

00346  
2



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DEL SEXO A PARTIR DEL DNA DE  
RESTOS OSEOS DE INDIVIDUOS INFANTILES  
SACRIFICADOS

**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  
BIOL. EXP. MARIA ISABEL DE LA CRUZ LAINA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO

MEXICO, D.F.

2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS  
DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/1100/01

ASUNTO: Asignación de Sinodales.

DR. ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO  
PRESENTE.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) BIÓL. EXP. MARÍA ISABEL DE LA CRUZ LAINA, quien desarrolló el Trabajo de Tesis titulado: IDENTIFICACIÓN DEL SEXO A PARTIR DEL DNA DE RESTOS ÓSEOS DE INDIVIDUOS INFANTILES SACRIFICADOS.

Asimismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR).

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DRA.	ANNIE PARDO SEMO
PRIMER VOCAL	: DR.	ALFONSO MIGUEL TORRE BLANCO
SEGUNDO VOCAL	: DR.	LUIS MEDRANO GONZÁLEZ
TERCER VOCAL	: DRA.	MARÍA DE LOURDES MUÑOZ MORENO
SECRETARIO	: M. EN I.B.B.	HIRAM OLIVERA DÍAZ
SUPLENTE	: DR.	VÍCTOR MANUEL VALDÉS LÓPEZ
SUPLENTE	: DRA.	LOURDES MÁRQUEZ MORFÍN

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D. F., 30 de agosto de 2001  
JEFE DE LA DIVISIÓN

*Dra. Virginia Aprión Batule*  
DRA. MARGARITA COLLAZO ORTEGA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MCO/ASR/

La Dirección General de Bibliotecas se  
a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional  
NOMBRE: María Isabel de  
La Cruz Laina  
FECHA: 22/11/02  
FIRMA: [Firma]

## *DEDICATORIAS*

A mis padres Ramón y Felipa por sus enseñanzas que me han acompañado en toda mi vida y su amor incondicional, a mis hermanos Ramón y Karina por todas las vivencias y sinsabores que hemos compartido como familia; y que me han hecho ser la persona que soy.

A mis abuelitos Rosendo, Enedina, Aristeo y Braulia que llenaron mi niñez con amor y cuidados.

A mis tíos, tías, primos y primas por los momentos felices que hemos pasado.

A mi primo Pedro Camacho Laina por el apoyo desinteresado que siempre me brindo en el momento que más le necesite y que me permitió seguir adelante. GRACIAS.

A la memoria de mi mamá Cleme, que estés donde estés, aunque han pasado muchos años; aún te sigo recordando.

De una forma sumamente especial con profundo amor, agradecimiento y gratitud a Dios mi señor y Salvador que me ha permitido lograr y aumentar cada día mis expectativas, más allá de lo que imagine. ¡Gracias SEÑOR!, por tu dirección.

*“Te ruego que me des tu bendición, que ensanches mi territorio,  
que tu mano esté conmigo y que me libres del mal, para que no me dañe.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfonso Torre Blanco por el apoyo que me a brindado, porque con su dirección he logrado culminar este proyecto, también por su confianza y paciencia para conmigo.

A la M. en C. Alejandra Quintanar Isaías porque gracias a su amistad, consejo y apoyo pude adentrarme en el área de la investigación y ensanchar mis horizontes.

Al antropólogo Físico Juan Alberto Román Berrelleza quién nos proporciono el material óseo y me ayudo con la parte antropológica. Gracias por tu amistad y tu apoyo en la realización de está tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica:

- ☐ Angélica que me enseñó las técnicas para extraer y purificar el DNA antiguo
- ☐ A Remedios que me brindo su amistad y asesoramientos en muchos aspectos técnicos desconocidos por mi.
- ☐ A Jorge que me enseñó y ayudo a escanear, por sus acertados comentarios, para mejora de esta tesis.

Al matrimonio Fabián Hernández, que me han demostrado muchas veces lo que significa una verdadera amistad, y siempre han estado conmigo a cada paso del camino y puedo contar con su apoyo en todo momento de mi vida.

A mi comité tutorial conformado por: la Dra. Annie Pardo, Dr. Luis Medrano, Dr. Hiram Olivera, Dr. Víctor Valdés, Dra. Lourdes Muñoz y Dra. Lourdes Marquéz; por su disposición y sugerencias en la revisión de esta tesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina Suero de Bovino
bp	Pares de Bases
d.C	Después de Cristo
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosforilados
EDTA	Ácido Etilendiamino Tetraacético
HCl	Ácido Clorhídrico
M	Molar
mM	Milimolar
Min.	Minutos
N	Normal
NaI	Ioduro de Sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
s.	Segundos
TAE	Tris- Ácido acético-Ácido Etilendiamino Tetraacético
TBE	Tris- Ácido bórico-Ácido Etilendiamino Tetraacético

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	4
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
1.1 Problemática General de los Sacrificios de Infantes	5
1.1.1 Información de las Fuentes	6
1.1.2 Evidencia Arqueológica	11
1.2 La Identificación del Sexo en Infantes	13
1.3 La Identificación del Sexo en Restos Humanos desde la Perspectiva de la Biología Molecular	14
1.4 Relación entre Sexo y Sacrificios Humanos	16
<b>II. OBJETIVO GENERAL</b>	17
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
3.1 Muestra de Estudio	18
3.2 Limpieza de las Muestras	21
3.3 Estandarización de la Metodología	21
3.4 Técnicas de Extracción y Purificación de DNA	22
3.5 Amplificación de Secuencias Específicas por PCR	25
3.6 Análisis de los Productos de la PCR	28
<b>IV. RESULTADOS</b>	29
<b>V. DISCUSIÓN</b>	34
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	37
<b>VII. REFERENCIAS</b>	38
<b>APÉNDICE DE FIGURAS</b>	43
Figura 1a. Gen de la amelogenina	44
Figura 1b. Localización de los iniciadores utilizados Por Faerman <i>et al.</i> 1995	45
Figura 2ª. Localización de Tlatelolco en el Lago de Texcoco en la Época precortesiana.	46
Figura 2b. Localización de los entierros en el Templo de Ehécatl-Quetzalcóatl.	47

Figura 3. Extracción de DNA Total	48
Figura 4. Productos de Amplificación del Cromosoma Y utilizando los Iniciadores M4, M5 y M6	49
Figura 5. Productos de Amplificación del Cromosoma X y Y utilizando los Iniciadores COM, XSP y YSP	50

## RESUMEN

En el presente trabajo se identificó el sexo de los restos óseos de individuos infantiles recuperados de la zona arqueológica de Tlatelolco utilizando una técnica basada en la amplificación de regiones específicas (intrón I) de los alelos divergentes del cromosoma X y Y del gen de la amelogenina.

Se seleccionaron esqueletos de 30 individuos infantiles, 3 adolescentes y 1 adulto, de un depósito mortuario localizado bajo la plataforma frontal del Templo R que está situado en la esquina suroeste de la actual zona arqueológica de Tlatelolco. Este templo fue edificado paralelamente a la cuarta etapa constructiva del Templo Mayor de Tlatelolco (1428-1465 d.C) y dedicado al dios del viento Ehécatl-Quetzalcóatl, quien era considerado uno de los Tlaloques, deidades ayudantes de Tlalóc. La evidencia arqueológica encontrada en el complejo ceremonial muestra que los entierros fueron depositados simultáneamente y ofrendados como un acto de sacrificio en honor de los Tlaloques, en este caso a Ehécatl-Quetzalcóatl.

Se estandarizaron tres métodos de extracción y purificación del DNA antiguo así como las condiciones de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El análisis de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa se hizo con electroforesis en geles de poliacrilamida. Dependiendo del tamaño del producto de la PCR el individuo analizado fue identificado como perteneciente al sexo masculino o femenino. De los 34 individuos analizados, 29 pertenecen al sexo masculino, a los cinco individuos restantes no se les pudo asignar esta variable biológica, debido a que no se obtuvo producto de amplificación de la PCR.

Estos resultados concuerdan con lo escrito en las fuentes del siglo XVI de que las víctimas seleccionadas eran la personificación viva de la deidad a la que iban a ser sacrificadas. En el caso de los Tlaloques, los niños fueron frecuentemente seleccionados para personificar estas pequeñas deidades. Estos resultados sugieren que esta personificación también incluye una selección sexual de las víctimas.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. 1. Problemática General de los Sacrificios de Infantes

Las fiestas del calendario mexica constituían un complejo sistema ritual y uno de los aspectos más sobresalientes de la vida en el México antiguo (Broda 1979).

La preocupación fundamental del culto mexica giraba alrededor de la lluvia y de la fertilidad de la tierra, según es de esperar en una cultura que tiene su sustento básico en la agricultura. Estos fenómenos naturales -las lluvias que hacen crecer las plantas y son la condición necesaria de la agricultura, pero que presentan al mismo tiempo los aspectos amenazantes como eran las tormentas, las heladas y las inundaciones-, llegaron a ser personificados en dioses que se agrupaban en torno a una deidad principal como era el dios Tláloc (Broda 1982). Para rendirle culto se establecieron ceremonias que se regían por un calendario solar llamado *xihuitl*, el cual se dividía en 18 "meses" de 20 días y 5 días al final denominados "inútiles" o *nemontemi*. A cada uno de los 18 meses compuestos de 20 días en que estaba dividido el calendario correspondía una o varias ceremonias dedicadas a alguna o a varias deidades, y tenían un fin previamente determinado; por ejemplo, propiciar la llegada puntual de la lluvia y controlar su escasez o su exceso, conjurar la sequía, fertilizar la tierra. Es notorio, desde luego, el predominio de los ritos consagrados a los dioses relacionados con el agua y los "mantenimientos" (la tierra y los cultivos); por ejemplo, en siete de los dieciocho meses adoraban específicamente a los Tlaloques (González 1985).

Los sacrificios humanos eran una pieza clave en las ceremonias de petición de lluvias entre la población mexica, la espectacularidad y el carácter comunal eran sus características más importantes. Los sacrificios se efectuaban en momentos críticos en que había peligro de un desajuste de la energía del cosmos y, por lo tanto, de que sobreviniera el caos; la mayor parte de los momentos críticos coincidían con el ciclo de la naturaleza que era recurrente. Esta recurrencia de los fenómenos de la naturaleza era prevista por los sacerdotes utilizando el calendario anual de 365 días, que marcaba con precisión el momento en que debían efectuarse los ritos destinados especialmente a la prevención de los desastres en la agricultura. Realizar el sacrificio en el instante apropiado era uno de los requisitos indispensables para que fuese eficaz; por ello no sólo se indicaba el día del año

en el que debía efectuarse sino también la hora del día y de la noche, que tenían que coincidir con la deidad o la función del rito. Todos los sacrificios se efectuaban en lugares especiales que reunieran un requisito básico: el de ser sagrados, característica que adquirirían porque en ellos se podía establecer la comunicación con la deidad. La naturaleza sagrada de estos sitios era permanente porque tenían alguna particularidad especial, tal es el caso de nacimientos de agua, cúspides de cerros, remolinos de agua, cruces de caminos, o por haber realizado en ellos alguna consagración. En los sitios sagrados casi siempre había una imagen antropomórfica o simbólica (González 1985). En honor de Tlalóc y de los dioses del maíz se sacrificaban muchos niños cuya edad aumentaba conforme la planta del maíz iba creciendo; de igual manera la edad de ciertas víctimas femeninas aumentaba a medida que avanzaba el año (González 1985). Cuando las lluvias se retrasaban, lo cual ocasionaba fuertes y prolongadas sequías, se pensaba que era porque los Tlaloques estaban ofendidos por algún motivo y, como castigo, se las habían llevado. Para aplacar sus fuerzas destructoras y congratularse con ellos durante ciertas épocas del año se les hacían sacrificios de niños de distintas edades, desde los niños de "teta" hasta los de ocho años (Román 1990).

### ***1.1.1 Información de las Fuentes***

Los cronistas del siglo XVI coinciden en mencionar que entre los antiguos mexicanos existía la costumbre de comprar niños a lo largo del año y sacrificarlos en las distintas fechas que señalaba su calendario ritual. Son variadas las menciones de los cronistas que dan cuenta de esta práctica y algunos de ellos realizan una detallada descripción de estos rituales, principalmente el dedicado al dios mexicana de la lluvia, Tlalóc y sus ayudantes los Tlaloques. Por ejemplo: Sahagún (1975) afirma que el sacrificio de niños se realizaba durante los primeros cuatro meses del calendario: *atlcahualo*, *tlacaxipehualiztli*, *tozoztontli* y *huey tozoztli* (febrero, marzo, abril y mayo actuales).

