

00346



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

15

**HAPLOGRUPOS EN EL mt DNA EN POBLACIONES
INDIGENAS MEXICANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A :

Q.C. IRMA MENDOZA CAMARILLO

289671

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

CO-DIRECTOR DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GOMEZ

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE GENETICA MOLECULAR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN GENETICA HUMANA, HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS; BAJO LA DIRECCION DEL DR. DIEGO JULIO ARENAS A. Y EL DR. FABIO ABDEL SALAMANCA.

DEDICATORIA A:

DIOS

MI MADRE

y

MI PADRE

A TI EVER POR TU CARIÑO

A MIS HERMANOS

y

A MIS SOBRINOS

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez, por permitirme realizar el trabajo de investigación y por sus enseñanzas.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda, por su apoyo profesional y amistad.

A mis grandes amigos: Maricela, Samuel, Lolita, Xochitl y Juan Carlos.

A mis compañeros de laboratorio: Astrid, Vicky, Elena y Boris.

A la Dra. Leonora Buentello por su amabilidad y por proporcionarme las muestras.

Al Dr. Alfonso Miguel Torre Blanco, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Diego Julio Arenas Aranda, Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa, Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez, Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, Dr. Rubén Lisker Yorkowitz, por la revisión crítica del presente trabajo.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), al Sistema Nacional de Investigadores (SIN), por las becas de apoyo recibidas para la realización de esta tesis.

INDICE

RESUMEN.....	I
1.INTRODUCCION.....	1
A. Genoma mitocondrial.....	1
1. Estructura y contenido genético.....	1
2. Replicación del DNA mitocondrial.....	2
3. Transcripción.....	4
4. Mutaciones en el DNA mitocondrial.....	4
B. Herencia mitocondrial.....	4
1. Segregación replicativa.....	5
C. Polimorfismo en el DNA.....	6
D. Pobladores de América.....	6
1.- Variación en el mtDNA en indígenas de América.....	7
2.- Región D-loop.....	8
3.- Distribución de los haplogrupos.....	9
4.- Deleción de 9 pb.....	9
5.- Diversidad en los cuatro haplogrupos.....	10
E. Haplogrupo X.....	11
F. Cromosoma Y.....	12
1. Distribución geográfica de los haplotipos del cromosoma Y.....	12
G. Poblaciones indígenas mexicanas.....	13
1. Mixtecos.....	13
2. Zapotecos.....	13
3. Otomíes.....	14
II. Objetivos.....	16
1.- Objetivo general.....	16
2.- Objetivos particulares.....	16

III. Justificación.....	16
IV. Sujetos.....	17
A. Criterios de inclusión.....	17
V. Métodos.....	17
A.. Aislamiento del DNA genómico.....	17
B.- Amplificación de regiones polimórficas del mtDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
C.- Purificación de los productos amplificados.....	21
D.- Digestión de los productos amplificados.....	21
VI. Resultados.....	27
VII. Discusión.....	42
VII. Referencias.....	48

RESUMEN

El DNA mitocondrial es una molécula de DNA extranuclear, el patrón de herencia se caracteriza por una transmisión materna. La tasa de mutación es más elevada que el DNA nuclear y no presenta recombinación, lo que provee puntos de comparación que pueden trazar una relación ancestral en diferentes poblaciones. La variación genética en la secuencia del DNA mitocondrial (mtDNA), permite comparar diferentes poblaciones separadas geográficamente, mediante los cambios en los patrones de restricción en diferentes regiones del mtDNA. Se postula que los indígenas americanos, derivan de al menos uno de los linajes maternos (haplogrupos) presentes en Asia (Torroni *et al.*, 1992).

En el presente trabajo se determinó la distribución de los subhaplogrupos en 74 indígenas pertenecientes a diferentes grupos étnicos como la Mixteca alta, baja y costa, Zapoteco y Otomí. Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el DNA amplificado se sometió a restricción con diferentes endonucleasas para definir los diferentes subhaplogrupos.

Las poblaciones analizadas de la Mixteca alta, la Mixteca baja y de la costa, a pesar de ubicarse en regiones geográficas contiguas mostraron diferencias en los subhaplogrupos. La Mixteca alta mostraron los subhaplogrupos A1, A2, C2 y la Mixteca baja fueron los subhaplogrupos A1, A2, C2 y D2, y en la Mixteca costa mostraron los subhaplogrupos A2, C2 y D2. Estas poblaciones mencionadas anteriormente, mostraron otros subhaplogrupos que pudiera ser el subhaplogrupo B1 y B2. En las tres poblaciones los subhaplogrupos ausentes fueron el C1 y D1.

Es de interés presentar resultados de la población Otomí, debido a que no existen informes de subhaplogrupos en esta población. Los resultados obtenidos fueron los subhaplogrupos A1, A2, C1, C2, D1, D2 y otros subhaplogrupos que pudieran ser B1 y B2.

La población Zapoteca, muestra los subhaplogrupos A2, C1 y posiblemente B1 y B2, están ausentes los subhaplogrupos A1, C2, D1 y D2. Esta población muestra similitud con la población Mixteca alta, con respecto a la ausencia de los subhaplogrupos D1 y D2.

El subhaplogrupo más frecuente en las poblaciones analizadas fue A2 (41.89%) y el menos frecuente fue el D1 (2.70%). Sin embargo, sería de interés ampliar en estudios posteriores un mayor número de muestras.

Nuestros datos sugieren que existe una gran heterogeneidad en los individuos de las poblaciones indígenas mexicanas analizadas, debido a la presencia de los diferentes subhaplogrupos.

I. INTRODUCCION.

A. GENOMA MITOCONDRIAL.

Una característica de las células eucarióticas es la presencia de compartimentos citoplasmáticos limitados por membrana, que los separa físicamente de los demás. Estos compartimentos son: núcleo, retículo endoplásmico liso y rugoso, microcuerpos, lisosomas, mitocondria y otros. La mitocondria es el centro del metabolismo oxidativo de la célula que convierte los productos del catabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en energía química almacenada como adenosin trifosfato (ATP) (Karp G, 1998).

Además se ha postulado que el origen de la mitocondria es endosimbiótico (Margulis L., 1970), ya que este organelo tiene un sistema independiente de replicación, transcripción y traducción (Wallace, 1992a).

1. Estructura y contenido genético.

En humanos, el genoma mitocondrial (mtDNA) es una molécula circular con 16,569 pb, que se replica y se expresa dentro del organelo y está en múltiples copias. El mtDNA codifica a 13 proteínas (subunidades de la cadena respiratoria) necesarias para generar ATP en la vía de fosforilación oxidativa, además de los RNAs ribosomales 12S, 16S y 22 tRNAs necesarios para la expresión de los mRNAs, Figura 1. (Nils-Göran y Clayton, 1995; Wallace, 1993).

Además de estas 13 proteínas codificadas por el mtDNA, se requieren otras proteínas de origen nuclear tanto para la fosforilación oxidativa, como para la replicación, transcripción y traducción del mtDNA (Scriver *et al.*, 1995).

2. Replicación del DNA mitocondrial.

El genoma mitocondrial está formado por dos cadenas: una cadena pesada que sirve de molde para la síntesis de los RNAs ribosomales 12S y 16S, 12 polipéptidos y 14 tRNAs y una cadena ligera que sirve de molde para la síntesis de un polipéptido del complejo I, llamado ND6 y de 8 tRNAs (Nils-Göran y Clayton, 1995).

La replicación del DNA mitocondrial es asimétrica, debido a la presencia de dos orígenes de replicación separados uno del otro aproximadamente por 10 Kb y además requiere de la polimerasa mtDNA (polimerasa γ) y factores proteínicos adicionales. Un origen de replicación se ubica en la cadena pesada (O_H) y sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena, situada en la región D-loop. Iniciada la replicación, se extiende hasta llegar a dos tercios del mtDNA y expone el siguiente origen de replicación de la cadena ligera (O_L) y continua la síntesis de la cadena ligera en sentido opuesto a la síntesis de la cadena pesada, hasta completar la replicación en ambas cadenas (Figura 1) (Nils-Göran y Clayton, 1995).

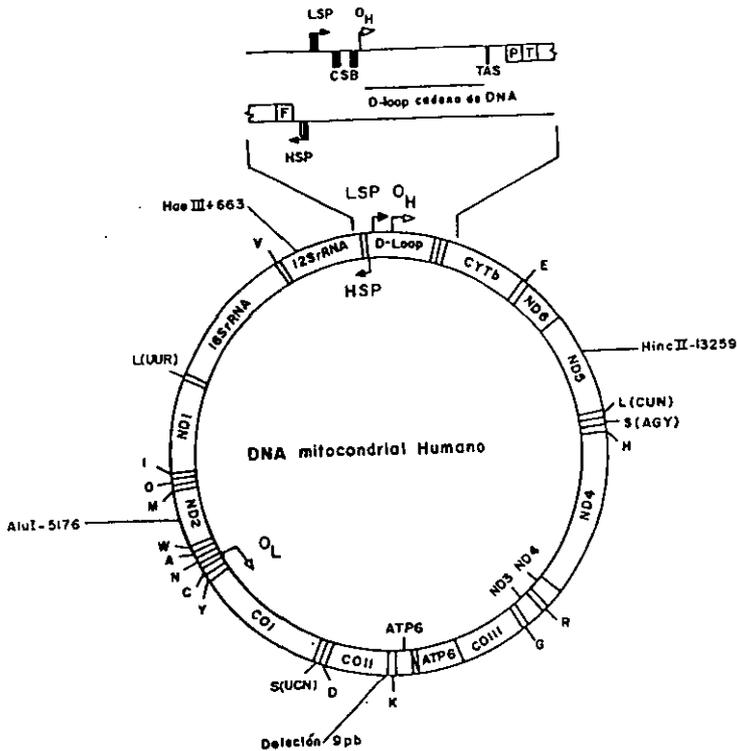


Figura 1. Mapa del DNA mitocondrial humano. El DNA mitocondrial codifica 13 proteínas, siete de ellas pertenecen al complejo I (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6), una proteína del complejo III citocromo b (cytb), 3 proteínas del complejo IV (COI, COII, COIII), 2 polipéptidos del complejo V (ATP8 y ATP6). Dos rRNAs (12S y 16S) y 22 tRNAs (indicada por una letra del símbolo del aminoácido). Las flechas indican los promotores de la transcripción de la cadena pesada (HSP), de la cadena ligera (LSP) y los orígenes de la replicación de la cadena pesada (O_H) y la cadena ligera (O_L). La región ampliada muestra el asa desplazada (D-loop) con la cadena de D-loop naciente, las secuencias de bloqueo conservadas (CSBs) y la secuencia asociada a la terminación (TAS) <http://www.gen.emory.edu.MAP/report.html#function>

Las siguientes enzimas de restricción definen los haplogrupos A, C, D y la delección define al haplogrupo B. El haplogrupo A se define por la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima HaeIII en la posición 663, el haplogrupo C se define por la ausencia de un sitio reconocimiento para la enzima HincII en la posición 13259 y el haplogrupo D se define por la ausencia de un sitio en la posición 5176 (Tomado de Nils-Göran y Clayton, 1995., Torroni *et al.*, 1992, con modificaciones).

