158. Beinert H, Albracht SPJ (1982) "New insights, ideas and unanswered questions concerning iron-sulfur clusters in mitochondria" *Biochim Biophys Acta* 1982; 683: 245-77
159. Beltrán AG., (1994). "The slave trade in Mexico". *Hispanic Am Hist Rev* 24:412-431
160. Bert F, Corella A.,(2001). "Major mitochondrial DNA haplotype heterogeneity in highland and lowland Amerindian populations from Bolivia". *Hum Biol.* 2001 Feb;73(1):1-16
161. Bohinsky R. C. (1991) "Bioquímica". Ed. Addison-Wesley Iberoamericana.
162. Bonani, and Smith FH., et al (2002). "New research at the Neandertal type site in the Neander Valley of Germany." Paper presented at the Annual Meeting of the Paleo-antropologist Denver, Marzo 19-20, 2002.

163. Bonatto SL, Salzano FM.,(1997).“ Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World” *Am J Hum Genet* Dec;61(6):1413-23
164. Boyer PD ., (1997).“ The ATP synthase—a splendid molecular machine”. *Annu Rev Biochem* 66:717-49
165. Brehm A, Pereira L., et al (2003).“ Mitochondrial portraits of the Madeira and Acores archipelagos witness different genetic pools of its settlers”. *Hum Genet.* Sep 25
166. Brunet M, Guy D., et al (2002).“ A new hominid from the Upper Miocene of Chad, Central Africa”. *Nature* 418:145-151
167. Carreño M., (2003). “Señalización inter-genómica”. Univ Complutense Madrid.
168. Castro-Gago M, Novo-Rodriguez ML., et al (2000).“[Mitochondrial encephalomyopathies]”. *Rev Neurol* 31(3):263-82
169. Cayton DA ., (1991). “Nuclear Gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription”. *TIBS* 16-March-1991):107-111
170. Chang DD, Clayton DA., (1987).“A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication”. *EMBO J* 6:409-417
171. Chen X, Prosser R., et al (1995).“ Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes”. *Am J Hum Genet* 57(2):239-247
172. Chen YS, Torroni A., (1995).“ Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups”. *Am J Hum Genet* Jul;57(1):133-49
173. Chinnery PE, Howell N., et al (1998).“MELAS and MERF-The relationship between maternal mutation load and frequency of clinically affected offspring”. *Brain* 121:1889-1894
174. Chinnery PF, Jhonson MA., et al (2000).“ The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations”. *Ann Neurol* 48(2): 188-93
175. Cunningham RP., (1997).“DNA repair: caretakers of the genome?” *Curr Biol* 7:R576-9

176. Darwin Ch., (1871). " El origen de las especies"
177. Darwin papers., (2003). [www. Darwin papers.com](http://www.Darwinpapers.com)
178. De Gomez-Poyou MT, Sandoval F, et al (1998) " Synthesis and release by soluble mitochondrial F1 in complex with its inhibitor " *Eur J Biochem* 255:303-8
179. Demarchi D, Panzetta-Dutari G., et al (2000). " MtDNA haplogroups in Amerindian populations from the Gran Chaco". *Am J Phy Antro* 115:199-203
180. Devivo DC, Hirano M ., et al (1996). "Mithochondrial disorders". *Handbook of Clinical Neurology* 389-449
181. Dolittle RF., (1998). "Microbial genomes opened up". *Nature* 392(6674): 339-42
182. Embeley TM, van der Geizen M., et al (2003). " Mitochondrial and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Jan 29;358 (1429):191-20
183. Enriquez JA, Chomyn A., et al (1995) "mtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacyclation of tRNA(Lys) and premature translation termination". *Nat Gen* 10(1): 47-55
184. Friedlaender JS, Gentz F ., et al (2002). "A cautionary tale on ancient migration detection: mitochondrial DNA variation in Santa Cruz Islands, Solomon Islands". *Hum Biol Jun*;74(3):453-71
185. Froster P, Harding R., et al (1996). "Origin and Evolution of Native-Americans mtDNA variation: a reappraisal". *Am J Hum Genet* 59:935-945
186. Geneser F., (2002) "Histología". Ed. Panamericana
187. Geschwind and Galaburda., (1987) <http://www.serpentfd.org/b/5-environment>
188. González-Halphen D, Lindorfer MA et al (1988) "Subunit arrangement in beef complex II" *Biochem* 27:7021-31
189. González-Oliver A, Márquez-Morfín L., et al (2001). " Founding amerindian mtDNA lineages in Ancient Maya from Xcaret, Quintano Roo". *Am J Phy Anthro* 116:230-235