*En el mes atlcahualo celebraban una fiesta a honra, de los dioses Tlaloques que los tenían por dioses de la lluvia, de su hermana la diosa del agua Chalchiuhtlicue; y a honra del gran sacerdote o dios de los vientos Quetzalcóatl. Mataban muchos niños de teta, comprándolos a sus madres; escogían aquellos que tenían dos remolinos en la cabeza y que hubiesen nacido en buen signo: los sacrificaban en muchos lugares y en las cumbres de los montes, sacándoles los corazones a honra de los dioses del*

*agua. A los niños que mataban los vestían con ricos atavíos para llevarlos a matar, y los llevaban en unas literas sobre hombros y las literas estaban adornadas con plumajes y con flores: iban tañendo, cantando y bailando delante de ellos. Cuando llevaban a los niños a matar si lloraban y echaban muchas lágrimas, los que los llevaban se alegraban, porque tomaban pronóstico de que habían de tener muchas aguas en ese año (Sahagún 1975: 77).*

*Al tercer mes llamaban tozoztontli: en el primer día de este mes hacían fiesta al dios llamado Tláloc, que es dios de las lluvias. En esta fiesta mataban muchos niños sobre los montes; los ofrecían en sacrificio a este dios y a sus compañeros para que les diesen agua (Sahagún 1975: 79-80).*

Existen detalles interesantes en relación con el ritual del sacrificio de los niños, Sahagún (1975) menciona que a los niños que iban a ser sacrificados los ataviaban con collares y brazaletes de piedras preciosas, los adornaban con tocados de plumas y les pintaban la cara con ulli líquido, además les colocaban alas de papel, insignias que en opinión de Broda (1979) eran las típicas de los dioses de la lluvia, los Tlaloques (Román 1990).

Otra fiesta dedicada al ciclo ritual del maíz y de la estación de lluvias principiaba con el mes indígena de etzalcualiztli, correspondiente a fines de mayo principios de junio. En esta fiesta se sacrificaba un representante vivo de Tláloc y de su esposa Chalchiuhtlicue -la diosa de la laguna y del agua dulce (Broda 1982).

Según Durán (1967: I 171) *En el mes etzalcualiztli, En la fiesta de Tláloc había también conmemoración y colecta del agua, se sacrificaba una niña vestida de azul que degollaban en la laguna grande a honor y reverencia de Chalchiuhtlicue (diosa de las fuentes y ríos). En opinión de Sahagún en este mes hacían fiesta a honra de los dioses del agua, o de la lluvia, que llamaban Tlaloque, mataban muchos cautivos y otros esclavos, compuestos con los ornamentos de estos dioses llamados Tlaloques, por cuya honra los mataban en su mismo cu (palacio). Acabado de matar a éstos, luego tomaban todas las ofrendas de papel, y plumajes y piedras preciosas y chalchihuites, y los llevaban a un lugar de la laguna que llaman Pantitlan. También llevaban los corazones de todos los que habían muerto, metidos en una olla*

*llamada mixcómitl, "vasija de nubes", pintada de azul y teñida con ulli en cuatro partes (Sahagún 1975: 82, 118).*

Fray Bernardo de Benavente (1979: 35-36) afirma, que en los pueblos que había señores principales, que a su casa llamaban palacio, sacrificaban un niño y una niña de edad de hasta tres o cuatro años; éstos no eran esclavos, sino hijos de principales, y este sacrificio se hacía en un monte en reverencia de un ídolo que decían que era el dios del agua y que les daba la lluvia, y cuando había falta de agua le pedían a este ídolo. A estos niños inocentes no les sacaban el corazón, sino los degollaban y envueltos en mantas los ponían en una caja de piedra como lucillo antiguo, y los dejaban así por la honra de aquel ídolo, a quien ellos tenían por muy principal dios. En México este mismo día salían y llevaban en una barca muy pequeña un niño y una niña, y en medio del agua de la gran laguna los ofrecían al demonio, y allí los sumergían con la acalli o barca, y los que los llevaban se volvían en otras barcas mayores. Cuando el maíz estaba a la rodilla (mes tozoztli), compraban cuatro niños esclavos de edad de cinco o seis años y los sacrificaban a Tláloc, dios del agua, poniéndolos en una cueva, y la cerraban hasta otro año que hacían lo mismo. Este cruel sacrificio tuvo principio de un tiempo que estuvo 4 años que no llovió y apenas quedó cosa verde en el campo, y para aplacar el demonio del agua, su dios Tláloc, y porque lloviese, le ofrecían aquellos cuatro niños.

Durán (1967: I 81- 84) menciona que Tláloc, al cual en toda la tierra tenían gran veneración y temor y a cuya veneración se ocupaba toda la tierra generalment. Caía este ídolo en una de las fiestas señaladas de su calendario, a la cual llamaban huey tozoztli. Enderezábase esta fiesta para pedir buen año, a causa de que ya el maíz que habían sembrado estaba todo nacido. Tomaban un niño de seis o siete años lo metían en una litera, por todas partes cubierto, que nadie no le viese, lo ponían en los hombros de los principales y, puestos todos en ordenanza, iban como en procesión hasta el lugar del patio (que se encontraba en la cumbre del cerro), al cual lugar llamaban tetzacualco. Y llegados allí, delante la imagen del ídolo Tláloc mataban aquel niño, dentro en la litera, que nadie no le veía, al son de muchas bocinas y caracoles y flautillas. Mataban este niño los mismos sacerdotes de este

*ídolo. Acabado de poner la comida venían los sacerdotes que habían degollado aquel niño, con la sangre en un lebrillejo y el principal de ellos, con un hisopo en la mano, el cual lo remojaba en aquella sangre inocente y rociaba al ídolo y a toda la ofrenda y toda la comida, y si alguna sangre sobraba, ibase al ídolo Tláloc y le lavaban la cara con ella y el cuerpo y todo aquellos idolillos sus compañeros y el suelo. Acabada la ofrenda del monte y todo lo que dicho es, se apresuraban los señores a descender a la celebración y santificación de las aguas que aquel mismo día se hacían en la laguna y en todas las fuentes y manantiales y en todas las sementeras, haciendo sus sacrificios y ofrendas. Los grandes sacerdotes y dignidades, muy vestidos de pontifical, como dicen, sacaban una niña de siete o de ocho años, metida en un pabellón, que no le veía nadie, tapada de todas partes, a la manera que los señores habían llevado el niño al monte; a la misma manera estos sacerdotes sacaban esta niña en hombros, metida en aquel pabellón, toda vestida de azul, que representaba la laguna grande y todas las demás fuentes y arroyos; puesta una guirnalda con la cabeza, de cuero colorado y, al remate, una lazada con una borla azul de plumas. Llegados, pues, a aquel lugar tomaban la niña, así dentro en su pabellón y, con una fisga de matar patos, la degollaban y escurrían la sangre en el agua. Acabada de escurrir, la arrojaban en el agua en derecho de aquel sumidero (laguna de Pantitlán), dicen que se la tragaba, de suerte que nunca más aparecía. Acabada de echar la niña, llegaban los reyes a ofrecer en sus canoas, unos en pos de otros, y todos los señores. Y ofrecían tantas riquezas de joyas, piedras y collares, en tanta abundancia, como en el monte habían ofrecido, echándolo todo en la laguna, en el mismo lugar que habían echado la niña, donde cada año echaban tanta cantidad de oro y piedras y joyas que era maravilla (Durán 1967: 85-88).*

Durán (1967: 159-165) menciona que también se sacrificaban niños, en la fiesta *tepeilhuitl* que quiere decir *fiesta de cerros*'. El cerro Popocatezin (el cerro humeador), a este cerro reverenciaban los indios antiguamente por el más principal cerro de todos los cerros; también sacrificaban algunos niños este día y algunos esclavos y los ofrecían en los templos y en presencia de la masa en que fingían la imagen de este cerro y de los demás, muchas mazorcas de maíz fresco y comida y copal y entraban

*a las cumbres de los cerros a encender lumbres y a incensar y quemar de aquel copal y hacer algunas ceremonias que ordinariamente hacían*

*Otro cerro reverenciado era el Iztac Cihuatl, que quiere decir "mujer blanca", era la Sierra Nevada, a la cual además de tenerla por diosa y adorarla por tal, la tenían en las ciudades sus templos y ermitas, muy adornadas y reverenciadas, donde tenían la estatua de esta diosa. Y no solamente en los templos, pero en una cueva que en la misma sierra había. Estaba muy adornada y reverenciada, con no menos reverencia que en la ciudad, donde acudían con ofrendas y sacrificios muy de ordinario, teniendo junto a sí, en aquella cueva, mucha cantidad de idolillos (Tlaloques). A la Sierra Nevada llevaban dos niños pequeños y dos niñas, metidos en unos pabellones hechos de mantas ricas, y a ellos, muy vestidos y galanos, a los cuales sacrificaban en la misma sierra. Juntamente llevaban todos los señores y principales otro presente de coronas de pluma y camisas de mujer y enaguas y joyas y piedras ricas y de mucha comida. Estaban en lo áspero de esta sierra dos días metidos haciendo las ceremonias a esta diosa con grandes plegarias y sacrificios, ayunando todos aquel día principal un ayuno muy guardados y riguroso.*

Durán afirma que también hacían la fiesta al aire, bajo de este nombre Ehécatl. A este Ehécatl le hacían grandes ofrendas y sacrificios, especialmente en un día de la semana que tenían que le llamaban Ehécatl que quiere decir viento. Temiendo el zumbido de los árboles y el ruido que en los montes hace cuando vienta, y el que hace en los resquicios, que aun entre nosotros decimos, cuando hace un aire recio, que parece que habla. Así ellos creían hablaba, luego andaban a las ofrendas y los sacrificios a Ehécatl para aplacarle, y los ayunos y las oraciones rogándole no estuviese enojado, a costa de su sangre, la cual por momentos le derramaban, unos de las orejas, otros de las lenguas, otros de los pechos, otros de las espinillas y muslos (Durán 1967: 170).

Es interesante notar que el dios del viento, Ehécatl, tenía también una multitud de pequeños servidores, los Ehecatotontin, que tenían su morada en las montañas (Soustelle, 1940, p. 48) citado por Broda 1971. Ehécatl pertenecía al grupo de los Tlaloques (Broda 1971). Ehécatl barría los caminos del cielo a los dioses de las aguas, era quien podía generar los vientos buenos o malos por los cuatro rumbos de la tierra (Guilliem 1996).

### *1.1.2. Evidencia Arqueológica*

Hasta fechas recientes, sólo se contaba con los datos de las fuentes escritas y las representaciones de los códices para el estudio de la problemática de los sacrificios de niños, sin que se hubiese tenido la oportunidad de corroborarlos arqueológicamente debido a la escasez de evidencias que había proporcionado el registro arqueológico; sin embargo gracias a los descubrimientos hechos en el marco del Proyecto Templo Mayor, actualmente se tienen elementos para indagar y dar forma a un panorama más concreto sobre el tema. El primero de estos descubrimientos ocurrió en la esquina noroeste del edificio del Templo Mayor de Tenochtitlán, lugar donde se encontró una ofrenda (ofrenda No. 48) que contenía los restos de cuarenta y dos individuos infantiles y un conjunto de materiales asociados simbólicamente con el mundo acuático de la cosmovisión mexicana: arena marina, jarras de piedra con la efigie del dios Tláloc, conchas, caracoles, pigmento azul, cuentas de piedra verde, copal y posibles recipientes de calabaza (Román 1990; Román y Torre Blanco 1998).