3. Transcripción.

La región D-Loop es el sitio de control de la transcripción y replicación del mtDNA. Existe un promotor de la transcripción en la cadena pesada (HSP) y un promotor de la transcripción en la cadena ligera (LSP). En ambas cadenas se produce un transcrito policistrónico (Schapira A.H.V., 1993). La síntesis de DNA inicia en una región denominada secuencia conservada de bloqueo I-III (CSBs) (Figura 1) (Nils-Göran y Clayton, 1995).

La transcripción requiere de la RNA polimerasa que transcribe exclusivamente genes mitocondriales (mtRNA) y probablemente de algunos factores adicionales, además del factor A involucrado en la transcripción mitocondrial humana (h-mtTFA), que se une a una región reguladora corriente arriba de los promotores HSP y LSP, activando la transcripción como resultado de la unión al DNA. Recientemente se ha demostrado que el dominio carboxilo de este factor es la parte activa para la transcripción (Nils-Göran y Clayton, 1995).

4. Mutaciones en el DNA mitocondrial.

El DNA mitocondrial presenta mutaciones en regiones reguladoras que interfieren en la replicación y transcripción. Esto origina una pérdida en la función de algunas de las subunidades de la cadena respiratoria codificadas por el mtDNA. Originando un daño en la función de la cadena respiratoria que generalmente tienen efectos patogénicos (Nils-Göran y Clayton, 1995).

B. HERENCIA MITOCONDRIAL.

El genoma mitocondrial se transmite con un patrón de herencia particular, que se caracteriza por una transmisión materna, mediante las mitocondrias localizadas en el citoplasma de los óvulos. La contribución de las mitocondrias paternas es muy baja, ya que solamente se transmite el 0.1% de mtDNA, por las mitocondrias que están ubicada en la parte media del espermatozoo. Se estima que un óvulo humano contiene aproximadamente 200,000 a 300,000 mtDNAs. La madre transmite su mtDNA a toda su descendencia y solamente sus hijas trasmiten su mtDNA a la siguiente generación (Wallace, 1992b, Nils-Göran y Clayton, 1995).

En años recientes se han dado grandes avances al describir y caracterizar mutaciones en el

mtDNA, que se concentran a lo largo del linaje materno y están asociadas a un número de enfermedades con fenotipos neurológicos o neuromusculares. Sin embargo, solamente una minoría de los cientos de genes implicados en la biogénesis mitocondrial están codificados por la mitocondria, ya que la mayoría lo están por el núcleo. Por lo tanto, es posible que mutaciones en genes nucleares puedan también causar enfermedades mitocondriales, que implicarían un mayor número de síndromes clínicos (Poulton *et al.*, 1994).

1. Segregación replicativa.

El mtDNA está presente de 2 a 10 copias por mitocondria y miles de copias por célula. Una mutación puede estar presente en todas las copias (homoplasmia) o en una fracción (heteroplasmia) que se distribuye azarosamente en las células hijas durante la mitosis y meiosis por un proceso llamado “segregación replicativa” en donde la célula acumula una porción variable de mtDNA mutado y normal (Nils-Göran y Clayton, 1995). Cuando se transmite por vía materna una mutación homoplásmica, ésta se mantiene estable en las generaciones sucesivas. Por lo contrario, cuando se hereda una mutación heteroplásmica, el genotipo puede cambiar en pocas generaciones y la transmisión dependerá de la proporción del mtDNA mutado, además de que se transmita a todas sus hijas (Nils-Göran y Clayton, 1995).

C. POLIMORFISMOS EN EL DNA.

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 en la longitud del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP's), marcadores muy empleados en estudios de Genética de poblaciones y en diagnóstico molecular de padecimientos hereditarios monogénicos (Serrano, 1995).

En la actualidad, en los estudios de evolución, se están empleando marcadores genéticos mitocondriales, para conocer el origen humano y encontrar el origen de los primeros pobladores de América. El uso de marcadores nucleares en este tipo de estudios, genera menos información que los mitocondriales debido al fenómeno de recombinación y a la baja tasa de mutación, lo cual hace más difícil el conocimiento de la historia evolutiva.

El mtDNA permite estudiar diferentes poblaciones humanas, debido a que presenta un nivel de variación genética alta. Lo que permite comparar poblaciones separadas geográficamente y poder relacionar el parentesco entre ellas.

D. POBLADORES DE AMERICA.

El origen de los primeros pobladores de América, constituye uno de los temas más controversiales en el estudio de la evolución humana. Es aceptado que los antecesores de los indígenas de América llegaron de Asia durante el máximo período glacial (25,000-14,000), a través del estrecho de Bering que conectó a ambos continentes (Starikovskaya *et al.*, 1998). Sin embargo, el tiempo, lugar de origen y el número de migraciones hacia América está en debate por genetistas, arqueólogos, antropólogos y lingüistas (Karafet *et al.*, 1999).

Greenberg, Turner y Zegura proponen la hipótesis de las "tres oleadas migratorias", mencionando que pobladores de América llegaron del Noreste de Asia en diferentes épocas, integrados en 3 grupos. Esta hipótesis se sustenta en la homogeneidad en los grupos lingüísticos, datos genéticos, la morfología dental y la variación de proteínas sanguíneas (Szathmary, 1993., Greenberg *et al.*, 1986).

De acuerdo a estos autores, la primera oleada migratoria a América fue hace aproximadamente 15,000-30,000 años y dio origen a los Amerindios. Este grupo tiene una extensa diversidad lingüística y se distribuye por todo el Sur y Centro de América y parte del Norte de América; la segunda oleada se realizó hace aproximadamente 10,000-15,000 años por el grupo de los Na-Dene, distribuidos actualmente al Norte de Canadá y una pequeña parte del Sudeste de los EUA, mientras que la migración más reciente fue aproximadamente 6,000-9,000 años y la realizó el grupo de los Esquimales-Aleutianos, distribuidos actualmente en la parte Norte de Canadá y una parte de Groenlandia (Schurr *et al.*, 1990).

1. Variación en el mtDNA en indígenas de América.

La variación en el mtDNA es importante para determinar la estructura demográfica y el número de migraciones de Asia hacia el Nuevo Mundo. Lo anterior se apoyó mediante estudios realizados con el mtDNA de indígenas pertenecientes a varias poblaciones de América. La presencia de marcadores asiáticos ha sugerido que los indígenas americanos derivaran de un pequeño número de fundadores de Asia (Schurr *et al.*, 1990).

Para ver la relación de la población americana con la asiática, se realizó el estudio de la variación en la secuencia del mtDNA en 167 Amerindios (Norte, Centro y Suramérica) y 7 poblaciones de Asia con un número total de 153 asiáticos. Se utilizaron 14 enzimas de restricción para analizar el mtDNA, encontrándose un total de 67 sitios polimórficos, que definieron 50 combinaciones de alelos y una deleción de 9 pb. En un dendograma estas combinaciones se agruparon en cuatro grandes grupos (A, B, C y D) de haplotipos o linajes. El haplogrupo A se caracterizó, por la presencia de un sitio de reconocimiento para la enzima HaeIII en la posición 663, el haplogrupo B mediante la deleción de 9 pb de una pequeña región no codificante entre los genes COII y ^LytRNA, el haplogrupo C fue caracterizado por la ausencia de un sitio de reconocimiento para la enzima Hinc II en la posición 13,259 y por último el haplogrupo D se caracterizó por la ausencia de un sitio de reconocimiento para la enzima Alu I en la posición 5176 (Figura 1). Los resultados obtenidos sugieren que la población amerindia presenta los cuatro linajes maternos (A, C, B y D). Sin embargo, las variaciones genéticas observada en los linajes A, C y D fueron similares. No obstante, el linaje B presenta variación genética más baja, dando la posibilidad de una llegada independiente. Por otro lado, estos marcadores se comparten con poblaciones de Asia, sugiriendo que los indígenas de América descendieron de

poblaciones asiáticas y experimentaron una reducción dramática de tamaño y variación genética después o durante la migración hacia América. De acuerdo con la gran variación en la secuencia de algunos Nadenes y Amerindios, es probable que estos dos grupos derivaran de distintas poblaciones que migraron en diferentes tiempos (Torroni *et al.*, 1992).

2. Región D-loop.

La región D-loop del mtDNA es muy variable por lo que se pueden definir y caracterizar tres o cuatro haplogrupos (A-D), también denominados haplotipos I, III, IV, debido a la presencia de mutaciones específicas en cada grupo. (Ward *et al.*, 1991, Bailliet *et al.*, 1994, Toroni *et al.*, 1993). El haplogrupo "A" o haplotipo III, se caracteriza porque en la secuencia de la región D-loop, se encuentra una timina en la posición 16290 y una adenina en la posición 16319. El haplogrupo "B" o haplotipo I, usualmente se caracteriza por citosinas en la posición 16189 y 16217. El haplogrupo "C" o haplotipo IV, tiene una citosina en la posición 16298 y una timina en la posición 16327. Comparando las secuencias de la región D-loop de indígenas americanos y las de Asia se puede observar que existen mutaciones específicas de grupo de estas dos regiones separadas geográficamente. Esto indica que las mutaciones específicas probablemente se originaron de Asia y las otras mutaciones ocurrieron después, cuando los indígenas americanos se separaron de las poblaciones de Asia (Easton *et al.*, 1996).

Por otra parte, también se han caracterizado polimorfismos específicos de América Central, como el de la tribu Amerindia Chibcha de Costa Rica y Panamá. Estas poblaciones presentan una deleción de 6 pb que abarca los nucleótidos 106-111 y se pierde un sitio de reconocimiento para la enzima MspI en el nucleótido 104. Esta deleción ha sido denominada como "deleción de Huetar", por pertenecer a la población Huetar del Centro de Costa Rica. Se sugiere que se originó en una población ancestral Chibcha y de éstas se derivaron las poblaciones modernas (Santos y Barrantes., 1994). Aunque se pensaba que esta deleción era específica de esta tribu, analizando otras poblaciones al sur de América Central se logró identificar la deleción que además está asociada a los haplogrupos A y D (Merriwether *et al.*, 1995a).

3. Distribución de los haplogrupos.

Las poblaciones Amerindias presentan los cuatro haplogrupos (A-D). Las poblaciones Nadenes que son menos variables, presentan al menos uno o dos haplogrupos. Interesantemente no siempre los mismos linajes se presentan en las mismas poblaciones, por ejemplo la población de Dogrib tiene los haplogrupos A y C, los Navajo tienen los haplogrupos A y B. Por último, las poblaciones de Esquimales-Aleutianos presentan dos haplogrupos (A y D). En América el haplogrupo A se presenta en una menor frecuencia en las poblaciones de Suramérica y en mayor frecuencia en Norteamérica (Merriwether *et al.*, 1995a). Este haplogrupo está presente en baja frecuencia en poblaciones de Asia y ausente en las poblaciones de Siberia. Además se observa en un 5.0% en Mongolia y en la población Evenk de Siberia y en un 11.0% en Tibetanos (Bonatto *et al.*, 1997a). La frecuencia de los haplogrupos C y D varía mucho en el Norte, Centro y Suramérica (Merriwether *et al.*, 1995a).