190. Goto YI, Tsugane K., et al (1994). "A new point mutation at nucleotide pair 3291 of the mitochondrial myopathy, encephalopathy lactic acidosis, and stroke like episodes (MELAS)". *Biochim Biophys Res Commun* 202:1624-30
191. Gould ., (1977) <http://www.serpentfd.org/b/5-hormones>
192. Graham BH, Waymire KG., et al (1997). "A mouse model of mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator". *Nat Genet* 16:226-34
193. Gray MW, Burger G., et al (1999). "Mitochondrial evolution". *Science* 283(5407):1476-1481
194. Green D, Derr J., et al (2000). "mtDNA affinities of the peoples of North-Central México". *Am J Hum Genet* 66:989-998
195. Grossman LI, Lomax MI (1997) "Nuclear genes for cytochrome c oxidase" *Biochem Biophys* 1352:174-92
196. Guan MX, Enriquez, JA., et al (1998). "The deafness-associated mitochondrial DNA mutation at position 7445 which affects tRNA^{Ser}(UCN) precursor processing, has long-range effects on NADH dehydrogenase subunit ND6 gene expression". *Mol Cell Biol.* 18 (10): 5868-5879
197. Hagerhall C. (1997) "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme" *Bioch Biophys* 1320:107-41
198. Haller RG, Henriksson KG., et al (1991). "Deficiency of skeletal muscle succinate dehydrogenase and acontinase". *J Clin Invest* 88:1197-206
199. Hanna A, Nelson IP., (1999). "Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases". *Cell Mol Life Sci* 55(5):691-706
200. Hansford RG., (1980). "Control of mitochondrial substrate oxidation" *Curr Top Bioenerget* 10: 217-278
201. Hasegawa M., et al (1993). "Toward a more accurate time scale for human mitochondrial DNA tree". *J Mol Evol* 37:347-354

202. Hassler ., (1992) <http://www.serpent.org/b/5-hormones>
203. Hirano M, Ricci E., et al (1992). " MELAS: an original case and clinical criteria for diagnosis". *Neuromusc Disor* 2:125-35
204. Historia Museo Na-Boloom, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México
205. Holt IJ, Harding AE., et al (1990). " A new mitochondrial disease associated with mtDNA heteropiasy". *Am J Hum Genet* 46:428-33
206. Huoponen K, Schurr TG., (2001). "Mitochondrial DNA variation in an aboriginal Australian population: evidence for genetic isolation and regional differentiation". *Hum Immunol Sep*;62(9):954-69
207. Instituto Nacional Indigenista., [www. ini.gob.mx](http://www.ini.gob.mx)
208. Jansen RP., (2000). "Origin and persistence of the mitochondrial genome" *Hum Reprod* 15: 1-10
209. Jenuth JP, Peterson AC., et al (1996). "Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA". *Nat Genet* 14(2):146-151
210. Jorde LB, Bamshad MB., et al (1995). "Origins and affinities of modern humans: A comparison of mitochondrial and nuclear genetic data." *Am J Hum Gen* 57: 523-538.
211. Joseph JA, Villalobos R., et al (1996) " Increased sensivity to oxidative stress and the loss of muscarinic receptor responsiveness in senescence" *NY Acad Sci* 786:112-9
212. Kadenbach B, Jarausch J et al (1983) "Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polipeptides by a sodium dodecyl sulfate gel electrophoretic procedure" *Anal Biochem* 129:517-21
213. Kaestle FA, Smith DG.,(2001). " Ancient mitochondrial DNA evidence for prehistoric population movement: the Numic expansion". *Am J Phys Anthropol.* May;115(1):1-12 May;115(1):1-12
214. Kerr JFR, Wyllie AH., et al (1972) "Apoptosis: a basic biological phenomenon in wide-range implications implications in tissue kinetics" *J Cancer* 26:239-43