Algunos materiales, como el pigmento azul, la calabaza, las conchas, el caracol, son elementos que se asocian al agua y a la fertilidad de la tierra, los cuales eran representados por los Tlaloques. El hecho de que los Tlaloques tuvieran importantes funciones como ejecutores de los mandatos de Tláloc y que fueran poseedores de la lluvia, ha llevado a inferir que el hallazgo de la ofrenda No. 48 representa un sacrificio de niños en honor a estos "ministros pequeños de cuerpo". Los sacrificios de niños según las fuentes del siglo XVI se efectuaban en las cumbres de las montañas que rodean a la ciudad de México - Tenochtitlán. Por lo tanto no resulta extraño encontrar una ofrenda con esqueletos de niños en el Templo Mayor si lo relacionamos con el simbolismo del edificio. El templo era considerado simbólicamente como un cerro sagrado en el cual junto a Huitzilopochtli, moraban Tláloc y sus "ministros pequeños", los Tlaloques (Román 1990; Román y Torre Blanco 1998).

El segundo hallazgo se localizó frente a la plataforma de la fachada principal del denominado templo R, dedicado al culto del dios Ehécatl-Quetzalcoátl en el sitio arqueológico de Tlatelolco. El complejo ceremonial presentó elementos vinculados con los dioses del agua, del maíz, de la tierra, del fuego y del viento (Guilliem 1996). De la cerámica rescatada de este complejo mortuario, sobresalió del conjunto una olla pintada de azul, color típico de los dioses de la lluvia, según Broda (1971) y las cuentas localizadas en el entorno de la olla de la ofrenda 11, cuyos colores azul y blanco las asocian directamente con Tláloc. Otras piezas significativas fueron los pendientes elaborados en obsidiana que representan cabezas de pato estilizadas y su analogía más obvia es la máscara bucal de Ehécatl (Guilliem 1996).

La única escultura encontrada durante la exploración del complejo ceremonial, fue precisamente la de Ehécatl, depositada justo al centro y por debajo de la plataforma de acceso. Ésta fue tallada en basalto gris y representa al dios en posición sedente con las piernas recogidas hacia el cuerpo y con los brazos por encima de las rodillas. Su rostro esta mirando fijamente hacia el frente, porta la característica máscara bucal y además tiene un pequeño gorro cónico. También se encontraron ofrendas de animales marinos que muestran la presencia del mar como la expresión absoluta del agua y de la fertilidad en opinión de Broda (1982).

El tipo de sacrificio utilizado en estas ceremonias se detectó a partir de los restos óseos, donde la decapitación, desmembramiento y mutilación al igual que los objetos asociados, como fue el caso de las navajillas de obsidiana incrustadas en las cervicales de algunos sujetos, revelaron su presencia irrefutable. En algunos restos óseos no fue posible detectar huellas de sacrificio, pero sí la presencia de restos óseos con collares y brazaletes (Guilliem 1996).

Gracias a las evidencias presentadas, tanto de análisis arquitectónico del templo de Ehécatl en Tlatelolco y su relación contextual con las distintas etapas constructivas del templo mayor de Tenochtitlan, así como del análisis de las ofrendas y entierros excavados en ambos edificios, es posible sugerir que el complejo ceremonial fue depositado durante la gran sequía de 1454 d. C., como respuesta a un acto violento de la naturaleza que provocó una gran mortandad por hambre entre la población mexicana (Guilliem 1996).

El último hallazgo ocurrió en el subsuelo de la Catedral Metropolitana, en el centro de la ciudad de México. Corresponde a una ofrenda que contenía los restos óseos de 3

individuos infantiles y objetos que se asocian con las deidades del agua, tales como pigmento azul, cuentas de piedra verde y comales de cerámica, restos óseos de guajolote y codorniz y una placa de cerámica con una decoración que sugiere el emblema de los dioses Tlalocues. El análisis osteológico aportó una serie de datos que coinciden con los contenidos en las fuentes. Los restos óseos rescatados de estos sitios arqueológicos pertenecían a niños cuyas edades fluctuaban entre los dos y los ocho años de edad (Román y Torre Blanco 1998).

## **1. 2. La Identificación del Sexo en Infantes**

Los primeros estudios para la identificación del sexo en individuos infantiles se centraron en la forma y características de la pelvis infantil, tal es el caso de los trabajos de Reynolds (1945) y de Boucher (1957), (citados por Román 1990), quienes examinaron la pelvis de fetos, de recién nacidos y de individuos hasta de un año de edad con técnicas radiológicas. Posteriormente, sobre la radiografía efectuaron una serie de medidas y calcularon algunos índices y ángulos. Los resultados de estos análisis sugieren que efectivamente existen diferencias sexuales en los esqueletos de los individuos infantiles.

Otro estudio que intentó establecer las diferencias sexuales que pudieran existir en los esqueletos infantiles es el de Hunt y Gleiser (1955), (citado por Román 1990), sin embargo su aplicación no es posible cuando se trata de esqueletos provenientes de excavaciones arqueológicas. Esto se debe a la dificultad o, mejor dicho, a la imposibilidad de determinar la edad ósea utilizando el carpo de los esqueletos (Sundick 1977, citado por Román 1990), ya que los huesos de tamaño pequeño se destruyen con facilidad y cuando son recuperados, es difícil su identificación.

Las técnicas morfométricas utilizadas por Reynolds (1945); Hunt y Gleiser (1955); y Boucher (1957) para la identificación del sexo, presentan resultados con un bajo porcentaje de eficiencia y confiabilidad en niños vivos. Si la asignación correcta de esta variable es difícil en infantes vivos, la identificación del sexo en restos óseos infantiles mediante las características morfológicas es más problemática e incierta. Uno de los estudios más interesantes es el efectuado por Pompa (1975) citado por Román (1990), quien observó el comportamiento de tres caracteres morfológicos en huesos coxales de adultos y posteriormente efectuó una prueba del comportamiento de dos de esos caracteres en ilíacos de individuos infantiles.

Más recientemente, Weaver (1980) citado por Román (1990) intentó encontrar diferencias sexuales entre los esqueletos infantiles. Este investigador analizó 153 ilíacos de individuos de edad y sexo conocido, a cada hueso le tomó seis medidas y a partir de ellas calculó tres índices. Por otra parte realizó la observación de un carácter no métrico, la elevación de la superficie auricular. Ninguno de los índices mostró diferencias sexuales estadísticamente significativas, en contraste, el carácter no métrico llegó a tener una precisión de un 91 % en los fetos, un 73 % en los recién nacidos y un 90 % en los infantes de seis meses de edad. Sin embargo, como él mismo señala, el grado de confiabilidad de este último carácter debe ser comprobado con el estudio de una muestra más grande.

### **1. 3. La Identificación del Sexo en Restos Humanos desde la Perspectiva de la Biología Molecular**

Tradicionalmente el sexo de los restos óseos de individuos adultos rescatados en las excavaciones arqueológicas es identificado a través del análisis morfométrico y en ocasiones por los objetos que los acompañan. Desafortunadamente, la utilización de las características morfológicas para conocer el sexo de esqueletos infantiles no es confiable, debido a que los caracteres sexuales secundarios no se manifiestan claramente en los huesos sino hasta después de la pubertad (Bass 1971; y Ubelaker 1974). Además, la mayoría de las técnicas morfométricas propuestas para la identificación del sexo en restos óseos infantiles se basan en mediciones o reconstrucciones que difícilmente pueden ser realizadas en huesos secos o desarticulados provenientes de las excavaciones arqueológicas (Román 1990). Esta problemática originó que por bastante tiempo la asignación de esta variable haya sido considerada casi como imposible por los antropólogos físicos, impidiendo responder a varias interrogantes acerca de los sacrificios de niños.

Con el avance en los métodos moleculares, se dieron las primeras evidencias de que la información genética podría persistir en materiales antiguos. La primera clonación exitosa de DNA proveniente de un tejido animal, reportada por Higuchi *et al.* (1984), fue la clonación de secuencias de DNA mitocondrial de la extinta *quagga*, un miembro de la familia del caballo. Esto representa la primera recuperación de secuencias de DNA informativa filogenéticamente de un espécimen de museo y permitió darle un lugar a *quagga* dentro de la filogenia de los caballos y sus parientes los burros y las cebras.

Las técnicas de clonación pueden ser utilizadas con ciertas limitaciones, debido a que requieren grandes cantidades de DNA de buena calidad; que no puede ser extraído de todos los restos óseos recuperados de las excavaciones arqueológicas. Posteriormente con la invención y avances de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue posible superar las limitaciones de los estudios de clonación y aplicar esta nueva tecnología al análisis del DNA antiguo (Pääbo 1989).

Uno de los usos importantes de la PCR ha sido la introducción de esta metodología a la identificación del sexo de restos humanos, amplificando regiones específicas de los alelos divergentes del cromosoma X y Y del gen de la amelogenina (Figura 1<sup>a</sup>). Actualmente las metodologías para la identificación del sexo de muestras antiguas utilizan huesos y dientes para la extracción del DNA (Hummel y Herrmann 1991; Faerman *et al.* 1995; Stone *et al.* 1996; y Faerman *et al.* 1997). Uno de los métodos utilizados con éxito para la identificación del sexo en restos antiguos ha sido el diseñado por Faerman *et al.* 1995, y se basa en la amplificación de un fragmento del intrón I del gen de la amelogenina, proteína de la matriz extracelular de los dientes, es considerada esencial en la formación del esmalte dental (Salido *et al.* 1992; Li W *et al.* 1998; y Hart *et al.* 2002). Sabiendo que el alelo Y de este gen posee varias diferencias de secuencia en el primer intrón, incluyendo una delección de 189 nucleótidos (Nakahori *et al.* 1991<sup>a</sup>; Nakahori *et al.* 1991b; y Akane *et al.* 1991), estos investigadores diseñaron tres iniciadores: uno común para el cromosoma X y para el cromosoma Y, los otros dos son específicos para cada alelo. Con estos iniciadores se obtuvieron productos de amplificación diferentes a partir de cada alelo. El tamaño del producto de amplificación de la PCR para el cromosoma X fue de 330 bp (pares de bases) y para el cromosoma Y fue de 218 bp (Figura 1b). Otro estudio con DNA extraído de huesos provenientes de excavaciones arqueológicas, usado para la identificación del sexo es el realizado por Stone *et al.* (1996), este método se basa en las diferencias entre las copias X y Y de un fragmento del exón 6 del gen de la amelogenina. Se diseñaron iniciadores para amplificar este segmento, obteniendo productos amplificados del cromosoma X y Y, del mismo tamaño (112 bp). El análisis de los productos obtenidos con la PCR se hizo por hibridación con sondas específicas para el cromosoma X y Y utilizando un dot blot.

Los cromosomas X y Y se han utilizado en otro tipo de estudios, por ejemplo: el análisis del gen de la amelogenina del cromosoma X, permitió detectar la presencia de

mutaciones en su secuencia que provocan una enfermedad conocida como Amelogenesis Imperfecta (AI), la cual se caracteriza por afectar el desarrollo normal del esmalte dental (Salido *et al.* 1992; Maria Lagerström-fermér *et al.* 1993; Li W. *et al.* 1998; y Hart *et al.* 2002). Los microsatelites (pequeños segmentos repetidos en tandem, STRs) en el cromosoma Y, han sido utilizados para analizar la herencia de origen paterno, lo cual permitió estudiar la migración de individuos del sexo masculino. (Jeffrey *et al.* 1997; y Nebel *et al.* 2000).

#### **1. 4. Relación entre Sexo y Sacrificios Humanos**

La identificación del sexo de una manera confiable permitirá responder a varias interrogantes acerca del sacrificio de niños. Entre las más importantes destacan: ¿a qué dioses se ofrendaban niñas y niños?, ¿se sacrificaban preferentemente niños de sexo masculino?, ¿en qué fiestas se incluían niñas?. Obtener las respuestas a estas interrogantes ayudará, por un lado, a tener un conocimiento más amplio acerca del contexto ceremonial y ritual del sacrificio de niños que se realizaban dentro de la sociedad mexicana. Por otro lado, la investigación realizada en estos individuos por los antropólogos físicos señala que la mayoría de ellos eran aquejados por diversos padecimientos (Román 1990) ¿de qué se enfermaban unos y otros? es decir, el establecer una diferenciación sexual de manera segura ayudaría a conformar un cuadro paleoepidemiológico diferencial sobre los problemas de salud y enfermedad que padecían los niños y las niñas, en razón de sus actividades distintivas, como es el caso de ayunos, autosacrificios y penitencias.