4. Delección de 9 pb.

La delección de 9 pb que define al linaje B está distribuida en menor frecuencia en Norteamérica y mayor frecuencia en Sudamérica. La delección es muy común en Asia, en el sudeste de Asia y en las islas del Pacífico (Merriwether *et al.*, 1995a).

Con estos datos se puede sugerir un modelo de dos migraciones del linaje B originado en el sudeste de Asia: una migración se movió cruzando el estrecho de Bering y se distribuyó en América y la segunda migración se dirigió hacia las islas del Pacífico (Melanesia, Micronesia, Polinesia). Estas dos migraciones que se distribuyeron fuera de Asia y Siberia, podrían explicar la variación que se observa en América (Merriwether *et al.*, 1995a). La presencia del linaje B entre Polinesia y Amerindios probablemente refleja un origen asiático en vez de un contacto directo entre ambas poblaciones (Bonatto *et al.*, 1996).

5. Diversidad en los cuatro haplogrupos.

Uno de los temas más controversiales es la llegada de varias migraciones al Nuevo Mundo. La variabilidad genética observada en diferentes poblaciones amerindias, nos da información detallada para evaluar el número y el tiempo en que ocurrieron las migraciones hacia el Nuevo Mundo. Mediante la secuenciación de la región control y el estudio de los polimorfismos del mtDNA, es posible observar la divergencia dentro de las poblaciones humanas.

Una de las poblaciones que presenta una extensa variabilidad genética, es la población Amerindia Nuu-Chah-Nulth, lo que va en contra de un efecto fundador, sugiriendo un modelo de una sola migración hacia el Nuevo Mundo (Ward *et al.*, 1991, Kolman *et al.*, 1996). En datos más recientes, se menciona que existe una menor variabilidad en los cuatro haplogrupos (A, B, C y D), seguida de una expansión. Por lo que concluyen que hubo un solo origen para todas las poblaciones que luego se expandieron (Forster *et al.*, 1996) aproximadamente en el mismo tiempo. Por consiguiente, es muy probable que llegaran de una misma población hace 30,000-40,000 años y que la diversificación se diera durante un intenso proceso de colonización. Asimismo, al comparar una población antigua del cementerio Norris Farms situada en Illinois y perteneciente a la cultura Oneota, con una población Americana y linajes de Asia, presentó una mayor diversidad en todos los haplogrupos. De acuerdo con estos resultados se apoya la hipótesis de una sola migración al Nuevo Mundo con una considerable diversidad que se expandió hace 23,000-37,000 años (Stone y Stoneking., 1998).

También se ha observado la presencia de más haplotipos fundadores denominados como subhaplogrupos A1, A2, C1, C2, B1, B2, D1, D2. Esto, argumenta en contra de la hipótesis de una menor variabilidad genética en la población durante la primera colonización hacia América (Bailliet *et al.*, 1994, Merriwether *et al.*, 1996).

La idea de una o tres migraciones para explicar la llegada de los indígenas americanos, se ha complicado más, debido a los trabajos de Starikovskaya *et al.* (Starikovskaya *et al.*, 1998), donde se proponen 2 migraciones: la primera fue hace aproximadamente 34,000 años, provenientes del estrecho Bering, presentando los haplogrupos A, C y D. La segunda fue hace 16,000-13,000 años y provino del Sureste de Asia, mostrando sólo el haplogrupo B. Estos datos correlacionan con la última expansión del estrecho Bering, cuando el recorrido hacia Alberta fue abierto debido al descongelamiento.

E. HAPLOGRUPO X.

El 97% de los indígenas americanos presentan uno de los cuatro haplogrupos fundadores (A, B, C y D) (Brown *et al.*, 1998). La excepción es una población de Ojibwa del norte y del sur de Ontario que muestra otro marcador denominado haplogrupo "X" (Scozzari *et al.*, 1997). La presencia de este haplogrupo en las poblaciones antes mencionadas, probablemente el resultado de migraciones de grupos del norte de Europa al norte de América. Actualmente, se sugiere que este haplogrupo, es adicional a los otros cuatro haplogrupos (Brown *et al.*, 1998, Forster *et al.*, 1996).

Por lo anterior, este haplogrupo, está en menor frecuencia en las poblaciones indígenas americanas. En poblaciones de Europa se encuentra en un 4% y está ausente en numerosas poblaciones de Asia/Siberia, lo que sugieren que llegó a América por una vía diferente al estrecho de Bering. El haplogrupo está distribuido solamente en grupos de Amerindios del Norte de América: en un 25% Ojibwa, 15% en Sioux, 11%-13% en Nuu-Chah-Nulth, 5% en Yakima y un 7% en Navajo del grupo de Na-Dene. La presencia de este haplogrupo en el grupo de Na-Dene probablemente se adquirió a través de una mezcla con poblaciones Amerindias del Norte, durante o después de una migración reciente (Brown *et al.*, 1998).

Se estima que este haplogrupo llegó del Norte de América hace 12,000-36,000 años, lo que sugiere que arribó a América paralelamente durante la primera migración de los Amerindios (20,000-30,000 años).

¿Cuál es la relación que existe entre el viejo mundo y el nuevo mundo con este haplogrupo?. En trabajos recientes, excluyen la posibilidad de un mestizaje para explicar su presencia en las poblaciones indígenas americanas. Mediante análisis filogenéticos el haplogrupo X separa en dos grandes brazos a las poblaciones indígenas americanas y a las europeas, sugiriendo que están formadas por un ancestro materno común (Brown *et al.*, 1998).

El resultado del análisis de 743 mtDNA de indígenas de diferentes partes de América solo 25 indígenas (11 de Ojibwa, 2 Navajo, 2 Nuu-Chah-Nulth, 1 Oncota (esqueleto) de Norte América, 1 Maya, 1 Makiritare, 6 Mapuche de Centro y Suramérica), no presentaron ninguno de los cuatro haplogrupos de América (A, B, C y D) (3.4%). Se han dado diversas explicaciones del porqué no presentaron ninguno de los cuatro haplogrupos: A) Podría ser el resultado de un segundo evento mutacional que eliminó algunos de los cuatro haplogrupos. B) Podría ser el resultado de una mezcla reciente de genes Caucásicos. C) Podría representar haplogrupos de Asia adicionales que entraron a

América. D) Los indígenas americanos e indígenas europeos comparten un ancestro común (Brown *et al.*, 1998., Torroni y Wallace, 1995).

F. CROMOSOMA Y.

Existe una fuente de debate respecto al número de migraciones hacia el Nuevo Mundo basados en el estudio con haplotipos asociados al cromosoma Y, que ofrece la posibilidad de estudiar la migración masculina y poder compararla con la migración femenina.

El cromosoma Y se transmite por vía paterna a sus hijos de forma haploide sin sufrir recombinación. Su variación genética es baja respecto al mtDNA, sin embargo contiene varios elementos repetidos que mutan rápidamente. Por lo tanto, una combinación en la sustitución de bases y variantes en los elementos repetidos en el cromosoma Y, dan como resultados haplotipos que pueden trazar la migración paternal (Lell *et al.*, 1997). La diversidad genética de este cromosoma dentro de una población y entre poblaciones puede ser considerada como una combinación de mutaciones que han ocurrido a lo largo del linaje paterno (Ciminelli *et al.*, 1995).

1. Distribución geográfica de los haplotipos del cromosoma Y.

Karafet y cols. (1999) analizaron los cromosomas Y de 2,198 hombres de 60 poblaciones incluyendo 19 indígenas americanos y 15 indígenas del Norte de Asia, dando como resultado a 14 haplotipos, los más frecuentes fueron los haplotipos 1C y 1F. En base a esos datos, se propone un modelo de 2 oleadas migratorias separadas geográficamente, hacia el Nuevo Mundo (Karafet *et al.*, 1999).

Una oleada provino de las poblaciones del Oeste de Siberia (haplotipo 1C). Este haplotipo está ampliamente distribuido en América del Norte, Centro y Suramérica. Interesantemente este haplotipo se encontró con una frecuencia de 68.8% en poblaciones de Europa del Norte (Euroasia) (Karafet *et al.*, 1999).

El origen de la segunda trayectoria (haplotipo F) proviene de las poblaciones del Norte y Este de Siberia. En una menor frecuencia se encuentra en Mongolia, ausente en África, en Europa y en América (Karafet *et al.*, 1999).

G. POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS.

1. MIXTECOS.

Los actuales habitantes de Mixtecapán (país de los mixtecos) o Mixtlán (lugar de nubes), según los nahuas, se autodenominan *Níuu Savi*, que significa en castellano “pueblo de lluvia”. La región ocupada por los mixtecos, se localiza entre los 97° y 98° 30' de longitud Oeste y los 15° 45' de latitud Norte, cubre un área aproximada de 40 000 km² y abarca parte de los estados de Guerrero, Puebla y en mayor proporción el estado de Oaxaca. Históricamente ha sido dividida en Alta, Baja situada a una altura cercana a los 1 700 msnm (metros sobre el nivel del mar) y la Costa situada en la vertiente del Pacífico. La región está en la confluencia de la Sierra Madre del Sur y la Sierra de Oaxaca, sus altitudes van de los 0 a los 2 500 msnm (metros sobre el nivel del mar).

La lengua indígena que se habla en la Mixteca, pertenece al grupo macro otomangue, subgrupo otomangue, rama mixteco-popolocana, familia amuzgo-mixteca y está emparentada con los idiomas cuicateco, triqui y amuzgo y un poco más alejado del popoloca, el ixcateco, el chocho y el mazateco (Acevedo y Roble., 1994).

2. ZAPOTECOS

Los zapotecos son, después de los nahuas y los mayas, el pueblo indígena más numeroso en nuestro país, representa el 8% del total de hablantes de lengua indígena en México. En 1990, en el estado de Oaxaca existían 341,583 hablantes zapotecos, conformando así el grupo indígena más extenso del estado. Su presencia se registró prácticamente en las ocho regiones geográficas en que se divide la entidad, además de que existen también importantes núcleos en la ciudad de México, en el estado de México, Chiapas y Veracruz. El término “zapoteco” proviene del vocablo náhuatl Tzapotecatl, que significa “pueblo del zapote”, pero los zapotecos se nombran así mismos: “ben ‘zaa” o “gentes de las nubes”. La región se ubica entre los 16° 17' y 17° 29' de latitud norte y los 96° 7' y 97° 09' de longitud oeste y de acuerdo a factores geográficos del Valle Central, la población está representada por 89 municipios, que comprende los distritos de Ejutla, Etlá, Ocotlán, Tlacolula, Zaachila, Zimatlán y Centro (González., 1994).