215. Keyeux G, Rodas C., et al (2002). "Possible migration routes into South America deduced from mitochondrial DNA studies in Columbian Amerindian populations" *Hum Biol* Apr;74(2):211-33
216. Kivisild T, Rootsi S., et al (2003). "The genetic heritage of the earliest settlers persists both in Indian tribal and caste populations" *Am J Hum Genet.* 2003 Feb;72(2):313-32
217. Kivisild T, Tolk HV., et al (2002). "The emerging limbs and twigs of the East Asian mtDNA tree". *Mol Biol Evol.* Oct 19(10):1737-51
218. Klotz IM., (1961). "Energy Changes in Biochemical reactions". NY Acad Press
219. Kobayasi M, Morishita H., et al (1987). "Two cases of NADH-coenzyme Q reductase deficiency: relationship to MELAS syndrome". *J Pediatr* 110:223-227
220. Krings M, Geisert H., et al (1999). "DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen". *Proc National Acad Sci* 96:5581-5585
221. Krings MC, Capelli F., et al (2000). "A view of Neandertal genetic diversity". *Nat Gen* 26:144-146
222. Kroger A, Klingenberg M. (1973) "The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to electron transport activity in the respiratory chain" *Eur J Biochem* 34:358-68
223. Kruse B, Narasimhan N., et al (1989). "Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination". *Cell* 58:391-397
224. Lalueza C, Pérez A., (1997). "Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct Aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia" *Hum Mol Genet* Jan;6(1):41-6
225. Lambert DM, Ritchie PA., et al (2002) "Rates of evolution in ancient DNA from Adélie penguins." *Science* 295: 2270-2273.

226. Lenaz G. (1998) "Role of mitochondria in oxidative stress and aging" *Biochem Biophys Acta* 1366:53-67
227. Lehninger, Nelson D, Cox M-. (2000) "Principles of Biochemistry" 3 ed. Ed. Worth Publishers
228. Leonard K, Wingfield P. et al (1981) " Three dimensional structure of ubiquinol: cytochrome c reductase" *J Mol Biol Chem* 256:2245-51
229. Lestienne P. (1992) " Mitochondrial mutations in human disease: a review." *Biochem* 74: 123-30
230. Lewin L (1996) "Genes IV". Oxford Univ Press
231. Liao HX, Spremulli LL., et al (1990). "Effects of length and mRNA secondary structure on the interaction of bovine mitochondrial ribosomes with messenger RNA". *J Biol Chem* 265:11761-11765
232. Lorenz JG, Smith DG.,(1997). " Distribution of sequence variation in the mtDNA control region of Native North Americans". *Hum Biol Dec;69(6):749-76.*
233. Luft R, Ikkos D., et al (1962). " A case of severe hypermetabolism of non-thyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlates clinical, biochemical and morphological study". *J Clin Invest* 41:1776-2118
234. Malhi R, Mortesen HM., et al (2003). "Native-American mtDNA prehistory in the American southwest". *Am J Phy Anthro* 120:108-124
235. Malyarchuk BA, Grzybowski T., et al (2002). "Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians". *Ann Hum Genet Jul;66(Pt 4):261-83*
236. Malyarchuk BA, Grzybowski T., (2003). " Mitochondrial DNA variability in Bosnians and Slovenians" *Ann Hum Genet Sep;67(PT5):412-25*
237. Margulis L., (1981) "Symbiosis in cell evolution and its environment on the early earth". Freeman
238. Martin W, Muller M. (1998). " The hydrogen hypothesis for the first eukariote". *Nature* 392(6671): 37-41