## II. OBJETIVO GENERAL

Identificar el sexo de restos óseos prehispánicos de la zona arqueológica de Tlatelolco, pertenecientes a individuos infantiles que fueron sacrificados a los dioses de la lluvia del panteón mexica.

Para cumplir esto se propusieron los siguientes objetivos particulares.

- 1.- Obtener DNA de los restos óseos analizados en este estudio.
- 2.- Purificar el DNA previamente extraído para eliminar contaminantes que interfieran con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 3.- Amplificar el DNA por la técnica de PCR utilizando iniciadores para un fragmento del intrón I del gen de la amelogenina.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestra de Estudio

Los restos óseos que se utilizaron en este estudio fueron excavados entre 1987 y 1989 en el sitio arqueológico de Tlatelolco (Figura 2<sup>a</sup>), como parte del proyecto Templo Mayor (Guilliem 1996). Este depósito mortuario se localizó bajo la plataforma frontal del templo R, que está situado en la esquina suroeste de la actual zona arqueológica de Tlatelolco. Fue edificado paralelamente a la cuarta etapa constructiva del Templo Mayor de Tlatelolco (1428-1467 d. C) y dedicado al dios del viento Ehécatl-Quetzalcoátl, dios tutelar del templo R. De este complejo mortuario se recuperaron 41 esqueletos, de los cuales 35 correspondieron a individuos subadultos y 6 a adultos (Figura 2b). La edad aproximada de estos individuos fue estimada por los arqueólogos que excavaron los restos, basándose en su tamaño aparente (Guilliem 1996). Posteriormente se realizó un estudio morfométrico de los restos de los individuos subadultos basándose fundamentalmente en la morfología dental (J. A. Román, comunicación personal). De los 41 individuos recuperados en esta zona arqueológica se analizaron 30 individuos infantiles, 3 adolescentes y 1 adulto. Algunas características de los individuos analizados en este estudio se muestran en las tablas 1 y 2.

**TABLA 1. Muestra de los restos óseos trabajados en el laboratorio, proporcionados por el museo del Templo Mayor para estandarizar el método de identificación del sexo**

Sitio arqueológico	Entierro	Edad aproximada	Estado del Esqueleto	Hueso utilizado
Palacio Nacional	1 cala 21	Adulto (R)	Completo	Costilla
Donceles 99	1	Adulto (R)	Completo	Vértebra lumbar
Pozohuacan	Individuo 2	Adulto (R)	Completo	Vértebra
Tlatelolco	7	15 años ± 36 meses. (R)	Incompleto	Vértebra
Tlatelolco	20	15 años ± 36 meses. (R)	Incompleto	Vértebra
Tlatelolco	31	23 años. (R)	Completo	Vértebra

**Nota:** La letra en negrita dentro del paréntesis significa quien determinó la edad del individuo.

**(R)** = Antropólogo Físico Juan Alberto Román

**(G)** = Arqueólogo Salvador Guilliem Arroyo

**TABLA 2. Restos óseos infantiles utilizados en el presente trabajo datos tomados de: (Guilliem 1996)**

Ofrenda y Entierro	Depósito del entierro	Edad aproximada	Estado del Esqueleto	Huesos utilizados
Of. 1ª ent. 17	Olla	Neonato ± 2 meses <b>(R)</b>	Incompleto	2 costillas izquierdas y 2 derechas
Of. 2 ent. 16	Suelo	6 años ± 24 meses <b>(R)</b>	Completo	Vértebra dorsal y costilla
Of. 2 ent. 23	Olla	1 año <b>(G)</b>	Completo	3 costillas izquierdas
Of. 2 ent. 24	Olla	6 meses ± 3 meses <b>(R)</b>	Completo	2 costillas izquierdas y 2 derechas
Of. 2 ent. 25	Olla	3 años ± 3 meses <b>(R)</b>	Completo	2 vértebras dorsales y 2 cuerpos de vértebras dorsales
Of. 3 ent. 10	Olla	Neonato <b>(G)</b>	Incompleto	2 costillas izquierdas y 2 derechas
Of. 3 ent. 15	Suelo	4 años <b>(G)</b>	Completo	Vértebra lumbar y costilla
Of. 3 ent. 21	Olla	1 año <b>(G)</b>	Incompleto	2 costillas derechas y 1 izquierda
Of. 4 ent. 1	En una estructura de madera.	2 años ± 8 meses <b>(R)</b>	Completo	Costilla derecha y vértebra dorsal
Of. 5 ent. 11	Olla	9 meses ± 3 <b>(R)</b>	Completo	3 costillas derechas
Of. 5 ent. 12	Olla	2 años <b>(G)</b>	Completo	Vértebra y costilla
Of. 5 ent. 22	Olla	2 años ± 8 meses <b>(R)</b>	Completo	2 vértebras lumbares
Of. 7 ent. 2	Olla	1.5 años ± 6 meses <b>(R)</b>	Completo	Vértebra y costilla

Of. 8 ent. 3	Olla	8 años $\pm$ 30 meses (R)	Completo	Vértebra lumbar y costilla
Of. 8 ent. 28	Olla	6 años (G)	Completo	2 vértebras dorsales
Of. 9 ent. 4	Olla	11 años $\pm$ 30 meses (R)	Completo	Vértebra dorsal
Of. 10 ent. 26	Olla	2 años (R)	Completo	Costilla izquierda y 2 vértebras dorsales
Of. 11 ent. 35	Olla	1 año $\pm$ 4 meses (R)	Completo	3 costillas izquierdas
Of. 14 ent. 27	Suelo	1 año $\pm$ 4 meses (R)	Completo	Vértebra y Costilla
Of. 14 ent. 40	Olla	6 meses $\pm$ 3 meses (R)	Completo	Costilla
Of. 19 ent. 19	Suelo	4 años $\pm$ 12 meses (R)	Completo	Vértebra y 2 costillas izquierdas
Of. 19 ent. 38	Olla	6 meses $\pm$ 3 meses (R)	Completo	3 costillas izquierdas
Of. 20 ent. 32	Suelo	2 años $\pm$ 8 meses	Completo	3 costillas derechas
Of. 20 ent. 33	Suelo	1 año (G)	Completo	3 costillas derechas
Of. 20 ent. 39	Olla	Neonato $\pm$ 2 meses (R)	Incompleto	2 costillas izquierdas y 2 derechas
Of. 22 ent. 34	Suelo	2 años (R)	Completo	3 costillas izquierdas
Of. 23 ent. 36	Olla	1,5 años $\pm$ 6 meses (R)	Completo	Costilla
Ent. 8	Suelo	2 años $\pm$ 8 meses (R)	Incompleto	Vértebra y costilla
Ent. 9-1	Suelo	$\pm$ 3 años (R)	Incompleto	Costilla
Ent. 29	Suelo	1 año $\pm$ 4 meses (R)	Completo	2 costillas derechas
Ent. 30	Suelo	4 años $\pm$ 12 meses (R)	Completo	Costilla

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **3.2. Limpieza de las Muestras**

Uno de los problemas más frecuentemente enfrentados en estudios como el presente es la contaminación con DNA actual de quienes han excavado, manejado y estudiado los huesos. Para evitar los problemas de contaminación las muestras fueron limpiadas con un cepillo dental previamente lavado con una solución de HCl 0.1N e irradiado con luz ultravioleta, se utilizó un cepillo dental para cada muestra. Posteriormente se eliminó la capa de la superficie externa raspándola con una navaja nueva y estéril, utilizando una navaja para cada uno de los huesos limpiados. Las navajas después de ser utilizadas son desechadas. Posteriormente las muestras son sometidas a irradiación con luz ultravioleta durante un minuto para destruir el DNA adherido a su superficie. Los huesos ya limpios se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino, todos estos procedimientos se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar horizontal equipada con filtro HEPA 3µm.

En todos los experimentos se utilizó material desechable nuevo y estéril. Durante todo el proceso de limpieza y el molido del hueso se usó bata limpia, guantes nuevos, cofia y cubrebocas estéril para evitar la contaminación con DNA actual.

### **3.3. Estandarización de la Metodología**

La primera etapa de este trabajo consistió en llevar a cabo una estandarización del método de identificación del sexo utilizando DNA humano. Para ello fue necesario extraer el DNA de muestras de sangre de individuos vivos (Miguel Angel, dilución de DNA 1:1000). Para determinar las condiciones óptimas de la PCR se probaron diferentes concentraciones de reactivos tales como el magnesio, los iniciadores, los dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosforilados) y la enzima, también se probaron distintas temperaturas de alineación.

En la segunda etapa, se aplicó el método estandarizado con DNA moderno a la identificación del sexo de restos óseos, previamente sexados mediante un análisis métrico y morfológico. Para esta parte del estudio se utilizaron restos óseos prehispanicos de 4 individuos adultos y 2 adolescentes provenientes de las excavaciones de Palacio Nacional, Donceles 99, Pozohuacan y Tlatelolco (Tabla 1).

### 3.4. Técnicas de Extracción y Purificación de DNA

Los métodos para extraer DNA a partir de tejidos están bien establecidos (Sambrook *et al.* 1989; Höss y Pääbo 1993; y Ausbel 1994) y se han utilizado con pequeñas variaciones en un sinnúmero de casos. Sin embargo el DNA de restos óseos provenientes de excavaciones arqueológicas presenta problemas peculiares, diferentes de los tejidos de organismos vivos. En nuestro caso se introdujeron variantes en algunos factores críticos que afectan la extracción del DNA, de modo que nos permitió definir las condiciones óptimas para las muestras de este estudio en particular.

#### Método Muñoz *et al.* en preparación

El método de extracción más frecuentemente usado fue proporcionado por Lourdes Muñoz (lab. Genética, CINVESTAV, IPN). Se basa en la propiedad del fenol para desnaturalizar las proteínas que se encuentran unidas al DNA, y la posterior precipitación de DNA con etanol absoluto (Sambrook *et al.* 1989) En una segunda etapa se purificó el DNA por medio de electroforesis en geles de agarosa utilizando la técnica comercial de Gene-Clean. A continuación se describe la técnica con detalle.

Se pesó en un matraz Erlenmeyer 1 g de polvo de hueso y se le adicionaron 8 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 M, SDS 0.5 %), se colocó en un baño de agitación a 37°C durante 1 hora y después 2 horas a una temperatura de 50°C. Posteriormente se agregaron 8 mL de fenol pH 8.0 y se agitó durante 10 minutos, se centrifugó a 14200 x g, a 4°C, en una centrifuga Beckman J2-MC (rotor JS-13.1) durante 10 minutos. Se recuperó la fase superior y se adicionaron 5 mL de la mezcla fenol pH 8.0 + cloroformo + acetato de sodio 3 M pH 5.2 (10:9:1, v/v/v), se centrifugó a 14200 xg, se recuperó la fase superior y se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto más 1 mL de acetato de sodio 3 M pH 5.2. Se agitó por inversión suavemente y se guardó a -20 °C durante toda la noche, al otro día se centrifugó a 14200 xg, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 14200 xg, se secó al vacío 15 minutos, se recuperó con 50 µL de agua ultrapura (18.2 MΩ megaohms) y se guardó la solución a -20 °C.

Uno de los problemas metodológicos más frecuentemente encontrados en los estudios con DNA antiguo es la presencia de sustancias contaminantes que inhiben la amplificación del DNA mediante la PCR y deben ser previamente eliminadas de los extractos de DNA. El DNA extraído por la técnica de Muñoz generalmente presenta un color amarillento debido a la presencia de contaminantes (Figura 3), por lo que el DNA debe ser purificado antes de utilizarlo como molde en la reacción de amplificación.

### **Técnica de purificación utilizando el kit Gene-Clean (Bio101)**

Método de purificación que se basa en la afinidad del DNA por la sílica en presencia de agentes caotrópicos tal como el ioduro de sodio (NaI) (Vogelstein y Gillespie 1979; y Sambrook *et al.* 1989), a continuación se describe la técnica.

Se realizó una electroforesis en una cámara (Horizon 58, Gibco BRL), al DNA extraído en un gel de agarosa al 1%, se adicionaron 50  $\mu$ L de DNA, y 25  $\mu$ l de colorante (azul de bromofenol al 1 % + glicerol) se corrió el gel a 116 volts con buffer TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M- EDTA 0.001 M, pH 8.0). Terminada la corrida se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/mL), se cortaron las bandas vistas bajo luz ultravioleta.