Los zapotecos no constituyen un grupo cultural homogéneo, la etnografía los agrupa en cuatro ramas: zapotecos de Valles Centrales, del Istmo de Tehuantepec, de la sierra Norte o Juárez y zapotecos del sur.

Los Valles Centrales de Oaxaca han sido sede de asentamientos humanos desde la llegada de los zapotecos, la región fue poblada por grupos de carácter nómada, etapa que se le denominó "lítica" basada en la caza, la recolección y en la cosecha. La lengua zapoteca deriva del tronco lingüístico otomangue y se encuentra emparentada con el Otomí, el mazahua, el matlatzínca, el pame y el ocuilteco, hablados en el centro de México. Con el triqui, chocho, mazateco, amuzgo, ixcateco, mixteco, chatino y además con el chiapaneco y el mangue hablado en algunos pueblos de Centroamérica (González., 1994).

Existe una migración muy marcada de zapoteco, sin embargo, un elemento que debemos tener presente es el alto grado de identidad y de adscripción que guardan respecto al lugar de su procedencia, no importa mucho su lugar actual de residencia, se reconoce como miembros de una comunidad con la prestación de los servicios municipales que se les asigna. Así, los zapotecos serranos radicados en el Valle de México y en otros lugares son una parte importante de la sociedad zapoteca del estado de Oaxaca. Sus principales objetivos son de ayudarse mutuamente, preservar la identidad social en los nuevos lugares de asentamiento y ayudar a la comunidad de origen mediante su aportación (Ríos., 1994).

3. OTOMIES

A la palabra otomí se le dan varios significados. Para algunos autores deriva del nahua y significa "cazadores que llevan flechas", para otros "ñañü" (que proviene de un antepasado mítico) o bien "Otou" u "Otomitly" que quiere decir "pueblo sin residencia" o "no poseer nada". La cultura mesoamericana se integró con diversas etnias, entre ellas los otomíes. Este grupo lingüístico actualmente se encuentra en los estados de Hidalgo, México y Querétaro, Veracruz y el Distrito Federal. Sin embargo, se menciona que los otomíes provenían del Oriente o del sur, al emigrar llegan al valle de Tula en el siglo VII, en donde inician la construcción de sus poblados (Vázquez., 1995).

Los otomíes pertenecen a la gran familia otomí-pame, grupo lingüístico cuyos componentes poseen historia y tradiciones culturales altamente diversificadas. La población migrante otomí mantiene sus relaciones familiares con sus paisanos residentes en el Distrito Federal, para conservar sus

lazos con la familia que permanece en la comunidad y en su territorio. Las formas culturales de relación, de trato y de convivencia son discretas y han tratado de conservar sus relaciones de compadrazgo con miembros de su propio grupo (Isidro., 1994).

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.

- Determinar los subhaplogrupos del mtDNA en poblaciones indígenas mexicanas.

2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtención de un banco de DNA genómico de diversas poblaciones indígenas mexicanas.
- Amplificar por PCR las diferentes regiones en el DNA mitocondrial que definen los subhaplogrupos y someterlas a restricción con las diferentes enzimas.
- Comparar los resultados obtenidos con otras poblaciones indígenas americanas y asiáticas.

III. JUSTIFICACION

En México, se han realizado pocos estudios de haplogrupos en el DNA mitocondrial por lo que es de gran interés conocer la estructura genética mitocondrial de nuestras poblaciones. Esto contribuirá a conocer las relaciones genéticas que existen en nuestras poblaciones y con otras separadas geográficamente.

IV. SUJETOS

Se estudiaron 74 individuos residentes en la ciudad de México, D.F. provenientes de diferentes poblaciones indígenas: 16 de la Mixteca alta, 11 de la Mixteca baja, 7 de la Mixteca costa, 5 Zapotecos y 35 Otomíes.

El estudio se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, CMN Siglo XXI, en colaboración con la Dra. Leonora Buentello del laboratorio de Genética del Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM.

A. CRITERIOS DE INCLUSION

Los criterios de inclusión que se emplearon en este trabajo fueron los siguientes:

- a) Que los padres y abuelos de los individuos analizados hayan nacido en alguna de las poblaciones analizadas en este estudio.
- b) Los individuos analizados no deben estar relacionados genéticamente entre sí.

V. METODOS

A. AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO.

La obtención de DNA se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica, siguiendo el método previamente descrito por Kempter (1992). Con la excepción de que el DNA fue purificado mediante extracciones fenólicas. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3,500rpm/15 min. Se obtuvo el paquete de las células blancas de la interfase y se pasó a tubos eppendorf. Los eritrocitos remanentes se eliminaron a través de lavados con amortiguador de lisis de eritrocitos (TRIS 10mM pH7.6, MgCl₂ 5mM y NaCl 10Mm). La pastilla de células blancas resultante se resuspendió en 886 µl de NaCl 5mM y se le adicionaron 46 µl de SDS al 10% para lisar a las células. Esta mezcla se agitó por 5 minutos, se le adicionaron 308 µl de una solución saturada de NaCl, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 15,000 r.p.m./30min. Se aisló el sobrenadante y se le realizaron extracciones fenólicas (Maniatis *et al.*, 1989). El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se le adicionaron dos volúmenes de etanol

absoluto frío (-20 °C) para precipitar el DNA. Este se separó de la solución alcohólica y se lavó dos veces con etanol al 75%. Posteriormente, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en un volumen de 800 µl de solución TE (TRIS 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0) o agua desionizada y se conservó hasta su análisis a -20 °C.

Se determinó la concentración y pureza del DNA mediante un análisis espectrofotométrico a 260 y 280 nm. La concentración de DNA se calculó con la siguiente fórmula:

$$[\text{DNA } (\mu\text{l})] = (\text{A}_{260}) (\text{dilución} - 1) (0.05 \mu\text{g}/\text{l})$$

sabiendo que 0.05 µg/µl de DNA = 1 D.O a 260 nm

La relación 260/280 indica la pureza del DNA obtenido. Se considera que las relaciones comprendidas entre 1.8 y 2.0 unidades son las óptimas.

Para determinar la calidad de las muestras se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [0.5µg/ml] (Maniatis *et al.*, 1989).

B. AMPLIFICACION DE REGIONES POLIMORFICAS DEL mtDNA, MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Con la finalidad de definir los haplogrupos (A, C, D) en el mtDNA de la población indígena estudiada, se amplificaron 3 regiones diferentes, con diversos pares de oligonucleótidos que definen cada haplogrupo (Torróni *et al.*, 1992). La secuencia de cada oligonucleótido, el tamaño de los productos de amplificación y la temperatura de alineamiento se describen en la tabla I. Todas las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador RoboCycler Gradient 40 (Stratagene).

La reacción de PCR para los subhaplogrupos A1 y A2, se realizaron con las siguientes condiciones: 2.5 U de Taq polimerasa (Gibco-BRL), 100-200 ng de DNA, 200 µM cada uno de los dNTP's, 25 pmoles de cada oligonucleótido, amortiguador de la reacción 10X y 25 µl de aceite mineral, la condición óptima de MgCl₂ para la reacción fue 1.0 mM. El volumen final de la reacción fue de 50 µl.

La amplificación se realizó con los siguientes pasos: una desnaturalización inicial de 95°C, 5 min, 30 ciclos de desnaturalización (95 °C, 1 min), alineamiento (61 °C, 1 min), extensión (72°C, 3min) y una extensión final de 72 °C por 7 min.

Para los subhaplogrupos C1 y C2, la reacción de PCR se realizó en base a las siguientes condiciones: 2.5 U de Taq polimerasa (Gibco-BRL), 100-200 ng de DNA, 200 μ M de cada uno de los dNTP's, 25 pmoles de cada oligonucleótido, amortiguador de la reacción 10X y 25 μ l de aceite mineral, se varió la concentración de $MgCl_2$, siendo de 1.6 mM la condición óptima en la reacción. El volumen final de la reacción fue de 50 μ l.

En la amplificación se utilizaron los siguientes pasos: una desnaturalización de 95°C, 5 min., 30 ciclos de desnaturalización (95 °C, 1 min.), alineamiento (65 °C, 1 min.), extensión (72 °C, 3 min.), y una extensión final de 72 °C por 7 min.

La reacción de PCR se realizó en base a las siguientes condiciones para los subhaplogrupos D1 y D2: 2.5 U de Taq polimerasa (Gibco-BRL), 100-200 ng de DNA, 200 μ M de cada uno de los dNTP's, 25 pmoles de cada oligonucleótido, amortiguador de la reacción 10X y 25 μ l e aceite mineral, se varió la concentración de $MgCl_2$, siendo la óptima de 1.0 M. El volumen final de la reacción fue de 50 μ l.

La amplificación se realizó con los siguientes pasos: una desnaturalización inicial de 95°C, 5 min, 30 ciclos de desnaturalización (95 °C, 1 min.), alineamiento (55 °C, 1 min.), extensión (72 °C, 3 min.) y una extensión final de 72 °C por 7 min.

Los productos de PCR de cada subhaplogrupo fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio [0.5 μ l/ml]; en todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular (escalera de 50 y 100 pb, Boehringer Mannheim).

TABLA I
CONDICIONES DE PCR.

HAPLOGRUPOS	COORDENADAS DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EN EL mtDNA	SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS EN DIRECCION 5'→3'	TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO (°C)	PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)
A	16453-16472, 1677-1696	CCGGGCCATAAACTTGGG GOAGTGGTTGGGGCTAGG	61	1812
C	11673-11691, 13932-13950	CCCCCTGAAGCTTCACCGG GGGGATTGTGCGGTGTGTG	57	2277
D	4994-5018, 5584-5603	ACGCCAAAATCTTAGCATACTCCTCA GGGGTTTTGCAGTCCTTAGCT	55	609

C. PURIFICACION DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

Debido a la aparición de productos inespecíficos en el PCR fue necesario purificar el producto específico a partir de geles de agarosa mediante el "Kitt GeneClean II" que contiene una matriz de sílica llamada "glassmilk" a la que se une el DNA. El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en geles de agarosa, de acuerdo a un marcador de peso molecular el producto específico se cortó del gel y se transfirió a un tubo al que se le agregó tres volúmenes de Yoduro de Sodio (NaI 6.0M) y se incubó por 5 minutos a 45°C para poder disolver la agarosa. Posteriormente se adicionó una suspensión de glassmilk (10 µl) y el tubo se colocó en hielo por 5 minutos, después se incubó por 5 minutos a 45°C, se centrifugó a 15 rpm por 5 segundos y se retiró el sobrenadante. A la pastilla de sílica-mtDNA se le agregó 500 µl de solución de lavado (NaCl/etanol/agua) y se centrifugó por 5 segundos, se repitió este paso por tres veces más, después del último lavado se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 20 µl de agua destilada, se incubó el tubo a 45 °C por 2 ó 3 minutos y se centrifugó a 15 rpm por 30 segundos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se tomó una alícuota para definir su concentración.