239. Martínez JC, Toro-Labrador G., et al (2001). "mtDNA análisis reveals substantial native-americans ancestry in Puerto Rico" *Hum Biol.* Aug 73,4:491-511
240. Maruyama S, Minaguchi K., (). " Sequence polymorphisms of the mitochondrial DNA control region and phylogenetic analysis of mtDNA lineages in the Japanese population" *Intl J Legal Med* Aug;117(4):218-25 Epub 2003 Jul 05
241. Merriwether DA, Rothhammer F., (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* Dec;98(4):411-30
242. Mogentale-Profizi N, Chollet L., (2001). " Mitochondrial DNA sequence diversity in two groups of Italian Veneto speakers from Veneto". *Ann Hum Genet* Mar;65(Pt 2):153-66
243. Montiel JF., (2002) "Variabilidad genética del clado mitocondrial KU y aztenozoospermia humana". Tesis doctoral. Univ de Zaragoza
244. Montoya J, Christianson T., et al (1982). "Identification of initiation sites for heavy strand and light strand transcription in human mitochondrial DNA". *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7195-7199
245. Montoya J., (2003). "Biogénesis y Patología Mitocondrial". FESC-4 UNAM
246. Moraes CT, DiMauro S., et al (1989). " Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome". *N Engl J Med* 320:1293-9
247. Morgan-Hughes JA, Schapira AHV., et al (1988). "Molecular defects of NADH-ubiquinone oxidoreductase in mitochondrial diseases". *J Bioenerg Biomembr* 20:365-82
248. Morten KJ, Cooper JM., et al (1993). " A new point mutation associated with mitochondrial encephalomyopathy". *Hum Mol Genet* 2:2081-7
249. Nekhaeva E, Bodvak ND., et al (2002). " Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individuals cells of human tissues". *Procc Nat Acad Sci* 99:5521-5526

250. Noji H, Yasuda R., et al (1997) "Direct observation of the rotation of F1-ATPase" *Nature* 386:299-302
251. Ohnishi T. (1987) "Structure of the succinate-ubiquinone reductase (complex II)" *Bioenerg* 15:37-65
252. Ojala D, Montoya J., et al (1981). "tRNA punctuation model of RNAprocessing in human mitochondria". *Nature* 290(5806):470-474
253. Ozawa M, Nishino I ., et al (1997). " Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers: a G→A mutation at nucleotide pair 8363 in mitochondrial tRNALys in two families". *Muscle Nerve* 20:271-8
254. Parson TJ., et al (1997). "A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region". *Nat Gen* 15:363-3
255. Pilbean D ., (1970). "The evolution of man". Oxford Univ Press
256. Pinkington S. J., Arizmendi JM, et al. (1993) "Structural organization of complex I from bovine mitochondria" *Biochem Soc Trans* 21:26-31
257. Quintana-Murci L, Semino O., et al (1999) "Genetic Evidence of an early of Homo sapiens sapiens from Africa through eastern Africa" *Nat Genet* Dec 23(4): 437-41
258. Relethford JH., (2001). " Absence of regional affinities of Neandertal DNA with living humans does not reject multiregional evolution". *Am J Phys Antrop* 115:95-98
259. Riodan-Eva P, Harding AE., et al (1995). " Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of differente mitochondrial DNA mutations". *J Med Genet* 32:81-7
260. Rocco P, Morales C., (2002). "[Genetic composition of the Chilean population. Analysis of mitochondrial DNA polymorphism]" *Rev Med Chil* Feb;130(2):125-31
261. Rodriguez-Delfin LA, Rubin-de-Celis VE., (2001). "Genetic diversity in an Andean population from Peru and regional migration patterns of Amerindians in South America: data from Y chromosome and mitochondrial DNA". *Hum Hered* 51(1-2):97-106

262. Sambongi Y, Iko Y, et al (1999) "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthetase F0F1:direct observation." *Science* 286:1722-4
263. Santonelli FM, Shanske S., et al (1993)." The mutation at nt8993 of mtDNA is a common cause of Leigh's syndrome". *Ann Neurol* 34:827-34
264. Santos M, Barrantes R.,(1994)."D-loop mtDNA deletion as a unique marker of Chibchan A merindians". *Am J Hum Genet* 55:413-414
265. Schatz G.,(1991)." The mitochondrial protein import machinery". New York: Raven. 57-74
266. Schurr TG, Ballinger SW, et al (1990)."Amerindian mitochondrial DNA's have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages" *Am J Hum Genet* 46:613-623
267. Schurr TG, Wallace DC., et al (2002) "mtDNA diversity in Southeast Asian population" *Hum Biol Jun* 74 (3):431-52
268. Shigenaga MJ, Hagen TM, et al (1998) "Oxidative damage and mitochoendrial decay in aging" *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10771-8
269. Shimohama S, Fujimoto S, et al (1998) "Diferencial expression of the rat brain synaptic protein in development and aging" *Biochem Biophys* 251:394-8
270. Shoffner JM, Lott M.T., et al (1990)."Myoclonic epelipsy and regges-red fiber disease (MERFF) is associated with mitochondrial DNA tRNA^{LYS} mutation.". *Cell* 61:931-937
271. Shoffner JM, Lott MT., et al (1990)." Myoclonic epilepsy and regged-red fiber disease (MERR) is associated with a mtDNA tRNA^{lys} mutation". *Cell* 61:931-7
272. Silva WA Jr, Bonatto SL., (2002). "Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America". *Am J Hum Genet Jul*;71(1):187-92. Epub 2002 Mayo 17.
273. Silvestri G, Moraes CT., et al (1992)." A new mtDNA mutation in the tRNA lys associated with MERRF". *Am J Hum Genet* 51:1213-7