Se adicionaron tres volúmenes de NaI 6 M, se calentó en baño maría a 55°C hasta que se disolvió la agarosa, se agregaron 5  $\mu$ L de sílica (glassmilk). Se incubó a temperatura ambiente 5 minutos con agitación cada 1 o 2 minutos. Se centrifugó a 12000 xg en una microcentrífuga durante 5 segundos, se lavó con 300  $\mu$ L de la solución de lavado (new-wash, etanol 95% + agua), se centrifugó a 12000 xg. Se repitió el lavado dos veces, se centrifugó y se desechó toda la solución de lavado, se resuspendió en 10  $\mu$ L de agua ultrapura, se centrifugó a 12000 xg durante 30 segundos y se recuperó el sobrenadante. Se guardó el DNA extraído a -20 °C.

### **Método de Krings *et al.* (1997)**

Método de extracción y purificación de DNA que se basa en la precipitación de proteínas que se encuentran unidas al DNA, y en la afinidad del DNA por la sílica en presencia de agentes caotrópicos como el isotiocianato de guanidina (Vogelstein y Gillespie 1979; Höss y Pääbo 1993). El procedimiento empleado en esta técnica es el siguiente, se pesaron 400 mg de polvo de hueso en un microtubo, se agregó 1 mL de

buffer de extracción (n-lauril sarcosina al 5%, EDTA 0.5 M pH 8.0) se agitó a temperatura ambiente por 24 horas. Se agregaron 10  $\mu$ l de proteinasa k (10 mg/mL) y la incubación continuó por otras 48 horas a 37°C. Se centrifugó a 12000 xg en una microcentrífuga durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se agregaron 500  $\mu$ L de fenol pH 8.0, se centrifugó a 12000 xg y se recuperó la fase superior. Se adicionaron 500  $\mu$ L de una solución de fenol pH 8.0 + cloroformo + alcohol isoamílico (10/9/1, v/v/v) y se centrifugó a 12000 xg. Se recuperó la fase superior y se colocó en un microconcentrador Centricon-30 (amicon), se centrifugó a 12000 xg durante 12 minutos. Se volteó el microconcentrador que contenía la membrana, se centrifugó a 12000 xg durante 4 minutos y se recuperó en el tubo concentrador, se agregaron 40  $\mu$ L de sílica más 1 mL de isotiocianato de guanidina 5 M, Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, se agitó por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 xg durante 2 minutos. Se lavó el sedimento dos veces con 1 mL de etanol al 70 %. Se lavó con 1 mL de acetona, se secó al vacío durante 5 minutos. Se disolvió el DNA en 50  $\mu$ L de agua ultrapura calentando a 56°C por 10 minutos. Se centrifugó a 12000 xg durante 3 minutos, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

#### **Técnica de extracción usando la resina Chelex-100 (Bio-Rad).**

El Chelex es una resina quelante con una alta afinidad por los metales polivalentes. Singer-Sam *et al.* (1989) postulan que en presencia de la resina (Chelex) se impide la degradación de DNA, porque atrapa los iones metálicos que pudieran actuar como catalizadores de la ruptura del DNA a elevadas temperaturas en soluciones de baja fuerza iónica (Walsh 1991; y Woodward *et al.* 1994). La técnica consiste de los siguientes pasos. En un tubo para microcentrífuga (1.5 mL) estéril se pesaron 5 mg de polvo de hueso, se añadieron 500  $\mu$ L de Chelex al 5 %, se agitó 1 minuto. Se incubó a 56°C durante 15 minutos, se agitó en un vortex 1 minuto, se incubó a 95°C durante 10 minutos. Se centrifugó a 12000 xg en una microcentrífuga durante 3 minutos, se recuperó el sobrenadante y se guardó la solución a -20°C.

En cada una de las técnicas de extracción utilizadas en cada muestra, simultáneamente se procesaba un fantasma de extracción (contiene todos los reactivos utilizados para la extracción, excepto polvo de hueso). En todos los experimentos se utilizaron micropipetas y puntas exclusivas para la extracción del DNA antiguo.

### 3.5. Amplificación de Secuencias Específicas por PCR

Inicialmente se utilizaron los iniciadores diseñados por Faerman *et al.* 1995 para obtener productos de 330 bp para el cromosoma X, y 218 bp para el cromosoma Y.

Debido a dificultades para la amplificación del producto del cromosoma X, se procedió a diseñar iniciadores para la misma región del gen de la amelogenina, que permitieran obtener productos de amplificación de menor tamaño: 192 pb para el cromosoma X, y 158 pb para el cromosoma Y (Tabla 3)

**TABLA 3. Secuencia de los iniciadores utilizados**

Iniciadores	Secuencia	Tamaño del producto
M4 iniciador común	5'-CAGCTTCCCAGTTTAAGCTCT 3' (495-515) Faerman <i>et al.</i> 1995	
M5 cromosoma X	5'-TCTCCTATACCACTTAGTCACT 3' (369-696) Faerman <i>et al.</i> 1995	X : 330 bp
M6 cromosoma Y	5'-GCCCAAAGTTAGTAATTTTACCT 3' (390-609) Faerman <i>et al.</i> 1995	Y : 218 bp
COM iniciador común	5'-GCTCATATTATACTTGACAAAGCA 3' (721-744) Modificado de Faerman <i>et al.</i> 1995	
XSP cromosoma X	5'-GACGTCGGGTTTGAGGTTCTC 3' (731- 922) Modificado de Faerman <i>et al.</i> 1995	X : 192 bp
YSP cromosoma Y	5'-AGGTAAAATTACTAACTTTGGGCA3' (587- 744) Modificado de Faerman <i>et al.</i> 1995	Y : 158 bp

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador programable Perkin Elmer 480, la mezcla de reacción contenía los reactivos mostrados en la tabla 4. Las condiciones de la PCR son las siguientes: desnaturalización inicial de 94°C (5 min), 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C (30 s.), alineación a 55°C (30 s.), extensión a 72°C (1 min.). Y extensión final a 72°C (7 min.), bajar a una temperatura de 4°C.

**TABLA 4. Reactivos utilizados en la PCR, iniciadores M4, M5 y M6 diseñados por Faerman et al. 1995**

Reactivos Concentración inicial	Volumen adicionado para 25 $\mu$ L	Concentración final En 25 $\mu$ L
Buffer 10x	2.5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 Mm	2.5 $\mu$ L	2.5 mM
DNTPs 1.25 mM	2.0 $\mu$ L	0.1 mM
BSA 2.5 $\mu$ g/ $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	1.25 $\mu$ g/ $\mu$ L
Iniciadores M4 2.5 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Iniciadores M5 2.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M
Iniciadores M6 2.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M
Taq. DNA polimerasa fragmento Stoffel 1.5 U/ $\mu$ L	0.15 $\mu$ L	1.5 U/ $\mu$ L

Los parámetros para la PCR (Pelkin Elmer 480) utilizando los iniciadores COM, XSP y YSP (tabla 5) fueron los siguientes: un volumen de 25  $\mu$ l, con una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, 40 ciclos con una desnaturalización 94 °C (30 s.) alineación a 57 °C (30 s.) y extensión a 72 °C (1 min.). Una extensión final a 72°C (7 min.), temperatura final a 4 °C.

**TABLA 5. Mezcla de reacción para los iniciadores COM, XSP y YSP diseñados en el laboratorio de Bioquímica tomando como base a Faerman et al. 1995**

Reactivos Concentración inicial	Volumen adicionado para 25 $\mu\text{L}$	Concentración final en 25 $\mu\text{L}$
Buffer 10X	2.5 $\mu\text{L}$	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 $\mu\text{L}$	2.5 mM
dNTPs 1.25 mM	2.0 $\mu\text{L}$	0.1 mM
BSA 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Iniciadores COM 5 $\mu\text{M}$	1.0 $\mu\text{L}$	0.2 $\mu\text{M}$
Iniciadores XSP 5 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{M}$
Iniciadores YSP 5 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{L}$	0.1 $\mu\text{M}$
Expand 3.5 U/ $\mu\text{L}$	0.3 $\mu\text{L}$	1 U/ $\mu\text{L}$

Para disminuir los riesgos de contaminación todos los reactivos de PCR fueron separados en alícuotas y manejados por una sola persona, se utilizaron micropipetas exclusivas para la PCR y puntas nuevas con filtro.

En cada experimento de PCR se incluyeron siempre un control negativo de extracción, purificación y un control negativo de PCR (contiene todos los reactivos para el PCR excepto DNA) para verificar la pureza de los reactivos utilizados. El experimento fue rechazado si cualquiera de los controles negativos daba una señal positiva.

### 3.6. Análisis de los Productos Obtenidos de la PCR

Para medir el tamaño del fragmento obtenido de la PCR se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 14 %, se cargaron 20  $\mu\text{L}$  del producto de la reacción y 3  $\mu\text{L}$  de un patrón de referencia de fragmentos de DNA de tamaño conocido (DNA de  $\phi\text{X174}$  cortado con Hae III). El gel se corrió a 116 volts, utilizando como buffer de corrida TBE 1X (Tris-borato 89 mM- EDTA 2 mM pH 8.0). Terminada la corrida el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se fotografio (Hoefers Photo man) en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño aproximado de los productos de amplificación se obtuvo por comparación con el estándar.

## IV. RESULTADOS

Los primeros resultados se obtuvieron con restos óseos prehispánicos de individuos adolescentes y adultos utilizados para estandarizar la metodología (Tabla 6). Los huesos utilizados para la extracción de DNA fueron manejados con una clave, sin conocer el sexo previamente asignado a cada individuo. De los seis individuos analizados, solamente en cuatro de ellos fue posible obtener DNA amplificable para llevar a cabo la identificación del sexo. En los cuatro casos los individuos analizados fueron identificados como pertenecientes al sexo masculino por la presencia del producto de amplificación del cromosoma Y (Figura 4), el sexo asignado previamente en el estudio antropológico coincidió con el sexo identificado a partir del DNA obtenido de los restos óseos. En tres casos se obtuvo DNA amplificable en dos extractos distintos. El porcentaje de éxito obtenido en la asignación del sexo a estos individuos fue de 66.6 %.

**TABLA 6. Resultados de la identificación del sexo de los individuos utilizados para estandarizar las técnicas moleculares**

Sítio Arqueológico	Entierro	Chelex 5 %	Krings <i>et al.</i> 1997.	Muñoz <i>et al.</i> en preparación	Producto de PCR	Sexo
Donceles 99	1	+	-	+	Y: 218 bp	Masculino
P. Nacional	1 cala 21	-	-	-		No identificado
Pozohuacan	Ind. 2	-	-	+	Y: 218 bp	Masculino
Tlatelolco	7	+	+	-	Y: 218 bp Y: 158 bp	Masculino
Tlatelolco	20	-	-	-		No identificado
Tlatelolco	31	+	+	-	Y: 218 bp Y: 158 bp	Masculino

Los resultados obtenidos de la muestra de individuos infantiles de la zona arqueológica se muestran en la Tabla 7. De los 31 individuos analizados, 27 individuos fueron identificados como masculino, por la presencia del producto de amplificación del cromosoma X y del cromosoma Y. En la figura 5 se muestra un ejemplo de los productos de amplificación de cromosoma X y Y de un individuo analizado en este estudio. A los 4 individuos restantes no se les pudo asignar ningún sexo, debido a que no se obtuvo DNA amplificable. El porcentaje de éxito obtenido en la identificación del sexo a estos individuos fue del 87.2 %. En algunos casos se realizaron 2 extracciones de un mismo individuo utilizando la misma o diferentes técnicas obteniéndose el mismo resultado.