D. DIGESTION DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

Para determinar los haplogrupos en las poblaciones indígenas analizadas, los diferentes productos amplificados y purificados se sometieron a la restricción con la enzima Hae III, que reconoce una secuencia específica GG↓CC (Esquema 1), a la enzima Hinc II, que reconoce una secuencia específica GTPy↓PuAC (Esquema 2) y a la enzima Alu I, que reconoce una secuencia AG↓CT (Esquema 3) (Torrioni *et al.*, 1992).

La reacción de digestión con las enzimas Hae III y Hinc II se hizo bajo las siguientes condiciones: Se trabajaron a una concentración de 10-20 Uds, utilizando un amortiguador 1X (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50mM) y 100-200 ng de mtDNA.

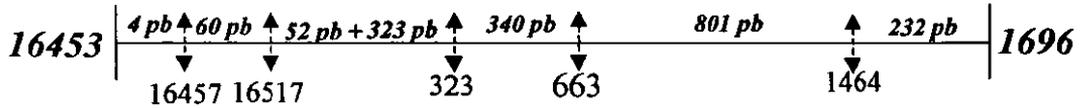
En la reacción de digestión para la enzima Alu I se utilizaron las siguientes condiciones: 10-20 Uds., amortiguador 10 X (Tris-acetato 33 mM, DTT 0.5 mM, acetato de magnesio 10 mM, acetato de potasio 66 mM) y 100-200 ng de mtDNA.

En todas las reacciones el volumen final fue de 20 μ l. La digestión del DNA con cada enzima se hizo durante 2 hora a 37°C. Para cada enzima se usó un control positivo y negativo de corte. Los productos de restricción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio [0.5 μ g/ml], incluyendo un marcador de peso molecular (escalera de 50 y de 100 pb, Roche).

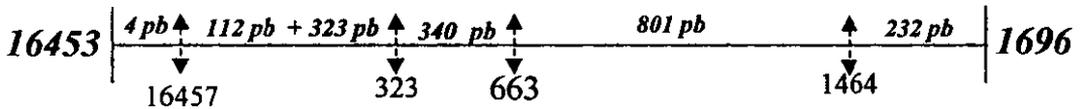
Esquema 1.

1.1) Definición de los subhaplogrupos A1 y A2

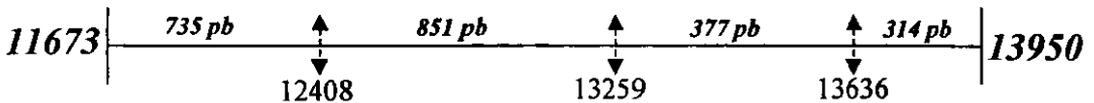
A) Para el subhaplogrupo A1 presenta un sitio de reconocimiento en la posición 16517 y 663, para la enzima Hae III.



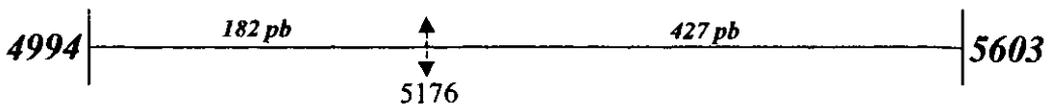
B) Para el subhaplogrupo A2 presenta un sitio de reconocimiento en la posición 663, para la enzima Hae III.



C) Ambas presentan un sitio de reconocimiento para la enzima Hinc II en la posición 13259.



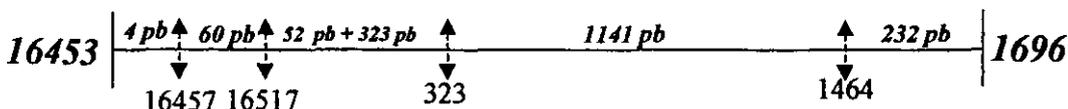
D) Ambas presentan un sitio de reconocimiento para la enzima AluI en la posición 5176.



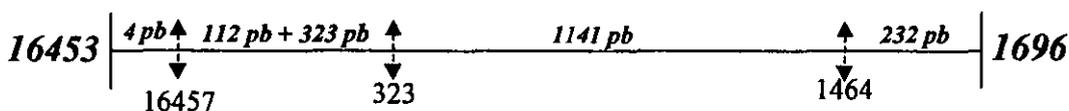
Esquema 2.

2.2) Definición de los subhaplogrupos C1 y C2

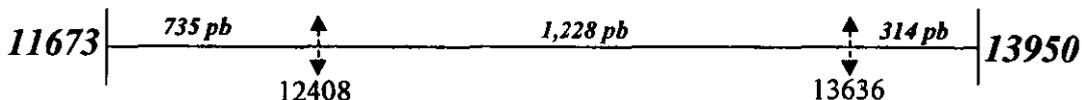
A) Para el subhaplogrupo C1, está ausente un sitio de reconocimiento en la posición 663 y está presente un sitio de reconocimiento en la posición 16517 para la enzima Hae III.



B) Para el subhaplogrupo C2, están ausentes los sitios de reconocimiento para la enzima Hae III en las posiciones 663 y 16517.



C) En ambos está ausente un sitio de reconocimiento para la enzima Hinc II en la posición 13259.



D) En ambos está presente un sitio de reconocimiento para la enzima AluI en la posición 5176.



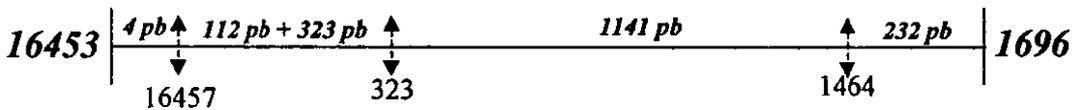
Esquema 3.

3.3) Definición de los subhaplogrupos D1 y D2

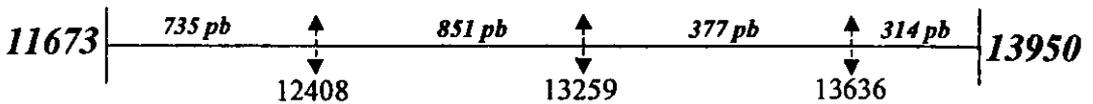
A) Para el subhaplogrupo D1, está ausente un sitio de reconocimiento en la posición 663 y está presente un sitio de reconocimiento en la posición 16517 para la enzima Hae III.



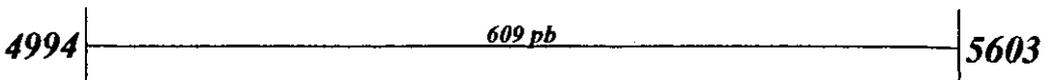
B) Para el subhaplogrupo D2, están presentes los sitios de reconocimiento para la enzima Hae III en las posiciones 663 y 16517.



C) Ambos presentan un sitio de reconocimiento para la enzima Hinc II en la posición 13259.



D) En ambos están ausentes el sitio de reconocimiento para la enzima AluI en la posición 5176.



Esquema 4.

4.4) Otros haplogrupos o probable B1 y B2.

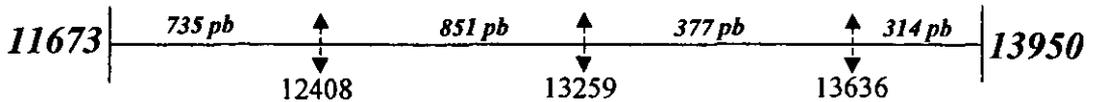
A) Para otro haplogrupo o probable B1, está ausente un sitio de reconocimiento en la posición 663 y además está presente el sitio de corte en la posición 16517, para la enzima Hae III.



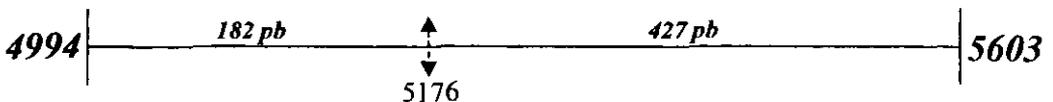
B) Para otro haplogrupo o probable B2, están ausentes los sitios de reconocimiento para la enzima Hae III en las posiciones 663 y 16517.



C) Ambos presentan un sitio de reconocimiento para la enzima Hinc II en la posición 13259.



D) Ambos presentan un sitio de reconocimiento para la enzima AluI en la posición 5176.



VI. RESULTADOS

Se obtuvo el DNA a partir de 10 ml de sangre periférica de los 74 indígenas, a una concentración de 100-200 ng/ μ l (Figura 1).

Para poder determinar los diferentes haplogrupos, cada uno de los 74 mtDNA de los indígenas fue amplificado mediante la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (tabla I). Los amplificados mostraron bandas inespecíficas que podrían interferir en nuestros resultados. Por lo que las bandas correspondientes a los productos específicos se purificaron a partir del gel mediante el "Kit" Geneclean II (Figura 2).

1) Subhaplogrupos A1 y A2.

Se caracterizaron 7 individuos pertenecientes al subhaplogrupo A1 (Tabla 2). En la figura 3A se muestra un gel de agarosa con los productos de restricción con la enzima Hae III. El individuo 3 de la población Otomí presentó los sitios de reconocimiento para la enzima HaeIII en las posiciones 663 y 16517, por lo que se agrupó al subhaplogrupo A1. Los individuos 122, 121 y 134 de la población Zapoteca y 26, 126 de la población Otomí, presentaron un patrón de corte diferente, por lo que se agruparon a otros subhaplogrupos.

Se agruparon 31 individuos en el subhaplogrupo A2 (Tabla 3). En la figura 3B se muestra un gel de agarosa con los productos de restricción con la enzima Hae III. Los individuos 26 y 8A perteneciente a la Mixteca costa, presentaron un sitio de reconocimiento para la enzima Hae III en la posición 663 y la ausencia de un sitio de corte para la misma enzima en la posición 16517, por lo que se agruparon al subhaplogrupo A2. El individuo 44 de pertenece a la población Mixteca costa y el individuo 41 de la Mixteca baja, tuvieron un patrón de corte diferente, por lo que se agruparon a otros subhaplogrupos.

2) Subhaplogrupos C1 y C2.

Se agruparon 4 individuos al subhaplogrupo C1 (Tabla 4). En la figura 4 se muestra un gel de agarosa con los productos de digestión con la enzima HincII. El individuo 14 pertenece de la población

Otomí, donde está ausente un sitio de reconocimiento para la enzima HincII en la posición 13259, agrupándose al subhaplogrupo C1.

De los 74 individuos analizados 5 se agruparon en el subhaplogrupo C2 (**Tabla 5**). En la **figura 4**, el individuo el 44 pertenece de la Mixteca costa y el 15 de la Mixteca baja, se agruparon al subhaplogrupo C2, debido a la ausencia de un sitio de reconocimiento para la enzima Hinc II en la posición 13259. El individuo 5P de la Mixteca alta y los individuos 6A, 8M y 16M de la Mixteca baja tuvieron un patrón de corte diferente, por lo que se agruparon a otros subhaplogrupos.