274. Snall N, Savontaus M., et al (2002). "A rare mitochondrial DNA haplotype observed in Koreans". *Hum Biol* Apr;74(2):253-62
275. Stone AC, Stoneking M.,(1999). " Analysis of ancient DNA from a prehistoric Amerindian cemetery" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Jan 29;354(1379):153-9
276. Stoneking M., (2000). " Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots". *Am J Hum Gen* 67:1029-1032
277. Sukernik RI, Shur TG., (1996). "[Mitochondrial DNA variation in native inhabitants of Siberia with reconstructions of the evolutionary history of the American Indians. Restriction polymorphism]". *Genetika* Mar;32(3):432-9
278. Swisher., et al (1994). " Age of the earliest know hominids in Java, Indonesia" *Science* Feb 25;263 (5150): 1118-21
279. Tattersall Ian ., (1995). "The fossil trail". Oxford Univ Press Schmitz, R.W., G.
280. Thomas D., (2000) "Bioquímica". Ed. Reverté. 3° ed.
281. Torroni A, Lott MT., et al (1994). "mtDNA Clock for the Amerinds and its implications for timing their entry into North-America". *Proc Natl Acad Sci USA* 91(3):1158-1162
282. Torroni A, Wallace DC., (1995). " MtDNA haplogroups in Native Americans". *Am J Hum Genet* May;56(5):1234-8
283. Torroni A., (2003). "mtDNA haplogroups in human populations and disease studies"
284. Torroni A, Miller., et al (1994) "mtDNA análisis in Tibet: implication for the origin of the Tibetan population and this adaptation to high altitude" *Am J Phys Anthropol* Feb 93 (2); 189-99
285. van Hellmond JJ, van der Klei A., et al (2003). "Biochemical and evolutionary aspects of anaerobically functioning mitochondria". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Jan 29;358 (1429):205-13
286. Vázquez ME, Tuena M., (2002) "Mitocondria". Ed. Prado

287. Velot C, Mixon MB., et al (1997). "Model of quinary structure between Krebs cycle enzymes: a model" *Biochemistry* 36,14,271-14,276
288. Vinogradov AD. (1993) "Kinetics, control and mechanism of ubiquinone reduction by mammalian respiratory chain-linked NADH-ubiquinone reductase" *J Bionerg Biom* 25:367-75
289. Wagner JR, Hu CC., et al (1992) "Endogenous oxidative damage of deocystidine in DNA" *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3380-4
290. Wallace DC, Singh G., et al (1999) "Mitochondrial DNA variation in human evolution disease". *Gene*.238(1):211-230
291. Wallace DC., (1997)." Mitochondrial DNA in aging and disease". *Sci Am* 277:40-7
292. Wilson A, Silvia Jr., et al (2002)." Mitochondrial genome diversity of Native-Americans supports a Single Early Entry of founder populations into America" *Am J Hum Genet* 71:187-192
293. Wiuf C., (2001)."Recombination in human mitochondrial DNA ?". *Genetics* 159:749-756
294. Wolpoff, Milford H., (1999)." Paleo-antropology" 2nd ed. Boston: McGraw-Hill.
295. Yan LJ, Sohal RS (1998) " Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging" *Natl Acad Sci USA* 95:12896-901
296. Yang MY, Bowmaker M ., et al (2002). "Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand asymmetric DNA replication" *Cell* Nov 15;111(4):495-505
297. Yu CA, Yu L. (1987) " The natureof ubiquinone binding sites in the mitochondrial electron transfer complexes" *Span Sci Sec Pres* 81-99
298. Zeviani M., Moraes CT., et al (1988)."Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome.". *Neurology* 38:1339-1346

NON LA FORZA, MA LA COSTANZA DI UN ALTRO SENTIMENTO
FA GLI UOMINI SUPERORI

FWN