**TABLA 7. Resultados de la asignación del sexo a los individuos de la muestra en estudio mediante el análisis del DNA antiguo**

Ofrenda Entierro	Chelex 5 %	Krings <i>et al.</i> 1997.	Muñoz <i>et al.</i> en preparación	Producto de PCR.	Sexo
Of. 1ª ent. 17		–	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 2 ent. 16	+	+,+	–	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 2 ent. 23		–	+	Y: 218 bp	Masculino
Of. 2 ent. 24	–	–	+	Y: 218 bp	Masculino
Of. 2 ent. 25		–	+	Y: 218 bp	Masculino
Of. 3 ent. 10	–	+, –		Y: 218 bp	Masculino
Of. 3 ent. 15	–	+, +		Y: 158 bp	Masculino
Of. 3 ent. 21	–	+, +		Y: 158bp	Masculino
Of. 4 ent. 1		–	+	Y: 218 bp	Masculino
Of. 5 ent. 11	–	+	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 5 ent. 12	–	+	+	Y: 158 bp	Masculino
Of. 5 ent. 22	–	+	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 7 ent. 2	–	+, +	–	Y: 158 bp	Masculino
Of. 8 ent. 3	–	+, +	–	Y: 158 bp	Masculino

Of. 8 ent. 28		-	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 9 ent. 4	-	-	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 10 ent. 26		-	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 11 ent. 35	+	+		Y: 158 bp	Masculino
Of. 14 ent. 27	-	+, +	-	Y: 158 bp	Masculino
Of. 14 ent. 40	-	+	-	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 19 ent. 19	-	+	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 19 ent. 38	-	+	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 20 ent. 32	-	+	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 20 ent. 33	-	+	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 20 ent. 39		-	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 22 ent. 34	-	+	+	X: 192 bp Y: 158 bp	Masculino
Of. 23 ent. 36	-	+, +	-	Y: 158 bp	Masculino
Ent. 8	-	-	-		No identificado
Ent. 9-1	-	-	-		No identificado
Ent. 29	-	-	-		No identificado
Ent. 30	-	-	-		No identificado
<b>Total: 31</b>	<b>2</b>	<b>18</b>	<b>17</b>		<b>27 masculinos 4 No identificados</b>

+; se realizó la técnica de extracción correspondiente y el resultado de la PCR fue positivo.

-; se realizó la técnica de extracción y el resultado de la reacción en cadena de la polimerasa fue negativo.

El cuadro vacío significa que no se realizó la técnica de extracción.

Inicialmente se utilizó Chelex-100 para la extracción del DNA antiguo, pero el porcentaje de éxito obtenido fue muy bajo. Utilizando la técnica diseñada por Muñoz y colaboradores (artículo en preparación) de los 31 individuos analizados se logro extraer y purificar el DNA antiguo de 17 individuos. El porcentaje de éxito en la extracción del DNA antiguo amplificable fue de 54.8 %. Con el método de Krings *et al.* (1997) se extrajo DNA amplificable de 18 muestras, el porcentaje de éxito obtenido fue de 58 % (Tabla 7).

En la tabla 8 se muestra la distribución de los individuos analizados por grupo de edad de acuerdo a la clasificación de Hooton (1947). La mayoría de los individuos infantiles pertenecían a la primera infancia, es decir que al momento de ser sacrificados tenían una edad aproximada entre los 0 y 3 años.

**TABLA 8. Tabla de edades utilizando la clasificación de Hooton 1947**

Años	No. de individuos	Masculino	Femenino	No identificado
0-3 años 1ª infancia	24	21	—	3
4-6 años 2ª infancia	5	4	—	1
7-9 años 3ª infancia	1	1	—	—
Adolescentes	3	2	—	1
Adultos	1	1	—	—

Se compararon dos técnicas utilizadas para la identificación del sexo (tabla 9). Los resultados obtenidos muestran grandes diferencias, debido a que con la técnica de Pompa (1975), utilizada por el Antropólogo Físico Juan Alberto Román (comunicación personal), la mayoría de los individuos identificados pertenecían al sexo femenino y solamente a 7 no se les pudo asignar esta variable biológica, mientras que mediante el análisis del DNA todos los individuos que fueron identificados pertenecen al sexo masculino y solamente 4 no pudieron ser sexados.

En la tabla 9 también se incluyeron los resultados del Arqueólogo Salvador Guilliem Arroyo, quien solo se basó en la observación de los objetos asociados a los entierros, solamente a 12 individuos se les pudo asignar el sexo: 8 masculinos y 4 femeninos. En comparación con las otras dos técnicas, el análisis de los objetos asociados a los entierros, realizado por el arqueólogo para asignar el sexo, presentó el número más alto de individuos no identificados.

**TABLA 9. Tabla comparativa de los resultados obtenidos de la identificación del sexo, basada en la evidencia arqueológica (Guilliem 96), características morfológicas (Pompa 75) y el análisis molecular del DNA antiguo.**

Técnica	Masculino	Femenino	No identificado
Guilliem 96	8	4	19
Pompa 75	6	18	7
Este trabajo	27	0	4

## V. DISCUSIÓN

En este estudio utilizando los esqueletos infantiles provenientes de la zona arqueológica de Tlatelolco, se identificó el sexo de todos los restos óseos examinados que pudieron ser sexados como masculino. Sin embargo algunos individuos examinados en este estudio no se les pudo identificar el sexo debido a la ausencia de los productos de amplificación del cromosoma X y Y. Ya que las técnicas empleadas no permiten obtener un resultado positivo con todas las muestras analizadas, frecuentemente hay que recurrir a varias técnicas para obtener DNA amplificable. En este estudio se utilizaron tres técnicas de extracción distintas (Walsh *et al.* 1991; Krings *et al.* 1997 y Muñoz *et al.* en preparación) y una de purificación (Gene-Clean) que habían sido previamente estandarizadas en el laboratorio de Bioquímica (Dra. Angélica González Oliver).

La mayoría de los investigadores que han realizado estudios con DNA antiguo han encontrado que muchos de los extractos contienen un poderoso inhibidor de la PCR (Pääbo *et al.* 1989; Höss y Pääbo 1993; Hagelber 1994; Turossi 1994 y Faerman *et al.* 1995). En este trabajo se probaron diferentes cantidades de polvo de hueso (1 g, 0.5g, 0.1 y 0.01g ver metodología) con el objetivo de disminuir los inhibidores que copurifican con el DNA extraído, ya que se considera que hay una relación directa entre la cantidad de muestra y los inhibidores (Faerman *et al.* 1995). Otra medida utilizada para disminuir las sustancias inhibidoras en la PCR fue utilizar diferentes volúmenes de extractos de DNA (1 $\mu$ L, 3 $\mu$ L, 9 $\mu$ L) para cada una de las muestras estudiadas. Faerman *et al.* 1995 sugieren que el volumen de extracto de DNA en la PCR debe proporcionar un balance óptimo entre las concentraciones de DNA y de inhibidores. En cada experimento se incluyó un control de contaminantes (DNA control + extracto de hueso) para verificar el grado de inhibición, y si era necesario, diluir el extracto de DNA; esta medida resuelve el problema para algunas muestras, sin embargo al diluir los extractos también se disminuye la concentración del DNA. En varios casos el efecto inhibitorio puede ser suprimido o disminuido añadiendo albúmina sérica de bovino (BSA) en el coctel de amplificación al unirse a las impurezas que inhiben a la polimerasa (Pääbo *et al.* 1993 y Hagelber 1994). Sin embargo ninguna de las medidas utilizadas logró suprimir el efecto inhibidor cuando existía una alta concentración de los inhibidores en los extractos de DNA antiguo.

La edad aproximada de los individuos utilizados en este estudio se analizó a través

del análisis morfométrico de los esqueletos (Román, comunicación personal), de acuerdo con la clasificación de Hooton (1947) (tabla 8). La mayoría de los individuos sacrificados tenían una edad entre 0 y 3 años, este resultado concuerda con los relatos de las fuentes del siglo XVI que mencionan que las víctimas de los sacrificios a los dioses de la lluvia y del maíz eran individuos de corta edad.

En opinión de Broda (1971) “Los sacrificios de niños seguían el mismo plan que los demás sacrificios humanos: las víctimas eran la personificación viva de los dioses; en este caso, se tomaban niños para representar a los “dioses pequeños”, los Tlaloques. Por otro lado González (1985) dice: “Las víctimas correspondían al sexo y a la edad del dios que estaban representando”. Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con la idea de que las víctimas seleccionadas para el sacrificio fueron una personificación viva de los dioses a quien fueron ofrecidas, en este caso en particular individuos del sexo masculino para Ehécatl-Quetzalcoátl que era un dios masculino.

Se compararon los resultados obtenidos por dos técnicas de sexamiento (tabla 9), el análisis molecular del DNA antiguo y la utilización de características morfológicas (Pompa 1975, técnica realizada por el antropólogo físico Juan Alberto Román), y la observación de objetos asociados a la ofrenda (Guilliem 1996). El resultado obtenido por el análisis molecular del DNA antiguo mostró que todos los individuos que fueron identificados pertenecían al sexo masculino, mientras que la técnica de Pompa (1995) los identifica como femeninos, este resultado debe ser tomado con cierta reserva. Puesto que varios investigadores sugieren que los métodos usados en osteología humana no permiten la identificación del sexo de restos óseos infantiles y adolescentes recuperados de excavaciones arqueológicas con un alto grado de confiabilidad (Bass 1971; Ubelaker 1974; Pompa 1975; Sundick 1977; Weaver 1980 y Brown 2000).

El porcentaje obtenido en la asignación del sexo de restos óseos infantiles usando la evidencia arqueológica como base para asignar esta variable biológica fue de 38 %, con la técnica de Pompa (1975) de 77.4 %, y utilizando el DNA antiguo el porcentaje en la identificación del sexo fue de 87.2 %. La evidencia arqueológica mostró que los entierros frecuentemente son acompañados por una variedad de objetos y los arqueólogos asumen que estos objetos indican el sexo de los individuos sacrificados. Brown 2000 sugiere que las suposiciones de los arqueólogos acerca de que objetos podrían ser apropiados para hombres y mujeres pueden ser muy diferentes de la idea de las sociedades en análisis. El

porcentaje obtenido en éste trabajo, en la identificación del sexo mediante el análisis del DNA molecular mostró que las técnicas moleculares pueden ser utilizadas con ventaja sobre los métodos osteológicos en algunos restos óseos que no pueden ser sexados osteológicamente como por ejemplo: en individuos infantiles, adolescentes y en casos de adultos donde el esqueleto este incompleto. Varios investigadores (Faerman *et al.* 1995; Stone *et al.* 1996; Faerman *et al.* 1997; Vernesi *et al.* 1999 y Brown 2000) sugieren que las técnicas moleculares son la mejor alternativa para la asignación de esta variable biológica con un alto nivel de confianza en los casos antes mencionados.

Para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos y minimizar el riesgo de contaminación con DNA actual, se tomaron todas las medidas de precaución necesarias en la limpieza y preparación de las muestras, la extracción y purificación del DNA, así como en la realización de la PCR. En cada experimento de extracción y purificación de DNA se incluyeron controles de extracción y purificación. Al realizar la técnica de PCR se incluyeron controles negativos y los controles de extracción correspondientes. Todos los controles de extracción y de purificación que se realizaron en los experimentos de las tablas 6 y 7 fueron siempre negativos indicando la ausencia de una contaminación con DNA moderno.

Para corroborar los resultados obtenidos en el presente trabajo se realizaron extracciones de vértebra y costilla del mismo esqueleto, la extracción se realizó con dos técnicas diferentes obteniendo un resultado idéntico en la mayoría de las muestras. Se verificó la autenticidad de los fragmentos amplificados por secuenciación directa del cromosoma X y Y de algunas muestras (Dra. Angélica Gonzalez Oliver, Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias). El hecho de que los restos infantiles fueron identificados como masculinos permite descartar contaminación con DNA de quien realizó todos los experimentos, porque la mayoría de las muestras fueron manejadas exclusivamente por una mujer.

## **VI. CONCLUSIONES**

1.- Los resultados obtenidos en este estudio muestran que las técnicas basadas en el análisis del DNA antiguo, abren nuevas alternativas para responder a problemas que con las técnicas osteológicas tradicionales era difícil y a veces hasta imposible contestar.

2.- De los individuos analizados todos los que fueron identificados mediante el análisis del DNA pertenecen al sexo masculino.

3.- Este resultado concuerda con lo citado en las fuentes del siglo XVI de que los individuos sacrificados eran la personificación viva de la deidad a quien fueron inmoladas, en este caso en particular individuos del sexo masculino para el dios del viento Ehécatl-Quetzalcoátl que fue un dios masculino.

## VII. REFERENCIAS

Akane, A., Shiono H., Matsubara K., Nakahori Y., Seki S., Nagafuchi S., Yamada M., Nakagome Y., 1991. Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): Two alternative methods. *Forensic Science International* 49: 81-88.