3) Subhaplogrupos D1 y D2.

Se agruparon 2 individuos al subhaplogrupo D1 (**Tabla 6**). En la **figura 5** se observa un gel de agarosa con los productos de digestión con la enzima AluI, el individuo 31 de la población Otomí no presenta un sitio de reconocimiento en la posición 5176 para esta enzima, agrupándose al subhaplogrupo D1. Los individuos 14 y 36 de la población Otomí, los individuos 85 y 88 de la Mixteca alta y el individuo 1 de la población Zapoteca, presentaron el sitio reconocimiento en la posición antes mencionada, por lo que se agruparon a otros subhaplogrupos. Solo 3 individuos (**Tabla7**) se agruparon al subhaplogrupo D2.

De los 22 individuos que no se agruparon a los diferentes subhaplogrupos, 17 de estos presentaron patrones de restricción diferentes como se observa en la **tabla 8**, por lo que podrían agruparse en el subhaplogrupo B1. Los 5 individuos restantes, también presentaron patrones de restricción diferentes como se observa en la **tabla 9**, por lo que podrían agruparse en el subhaplogrupo B2.



Figura 2. Electroforesis en el gel de agarosa del DNA genómico de individuos pertenecientes a la población indígena otomí. Un μl (200ng) de cada muestra fue sometida a electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio, como se describe en material y métodos. Los números corresponden a individuos diferentes.

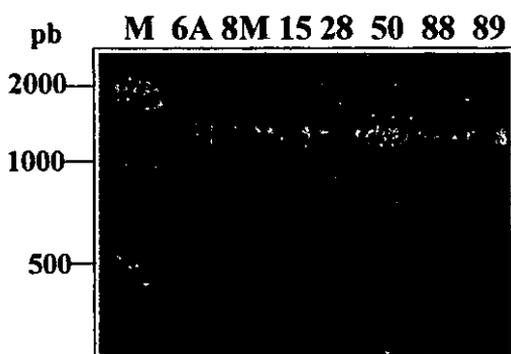


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos purificados por "GeneClean". Los productos amplificados se obtuvieron a partir de la región comprendida entre los nucleótidos 16453-1696 del mtDNA. Un μ l de cada muestra fue sometido a electroforesis en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Los números corresponden a muestras de diferentes indígenas mexicanos. M: marcador de peso molecular (escalera de 100 pb) (Gibco-BRL).

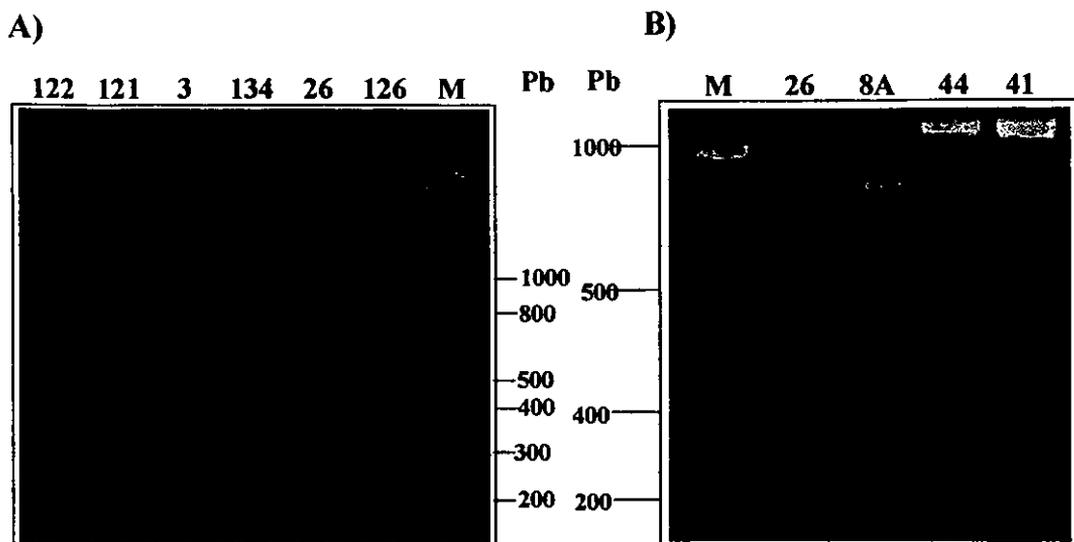


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de restricción con la enzima HaeIII. El producto amplificado de la región comprendida entre los nucleótidos 16453-1696 fue sometido a restricción con la enzima HaeIII como se describe en métodos. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñó con bromuro de etidio. **(A)** Restricción con la enzima HaeIII reconoce el sitio de corte en la posición 663. M: marcador de peso molecular (escala de 100 pb). **(B)** Restricción con la enzima HaeIII que reconoce la posición 16517. Se indican los tamaños de las bandas del marcador en pares de bases (pb). Los números corresponden a muestras diferentes de indígenas mexicanos.

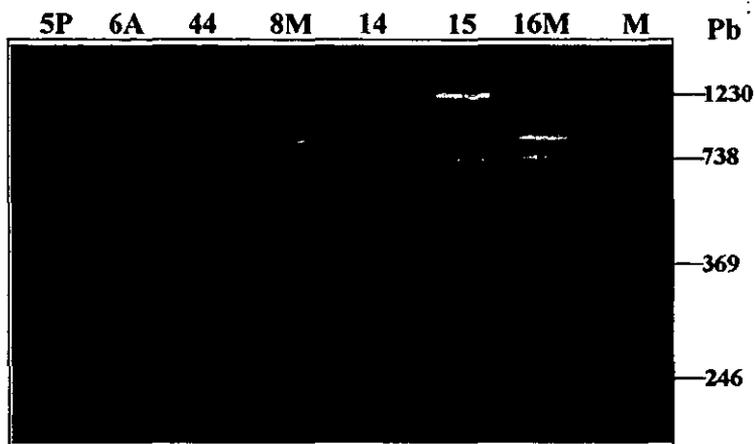


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de restricción con la enzima HincII. El producto amplificado de la región comprendida entre los nucleótidos 11673-13950 fue sometido a restricción con la enzima HincII como se describe en Métodos. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2.0% y se tiñó con bromuro de etidio. Los números corresponden a muestras de diferentes indígenas. M: marcador de peso molecular (escala de 100 pb). Se indican los tamaños de las bandas del marcador en pares de bases (pb).

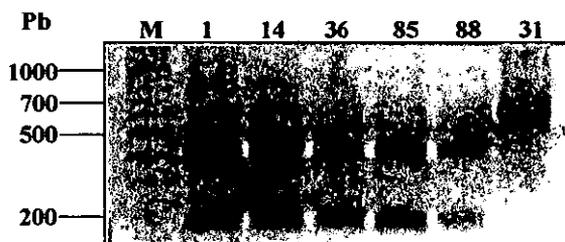


Figura 6. Electroforesis en el gel de agarosa de los productos de restricción con la enzima AluI. El producto amplificado de la región comprendida entre los nucleótidos 4994-5603 se sometió a restricción con la enzima AluI como se describe en métodos. Una alicuota de cada muestra se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 2.0% y se tiñó con bromuro de etidio. Los números corresponden a muestras de diferentes indígenas. M. marcador de peso molecular (escalerade 100 pb). Se indica los tamaños de las bandas del marcador en pares de bases.

TABLA 2

SUBHAPLOGRUPPO A1 EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

INDIVIDUOS	•Hae III 663	•Hinc II 13259	•Alu I 5176	•Hae III 16517
87-MA	+	+	+	+
25-MA	+	+	+	+
79-MA	+	+	+	+
80-MB	+	+	+	+
20-OT	+	+	+	+
3-OT	+	+	+	+
42-OT	+	+	+	+
TOTAL	7	7	7	7

MA: Mixteca alta, MB: Mixteca baja, OT: Otomías,

+: Presencia de un sitio de reconocimiento.

•: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y a la posición del sitio de reconocimiento.

TABLA 3

SUBHAPLOGRUPO A2 EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

INDIVIDUOS	•Hae III 663	•Hinc II 13259	•Alu I 5176	•Hae III 16517
21 A-MA	+	+	+	-
2A-MA	+	+	+	-
3M-MA	+	+	+	-
6A-MB	+	+	+	-
8A-MB	+	+	+	-
8M-MB	+	+	+	-
16M-MB	+	+	+	-
40-MB	+	+	+	-
39-MB	+	+	+	-
26-MC	+	+	+	-
47-MC	+	+	+	-
122-ZAP	+	+	+	-
121-ZAP	+	+	+	-
96-OT	+	+	+	-
91-OT	+	+	+	-
7-OT	+	+	+	-
8-OT	+	+	+	-
10-OT	+	+	+	-
2-OT	+	+	+	-
15-OT	+	+	+	-
18OT	+	+	+	-
19-OT	+	+	+	-
24-OT	+	+	+	-
27-OT	+	+	+	-
29-OT	+	+	+	-
45-OT	+	+	+	-
6-OT	+	+	+	-
5-OT	+	+	+	-
23-OT	+	+	+	-
16-OT	+	+	+	-
37-OT	+	+	+	-
TOTAL	31	31	31	31

MA: Mixteca alta, MB: Mixteca baja, MC: Mixteca costa, ZAP: Zapotecos, OT: Otomies +: Presencia de un sitio de reconocimiento. -: Ausencia de un sitio de reconocimiento.

•: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y a la posición del sitio de reconocimiento.

TABLA 4

SUBHAPLOGRUPO C1 EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS
--

INDIVIDUOS	●Hae III 663	●Hinc II 13259	●Alu I	●Hae III 16517
134-ZAP	-	-	+	+
21-OT	-	-	+	+
14-OT	-	-	+	+
4-OT	-	-	+	+
TOTAL	4	4	4	4

ZAP: Zapoteco, OT: Otomí.

+: Presencia de un sitio de reconocimiento.

-: Ausencia de un sitio de reconocimiento.

●: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y la posición del sitio de reconocimiento.

TABLA 5

SUBHAPLOGRUPO C2 EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

INDIVIDUOS	•Hae III 663	•Hinc II 13259	•Alu I 5176	•HaeIII 16517
14-MA	-	-	+	-
15-MB	-	-	+	-
44MC	-	-	+	-
120-MC	-	-	+	-
28-OT	-	-	+	-
TOTAL	5	5	5	5

MA: Mixteca Alta, MB: Mixteca Baja, MC: Mixteca Costa, OT: Otomías.

+: Presencia de un sitio de reconocimiento.

-: Ausencia de un sitio de reconocimiento.

•: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y a la posición del sitio de reconocimiento.