Ausbel. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. Eds Current Protocols, New York.

Bass, WM. 1971. *A laboratory and field manual of the human skeleton*. Missouri Archaeological Soc. USA.

Benavente, Fray Toribio de, 1979. *Historia de los indios de la Nueva España, México*, Editorial Porrúa.

Boom, C., J.A. Sol, M. Salimans, C. Jansen, P. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 88:495-503 15.

Broda, Johana, 1971. Las fiestas aztecas de los dioses de la lluvia (una reconstrucción según las fuentes del siglo XVI). *Revista española de antropología americana*, Vol.6: 245-327.

Broda, Johana, 1979. *Estratificación social y ritual mexica (un ensayo de antropología social de los mexicas)*, Indiana 5, Ibero-Amerikanisches Institut Preubisches Kulturbesitz, West Berlin.

Broda, Johana, 1982. *El culto mexica de los cerros y del agua*. Multidiciplina, México, revista de la ENEP-Acatlán, año 3, núm.7, UNAM.

Brown, K. A. 2000. Identifying the sex of human remains by ancient DNA analysis. *Ancient Biomolecules*. Vol. 3: 215-225.

- Durán, Fray Diego, 1967. Historia de las indias de la Nueva España e islas de la tierra firme. 2 tomos, México, Editorial Porrúa.
- Faerman, M., D. Filon, G. Kahila, C. Greenblatt, P. Smith and A. Oppenheim. 1995. Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene* 167: 327-332.
- Faerman, M., Kahila, P. Smith, C. Greenblatt, C. Stager. D. Filon and A. Oppenheim. 1997. DNA analysis reveals the sex of infanticide victims. *Nature*. 385: 212-213
- González T. Y. 1985. El sacrificio humano entre los mexicas, México, INAH-FCE.
- Guilliem Arroyo, Salvador. 1996. Ofrendas a Ehécatl-Quetzalcóatl en el templo mayor de México-Tlatelolco, tesis de licenciatura por la ENAH, México.
- Guilliem Arroyo, Salvador. 1999. Ofrendas a Ehécatl-Quetzalcóatl en México-Tlatelolco. Proyecto Tlatelolco 1987-1996. México: Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Hagelberg, E., Sykes B. y Hedges R. 1989. Ancient bones DNA amplified. *Nature*. 342:485.
- Hagelberg, E. y J. B. Clegg. 1991. Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 244: 45-50.
- Hagelberg, E. 1994. Dried Samples: hard tissues. Mitochondrial DNA from ancient bones: Ancient DNA. Herrmann B., Hummel S. Springer-Verlag. New York Inc. pp.195-204.
- Hart P.S., Aldred M.J., Crawford P.J.M., Wright N.J., Hart T.C., Wright J.T. 2002. Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Archives of Oral Biology* 47: 261-265.

- Higuchi, R., B. Bowman, M. Freiberger, O. A. Ryder and A. C. Wilson. 1984. DNA sequences from the *quagga*, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312:282-284.
- Höss, M. y Pääbo. 1993. DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21:3913-3914.
- Hooton, E. 1947. *Up from the Ape*, MacMillan Company, U.S.A.
- Krings M., Stone A., Schmitz R. W., Krainitzki H., Stoneking M. y Paabo S. 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*. 90:19-30.
- Hummel, S. and Herrmann B. 1991. Y-Chromosome-Specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften* 78: 266-267.
- Li W., Mathews C., Gao C., DenBesten P.K. 1998. Identifacation of two additional exons at the 3' end of the amelogenin gene. *Archives of Oral Biology* 43: 497-504.
- Lagerström-Fermér M., Pettersson U., Landegren U., 1993. Molecular basis and consequences of a deletion in the amelogenin gene, Analized by capture PCR. *Genomics* 17: 89-92.
- Merriwether, D. A., F. Rohtammer, and R. E. Ferrell. 1994. Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia* 50: 592-601.
- Muñoz M. L., Moreno-Galeana M., Diaz-Badillo A., Loza-Martínez I., Macias-Juárez V., Márquez-Morfin L., Jiménez-López J. C. y Martínez-Meza A. 2001. Análisis del DNA mitocondrial de una población prehispánica de Monte Albán, Oaxaca. *Antropo*. En prensa.
- Nakahori, Y., O. Takenata and Y. Nakagome. 1991a. A human X-Y homologos region encodes "amelogenin". *Genomics* 9:264-269.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Nakahori, Y., K. Hamano, M. Iwaya and Y. Nakagome. 1991b. Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *Am. J. Med. Genet.* 39: 472-473.

Pääbo, S., R. G. Higuchi, and A. C. Wilson. 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 264:9709-9712.

Pääbo, S. 1993. Ancient DNA. *Scientific American.* 269:60-66.

Pääbo, S. 1994. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:1939-1943.

Román Berrelleza, Juan Alberto. 1990. *Sacrificio de Niños en el Templo Mayor.* INAH-GV Editores-Asociación de Amigos del Templo Mayor. México.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd Ed.,* Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.

Salido E.C., Yen PH., Koprivnikar K., Yu LC., Shapiro LJ. 1992. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 50:303-316.

Sahagún, Fray Bernardino de, 1975. *Historia general de las cosas de la Nueva España,* México, Editorial Porrúa.

Singer-Sam, J., R. L. Tanguay and A.D. Riggs. 1989. Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications: A forum for PCR user, issue 3 (september):* 1

Stone, A. C., G. R. Milner, S. Pääbo and M. Stoneking. 1996. Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am. J. Phys. Anthropol.* 99:231-238.

Stone, A. C., and M. Stoneking, 1993. Ancient DNA from a precolumbian amerindian population. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 92: 463-471.

Sullivan, K. M., A. Mannucci, C. Kimpton and P. Gill. 1993. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15: 636-641.

Turo N. 1994. The Biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia.* 50:530-535.

Vogelstein B. and D. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarosa. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76: 615-619.

Vernesi, C., D. Caranelli., S. Carbonelli., M. Ubaldi., F. Rullo y B. Chiarelli. 1999. Application of DNA sex test to bone specimens from two Etruscan (VII-III century BC) archaeological sites. *Ancient Biomol.* 2, 295-305.

Ubelaker, DH. 1974. Reconstruction of demographic profiles from ossuary skeletal samples. Smithsonian Institute, Washington DC.

Woodward, R. S., M. J. King, N. M Chiu, M. J. Kuchar y C. W. Griggs. 1994. Amplification of ancient nuclear DNA from teeth and soft tissues. *PCR Methods and applications* 3: 244-247.

Walsh, P. S., D. A. Metzger, y R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.

## **APÉNDICE DE FIGURAS**

## Gen de la amelogenina

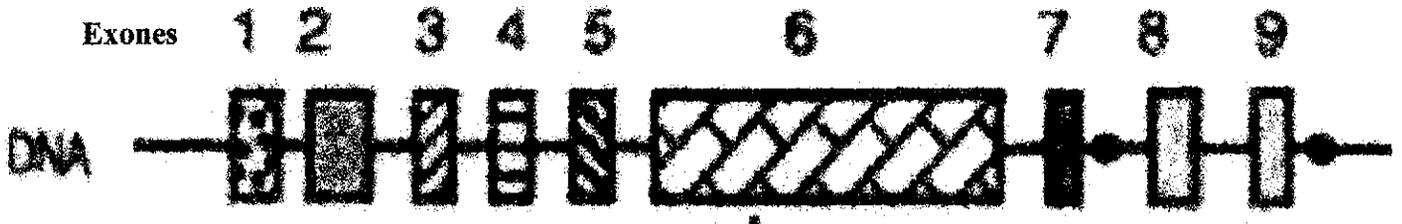


Figura 1a: Exones encontrados en el gen de la amelogenina, Hart P. S. *et al.* 2002.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

INICIADORES M4, M5 Y M6 UTILIZADOS POR  
FAERMAN *et al.* 1995

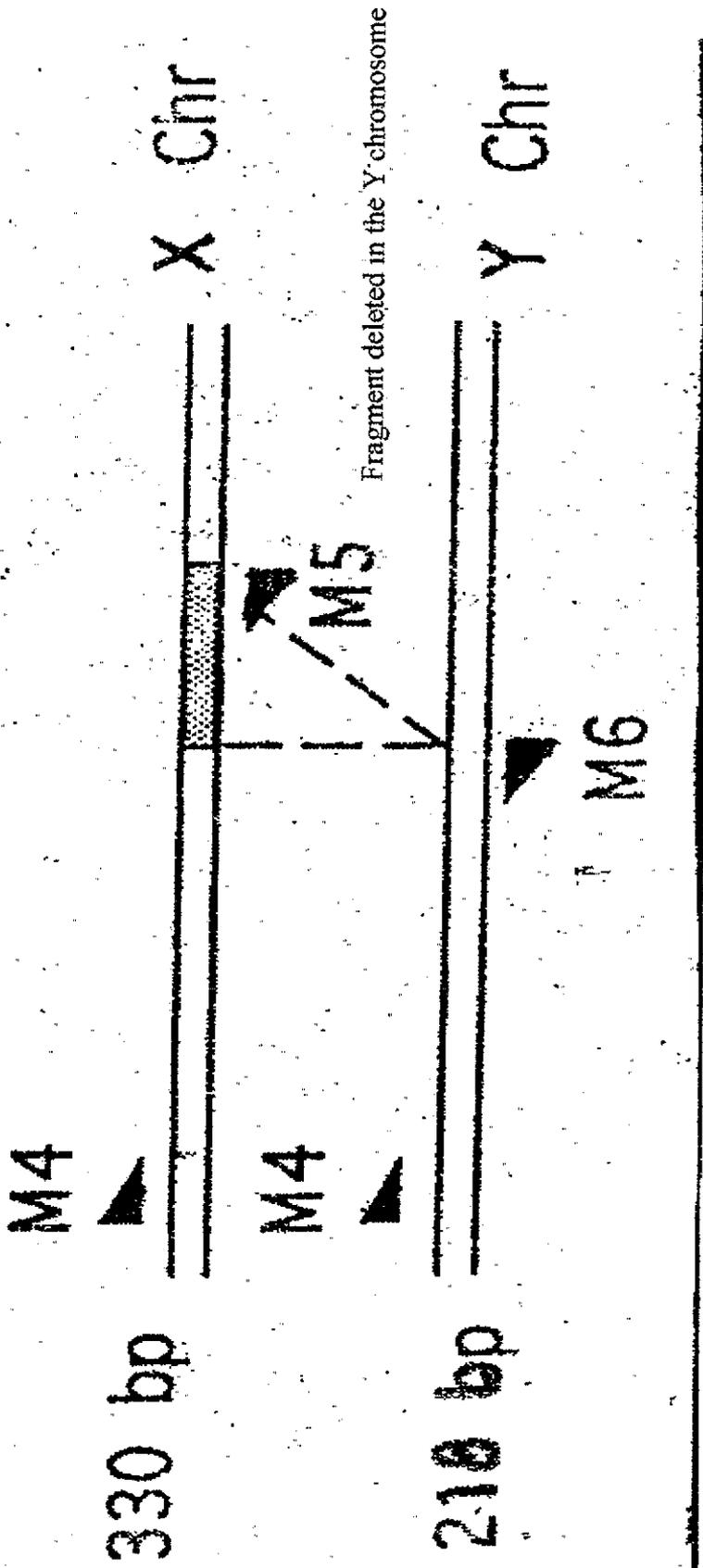
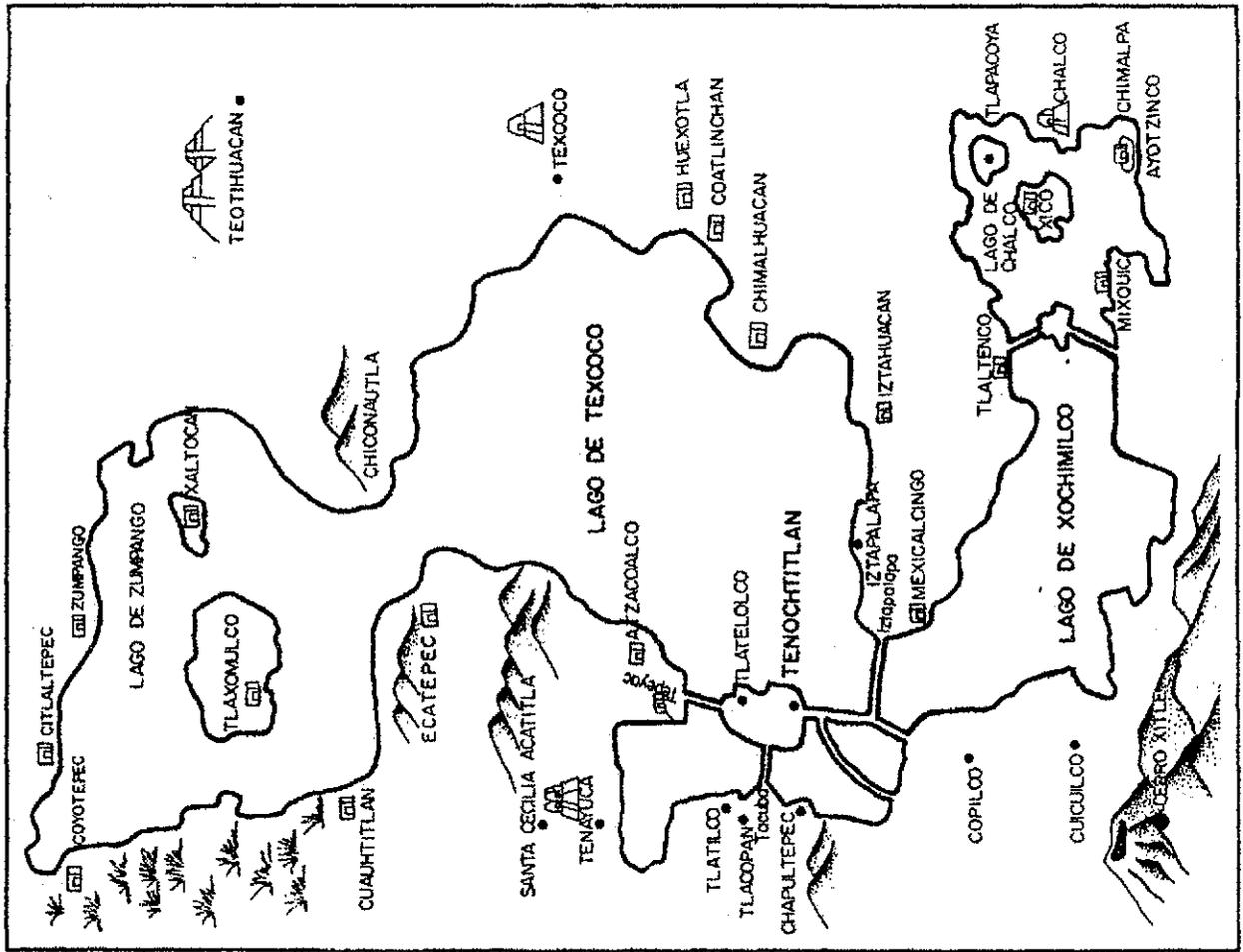