TABLA 6

SUBHAPLOGRUPO D1 EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

INDIVIDUOS	•Hae III 663	•Hinc II 13259	•Alu I 5176	•Hae III 16517
22-OT	-	+	-	+
31-OT	-	+	-	+
TOTAL	2	2	2	2

OT: Otomies.

+: Presencia de un sitio de reconocimiento.

-: Ausencia de un sitio de reconocimiento.

•: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y a la posición del sitio de reconocimiento.

TABLA 7

SUBHAPLOGRUPO D2 EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

INDIVIDUOS	•Hae III 663	•Hinc II 13259	•Alu I 5176	•Hae III 16517
41-MB	-	+	-	-
49-MC	-	+	-	-
126-OT	-	+	-	-
TOTAL	3	3	3	3

MB: Mixteca Baja, MC: Mixteca Costa, OT: Otomies.

+: Presencia de un sitio de reconocimiento.

-: Ausencia de un sitio de reconocimiento.

•: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y a la posición del sitio de reconocimiento.

TABLA 8

OTROS HAPLOGRUPOS EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

INDIVIDUOS	•Hae III 663	•Hinc II 13259	•Alu I 5176	•Hae III 16517
85M-MA	-	+	+	+
123-MA	-	+	+	+
89-MA	-	+	+	+
5P-MA	-	+	+	+
50-MA	-	+	+	+
88-MA	-	+	+	+
4-MA	-	+	+	+
13-MB	-	+	+	+
23-MB	-	+	+	+
27-MC	-	+	+	+
45-MC	-	+	+	+
1-ZAP	-	+	+	+
1-OT	-	+	+	+
2-OT	-	+	+	+
17-OT	-	+	+	+
25-OT	-	+	+	+
36-OT	-	+	+	+
TOTAL	17	17	17	17

MA : Mixteca Alta, MB: Mixteca Baja, MC: Mixteca Costa, ZAP = Zapotecos, OT: Otomies.

+: Presencia de un sitio de reconocimiento.

-: Ausencia de un sitio de reconocimiento.

•: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y a la posición del sitio de reconocimiento.

TABLA 9

OTROS HAPLOGRUPOS EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

INDIVIDUOS	●Hae III 663	●Hinc II 13259	●Alu I 5176	●Hae III 16517
26-OT	-	+	+	-
33-OT	-	+	+	-
7-MA	-	+	+	-
28-MA	-	+	+	-
46-ZAP	-	+	+	-
TOTAL	5	5	5	5

OT: Otomíes, MA: Mixteca Alta, ZAP: Zapotecos, +: Presencia del sitio de corte.

+: Presencia de un sitio de reconocimiento.

-: Ausencia de un sitio de reconocimiento.

●: Corresponde a la enzima que define al subhaplogrupo y a la posición del sitio de reconocimiento.

VII. DISCUSION.

Por mucho tiempo el empleo de marcadores genéticos nucleares, estudios lingüísticos, arqueológicos y dentales han sido las bases para el conocimiento del parentesco en humanos. Estudios en el mtDNA han revolucionado la antropología molecular, debido a su empleo en diversos estudios como en los procesos migratorios del poblamiento prehistórico de América. La variación genética en la secuencia del DNA mitocondrial, permite comparar diferentes poblaciones separadas geográficamente, mediante los cambios en los patrones de restricción en diferentes regiones del mtDNA.

Por tal motivo, se estudió el polimorfismo del mtDNA de individuos no emparentados, residentes del Distrito Federal y pertenecientes a diferentes grupos indígenas cuyos padres y abuelos mexicanos fueron originarios de la misma población de los sujetos estudiados.

Al caracterizar los haplogrupos en estas poblaciones mexicanas, se encontró variabilidad en éstos, debido a la presencia de un sitio de reconocimiento en la posición 16517 para la enzima HaeIII, que permitió clasificarlos en diversos subhaplogrupos (A1, A2, C1, C2, D1, D2). Esta clasificación fue propuesta por Bailliet y col. (Bailliet *et al.*, 1994) y sugiere que la presencia o ausencia de este sitio de reconocimiento genera haplotipos adicionales, lo que da la posibilidad de incrementar haplotipos fundadores.

POBLACION OTOMI.

Una de las poblaciones interesantes en este estudio fue la población Otomí debido a que no existen reportes de subhaplogrupos. Esta población mostró todos los subhaplogrupos como se puede observar en la **tabla 10**. El subhaplogrupo más frecuente fue A2 (51.42%), los menos frecuentes fueron C2 (2.85%) y D2 (2.85%) Al comparar estos resultados con otras poblaciones analizadas, la población Maya fue la que mostró mayor similitud (Schurr *et al.*, 1990). En Norteamérica, algunas poblaciones presentan los cuatro haplogrupos como: Cheyenne, Bella Colla, Nuu-Chah-Nulth, Siouan, California Penutian y Seminole. Sin embargo, en Suramérica, solamente una población llamada Huilliche, presenta un resultado parecido. El número de individuos en la población Otomí es mayor a las demás poblaciones analizadas en este trabajo y de acuerdo a esto, se ha sugerido que al aumentar el número de

individuos en poblaciones indígenas de América podría aumentar la posibilidad de encontrar los cuatro haplogrupos o de encontrar variantes en estos haplogrupos (Merriwether *et al* 1995a).

POBLACION MIXTECA ALTA.

Los resultados observados en los individuos agrupados en la población Mixteca alta del Valle central de Oaxaca, muestran la presencia de los subhaplogrupos A1 (18.75%), A2 (18.75%), C2 (6.25%) y ausente los subhaplogrupos C1, D1, D2 y el resto de los individuos no fueron identificables a los diferentes subhaplogrupos, pero se sugiere que se agrupen en los subhaplogrupos B1 y B2 (Tabla 10). Estos datos concuerda con otras investigaciones realizadas en la población de la Mixteca alta de Oaxaca, donde se observa una mayor frecuencia del haplogrupo A y no muestra el haplogrupo D (Torroni *et al.*, 1994).

POBLACION MIXTECA BAJA.

Los subhaplogrupos presentes en la población Mixteca baja fueron los siguientes: A2 (54.54 %), A1 (9.09%), C2 (9.09%), D2 (9.09%) y están ausentes los subhaplogrupos C1, D1 y el resto de los individuos no fueron identificables a los diferentes subhaplogrupos, pero se sugiere que se agrupen en los subhaplogrupos B1 y B2 (Tabla 10). El haplogrupo D está presente en mayor frecuencia en Sudamérica y su frecuencia varía en Norteamérica y Centroamérica (Merriwether *et al.*, 1995a). Se han descrito diversas poblaciones de indígenas americanos con el subhaplogrupo D2, generalmente estas poblaciones pertenecen al grupo de Na-dene. En caso de nuestra población, la presencia de D2 puede deberse a una mezcla con otras poblaciones (Torroni *et al.*, 1993).

POBLACION MIXTECA COSTA.

La población Mixteca costa, mostró los subhaplogrupos A2 (28.57%), C2 (28.57%) y D2 (14.28%) y el resto de los individuos no fueron identificables a los diferentes subhaplogrupos, pero se sugiere que se agrupen a otros haplogrupos (Tabla 10). Este es el primer reporte de subhaplogrupos en esta población. Presenta similitudes con las poblaciones de la Mixteca alta y baja por la ausencia del subhaplogrupo C1 y D1.

En las poblaciones de la Mixteca alta, baja y costa, existe heterogeneidad de subhaplogrupos, a pesar de ubicarse en regiones contiguas. Por otro lado, es interesante, mencionar que estas poblaciones se encontraron los subhaplogrupos D1 y D2, siendo el primer reporte de éstos en estas poblaciones. La ausencia del subhaplogrupo A1 en la población Mixteca costa podría deberse al número reducido de la muestra.

POBLACION ZAPOTECA

La población Zapoteca muestra los subhaplogrupos A2 (40%), C1 (20%) y el resto de los individuos no fueron identificables a los diferentes subhaplogrupos antes mencionados, pero se sugiere que se agrupen a otros haplogrupos como probable B1 o B2 (40%). En esta población están ausentes los subhaplogrupos A1, C2, D1 y D2 (**Tabla 10**). La ausencia de varios subhaplogrupos en esta población podría ser al número limitado de muestra. Existe un reporte de subhaplogrupos en otra población Zapoteca (Merriwether *et al.*, 1996)., solamente existe similitud en la presencia del subhaplogrupo A1 y en la ausencia de los subhaplogrupos D1 y D2.

El subhaplogrupo más frecuente en las poblaciones mexicanas analizadas en este estudio, fueron los subhaplogrupos A2 (41.89%) y A1 (9.45%) (**Gráfica 1**). Este dato concuerda con lo informado, donde el haplogrupo A está presente en mayor frecuencia en Norte América y en menor frecuencia en las poblaciones de Suramérica. Además, está presente en baja frecuencia en poblaciones de Asia y ausente en las poblaciones de Siberia. (Merriwether *et al.*, 1995a). Los haplogrupos con menor frecuencia en las poblaciones mexicanas analizadas fueron los subhaplogrupos: C1 (5.40%), C2 (6.75%), D1 (2.70%) y D2 (4.05%) (**Gráfica 1**). La frecuencia de los haplogrupos C y D varía mucho en el Norte, Centro y Suramérica (Merriwether *et al.*, 1995a)

Por otra parte, para establecer el grado de mestizaje en las poblaciones Mixteca baja, costa y alta, se realizaron los estudios de grupos sanguíneos ABO, Rh, Ss, Fy, Jk y tipos de fosfatasa ácida. La diferencia obtenida en la frecuencia de grupos sanguíneos ABO entre los individuos de las 3 poblaciones fue estadísticamente significativa. La población Mixteca alta presenta una elevada frecuencia de genes indios, a diferencia de la población Mixteca baja que presenta genes caucásicos

y la población Mixteca costa que presenta una elevada frecuencia de genes africanos (Buentello *et al.*, 1999), por lo que las poblaciones de la Mixteca son heterogéneas.

La posible presencia de otros haplogrupos en poblaciones indígena mexicanas podría ser el resultado de mestizaje con poblaciones caucásicas (Brown *et al.*, 1998). Sin embargo, de acuerdo a lo reportado se sugiere que las poblaciones Mixteca alta, baja, costa, Zapoteca y Maya presentan una alta frecuencia de los subhaplogrupo B1 o B2. Este haplogrupo está distribuido en menor frecuencia en Norteamérica y en mayor frecuencia en Suramérica (Merriwether *et al.*, 1995a).

Por otra parte, el debate que existe sobre el número de migraciones que se realizaron al Nuevo Mundo, mediante el análisis del cromosoma Y, podría ofrecer la posibilidad de estudiar la migración masculina y compararla con la migración femenina (Lell *et al.*, 1997).

Es interesante comentar que la comparación de los subhaplogrupos del mtDNA de las poblaciones Mixteca alta y Zapoteca obtenidos en este trabajo, con lo reportes de los alelos del cromosoma Y en estas mismas poblaciones (Karafet *et al.*, 1997), sugieren la hipótesis de un origen común de todas las poblaciones del nuevo mundo

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio indican que la frecuencia de los subhaplogrupos entre las poblaciones indígenas mexicanas es muy heterogénea. Sin embargo, con la finalidad de confirmar esta heterogeneidad, sería de interés ampliar, en estudios posteriores, un mayor número de muestras, ampliar en número de poblaciones e iniciar el estudio con marcadores del cromosoma Y.

TABLA 10

FRECUENCIA DE SUBHAPLOGRUPOS EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS

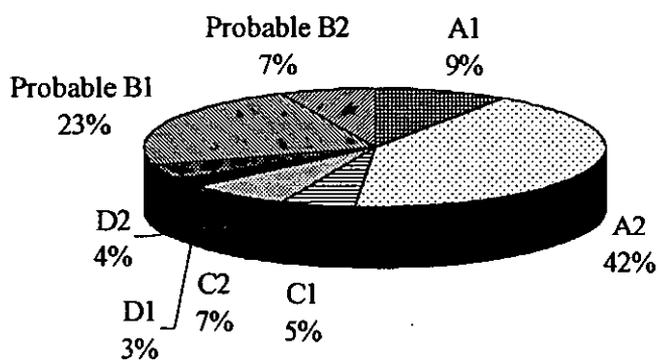
POBLACION	No.	FRECUENCIA						
		A1	A2	C1	C2	D1	D2	OTROS
Mixteca alta	16	(3) 18.75	(3) 18.75	(0) A*	(1) 6.25	(0) A*	(0) A*	(9) 56.25
Mixteca baja	11	(1) 9.09	(6) 54.54	(0) A*	(1) 9.09	(0) A*	(1) 9.09	(2) 18.18
Mixteca costa	7	(0) A*	(2) 28.57	(0) A*	(2) 28.57	(0) A*	(1) 14.28	(2) 28.57
Zapoteca	5	(0) A*	(2) 40.00	(1) 20.00	(0) A*	(0) A*	(0) A*	(2) 40.0
Otomí	35	(3) 8.57	(18) 51.42	(3) 8.57	(1) 2.85	(2) 5.71	(1) 2.85	(7) 20
Total	74							

A* : Ausente

N: número de casos

GRAFICA 1

SUBHAPLOGRUPOS PRESENTES EN POBLACIONES INDIGENAS MEXICANAS



VIII. REFERENCIAS.

- Acevedo C. M.L., Roble M. A. (1994). Pueblos indígenas de México. Mixtecos. *Instituto Nacional Indigenista. Secretaria de Desarrollo Social.*
- Bailliet G., Rothhammer F., Carnese F.R., Bravi C.M., Bianchi N.O. (1994). Founder mitochondrial haplotypes in Amerindian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 54:27-33.
- Bonnatto S.L., Redd A.J., Salzano F.M., Stoneking M.(1996). Lack of ancient Polynesian-Amerindian contact. *Am. J. Hum. Genet.* 59:253-256.
- Bonatto S.L., Salzano F.M. (1997a). A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.* 9:1866-1871.
- Brown M.D., Hosseini S.H., Torroni A., Bandelt Hans-Jürgen, Allen J.C., Schurr T.G., Scozzari R., Cruciani F., Wallace D.C. (1998). mtDNA haplogroup X: An ancient link between Europe/western Asia and North America? *Am J. Hum. Genet.* 63:1852-1861.
- Buentello L., García P., Lisker R., Salamanca F., Peñaloza R. (1999). Blood groups and red cell acid phosphatase types in a Mixteca population resident in Mexico City. *Am. J. Hum. Biol.* 11: 525-529.
- Ciminelli B.M., Pompei F., Malaspina P., Hammer M., Persichetti F., Pignatti P.F., Palena A., Anagnou N., Guanti G., Jodice C., Terrenato L., Novelletto A. (1995). Recurrent simple tandem repeat mutations during human Y-chromosome radiation in Caucasian subpopulations. *J. Mol. Evol.* 41:966-973.
- Easton R.D., Merriwether D.A., Crews D.E., Ferrell R.E. (1996). mtDNA variation in the Yanomami: Evidence for additional new world founding lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 59:213-225.

- Forster P., Harding R., Torroni A., Bandelt H. (1996). Origin and evolution of Native American mtDNA variation: A reappraisal. *Am. J. Hum. Genet.* 59:935-945.
- González R. A., (1994). Pueblos indígenas de México. Los Zapotecos de Valles Centrales. *Instituto Nacional Indigenista. Secretaria de Desarrollo Social.*
- Greenberg J.H., Turner C.G., Zegura S.L. (1986). The settlement of the Americas: A comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr. Anthropol.* 4:477-497.
- Isidro M. G. (1994). Pueblos indígenas de México. Los otomíes del estado de México. *Instituto Nacional Indigenista. Secretaria de Desarrollo Social.*
- Karp G. (1998). *Biología celular y Molecular.* Primera edición. McGraw-Hill interamericana.
- Karafet T.M., Zegura S.L., Vuturo-Brady J., Posukh O., Osipova L., Weibe V., Romero F. (1997) Y chromosome markers and trans-Bering Strait dispersals. *Am. J. Phys. Anthropol.* 102:301-314.
- Karafet T.M., Zegura S.L., Posukh O., Osipova L., Bergen A., Long J., Goldman D., Klitz W., Harihara S., Knijff P., Wiebe V., Griffiths R.C., Templeton A.R., Hammer M.F. (1999). Ancestral Asian source(s) of New World Y-Chromosome founder haplotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 64:817-831.
- Kempton B. (1992). Quick preparation of high molecular weight DNA by freezing. *TIG.* 8: 7-8.
- Kolman C. J., Sambuughin N., Bermingham E., (1996). Mitochondrial DNA analysis of Mongolian populations and implications for the origin of new world founders. *Genetics* 142: 1321-1334.
- Lell J.T., Brown M.D., Schurr T.G., Sukernik R.I., Starikovskaya Y.B., Torroni A., Moore L.G., Troup G.M., Wallace D.C. (1997). Y chromosome polymorphisms in Native American and Siberian populations: identification of Native American Y chromosome haplotypes. *Hum. Genet.* 100:536-543.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1989). A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Margulis L. (1970). Origin of eukaryotic cells New haven: Yale University Press.

Merriwether D.A., Rothhammer F., Ferrell R.E. (1995a). Distribution of the four founding lineage haplotypes in native americans suggests a single wave of migration for the new world. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98: 411-430.

Merriwether D.A., Hall W.W., Vahlne A., Ferrell R.E. (1996). mtDNA variation indicates Mongolia may have been the source for the founding population for the new world. *Am. J. Hum. Genet.* 59:204-212.

Nils-Göran L., Clayton D.A. (1995). Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders. *Annu. Rev. Biochem.* 29:151-178.

Poulton J., Morten K., Freeman-Emmerson C., Potter C., Sewry C., Dubowitz V., Kidd H., Stephenson J., Whitehouse W., Hansen F.J, Parisi M., Brown G. (1994). Deficiency of the human mitochondrial transcription factor h-mtTFA in infantile mitochondrial myopathy is associated with mtDNA depletion *Hum. Mol. Genet.* 3:10:1763-1769.

Ríos M.M., (1994). Los Zapotecos de sierra norte de Oaxaca. *Instituto Nacional Indigenista. Secretaria de Desarrollo Social.*

Santos M., Barrantes R. (1994) D-Loop mtDNA deletion as a unique marker of Chibchan Amerindians. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 413-414

Scriver R.C., Beuadet A.L., Sly W.S., Valle D. (1995). The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. I. Seventh Edition. Cap. 45. Edit. McGraw-Hill.

Schapira A.H.V., (1993). Mitochondrial disorders. *Curr. Biol.* 3:457-465

Schurr, T.G., Ballinger S.W., Gan Yik-Yuen, Hodge J.A., Merriwether D.A., Lawrence D.N., Knowler W.C., Weiss K.M., Wallace D.C. (1990) Amerindian mitochondrial DNAs have rare Asian mutations at high frequencies, suggesting they derived from four primary maternal lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 46:613-623.

Scozzari R., Cruciani F., Santolomazza P., Sellitto D., Cole D.E.C., Rubin L.A., Labuda D., Marini E., Succa V., Vona G., Torroni A. (1997). mtDNA and Y chromosome-specific polymorphisms in modern Ojibwa: Implications about the origin of their gene pool. *Am. J. Hum. Genet.* 60:241-244.

Serrano C. (1995). Genes, evolución y diversidad humana. Temas de antropología, molecular. *Instituto de Investigaciones Antropológicas, UNAM.*

Shoubridge E.A., Johns T., Karpati G. (1997). Complete restoration of a wild-type mtDNA genotype in regenerating muscle fibres in a patient with a tRNA point mutation and mitochondrial encephalomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* 6:2239-2242.

Starikovskaya Y.B., Sukernik R.I., Schurr T.G., Kogelnik A.M., Wallace D.C. (1998). mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implications for the genetic history of ancient Beringia and the peopling of the new world. *Am.J.Hum. Genet.* 63:1473-1491.

Stone A.C., Stoneking M. (1998). mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: Implications for the peopling of the new world. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1153-1170.

Szathmary, E.J.E., (1993) mtDNA and the peopling of the Americas. *Am. J. Hum. Genet.* 53:793-799.

Torroni A., Schurr T.G, Yang Chi-Chuan, Szathmary E.J.E, Williams R.C., Schanfield M.S., Troup G.A., Knowler W.C., Lawrence D.N., Weiss K.M., Wallace D.C. (1992). Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics.* 130:153-162.

Torroni A., Schurr T.G., Cabell M.F., Brown M.D., Neel J.V., Larsen M., Smith D.G, Vullo C.M., Wallace D.C. (1993). Asia affinities and continental radiation of the four founding native american mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* **53**:563-590.

Torroni A., Chen Yu-Sheng, Semino O., Santachiara-Beneceretti S.S., Scott C.R., Lott M.T., Winter M., Wallace D.C. (1994). mtDNA and Y-chromosome polymorphisms in four native American populations from souther Mexico. *Am. J. Hum. Genet.* **54**:303-318.

Torroni A., Wallace D.C. (1995). mtDNA haplogrupos in Native Americans. *Am. J. Hum. Genet.* **56**:1234-1236.

Vázquez V.H. (1995). Los Otomíes del Valle del mezquital, Hidalgo. *Etnografía de los pueblos indígenas de México centro. Instituto Nacional Indigenista. Secretaría de Desarrollo Social.*

Wallace D.C. (1992a). Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **61**:1175-1212.

Wallace D.C. (1992b). Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases?. *Science.* **256**: 628-632.

Wallace D.C. (1993). Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *TIG.* **9**:4:128-133.

Ward R.H., Frazier B.L., Dew-Jager K., Pääbo S. (1991). Extensive mitochondrial diversity within a single Amerindian tribe. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:8720-8724.