Figura 1b: Parte del gen de la amelogenina, mostrando la localización de los iniciadores de la PCR y el tamaño de los productos, Faerman *et al.* 1995. En el cromosoma Y se observa la delección de 189 bp.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 2a: Localización de Tlatelolco en el valle de Texcoco en la época precortesiana. Guilliem 1999. 46

# LOCALIZACIÓN DE LOS ENTIERROS EN EL TEMPLO DE EHÉCATL-QUETZALCÓATL

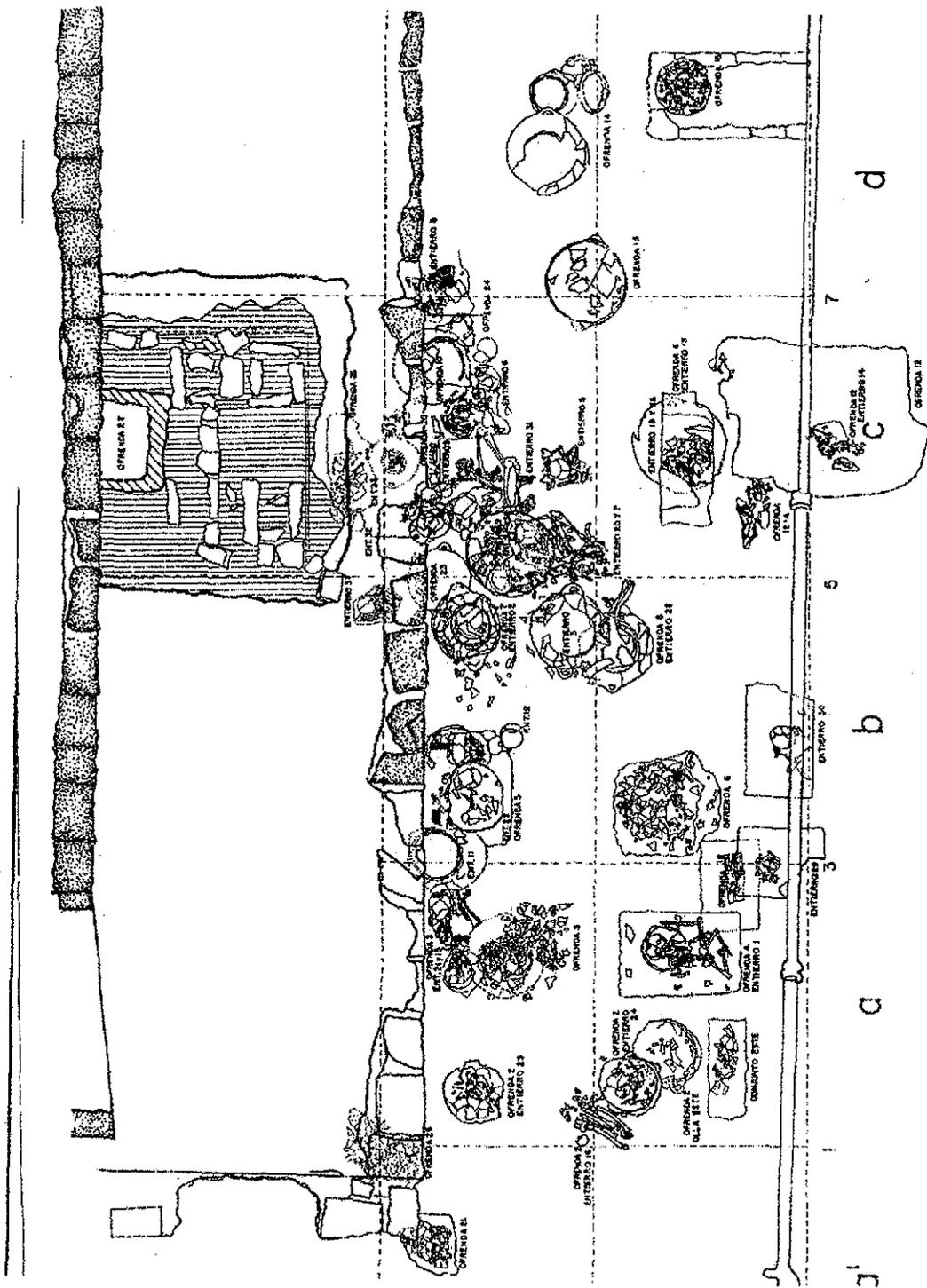
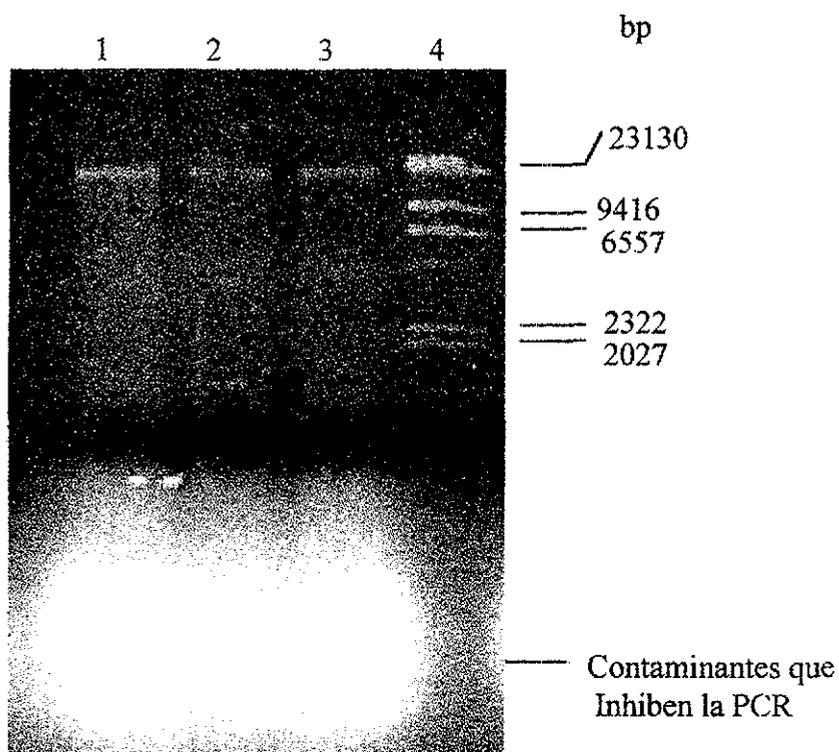


Figura 2b: Ofrendas encontradas en el Templo R dedicado al dios del viento Ehécatl-Quetzalcóatl en la zona arqueológica de Tlateloco. Guilliem 1999.

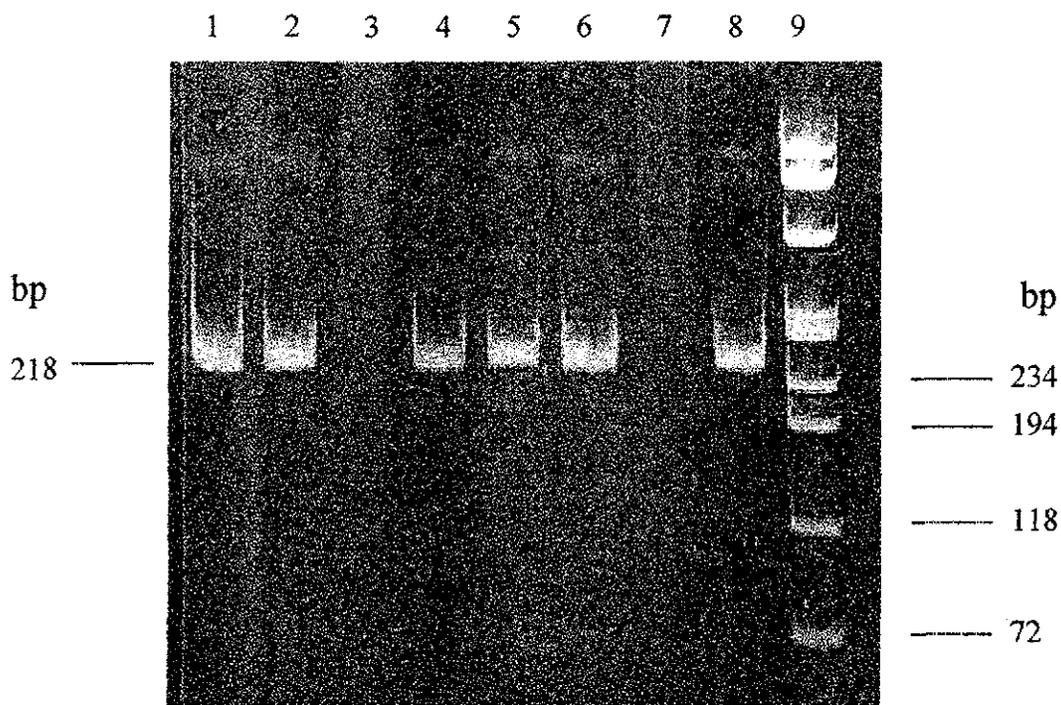
## Extracción de DNA total



- **Figura 3** : Extracción de DNA total por el método de Muñoz *et al.* (2001), gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1- 3: extractos de DNAs antiguos. Carril 4: marcador estándar  $\lambda$  / Hind III

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Productos de amplificación del cromosoma Y utilizando los iniciadores M4, M5 y M6 Faerman *et al.* 1995**

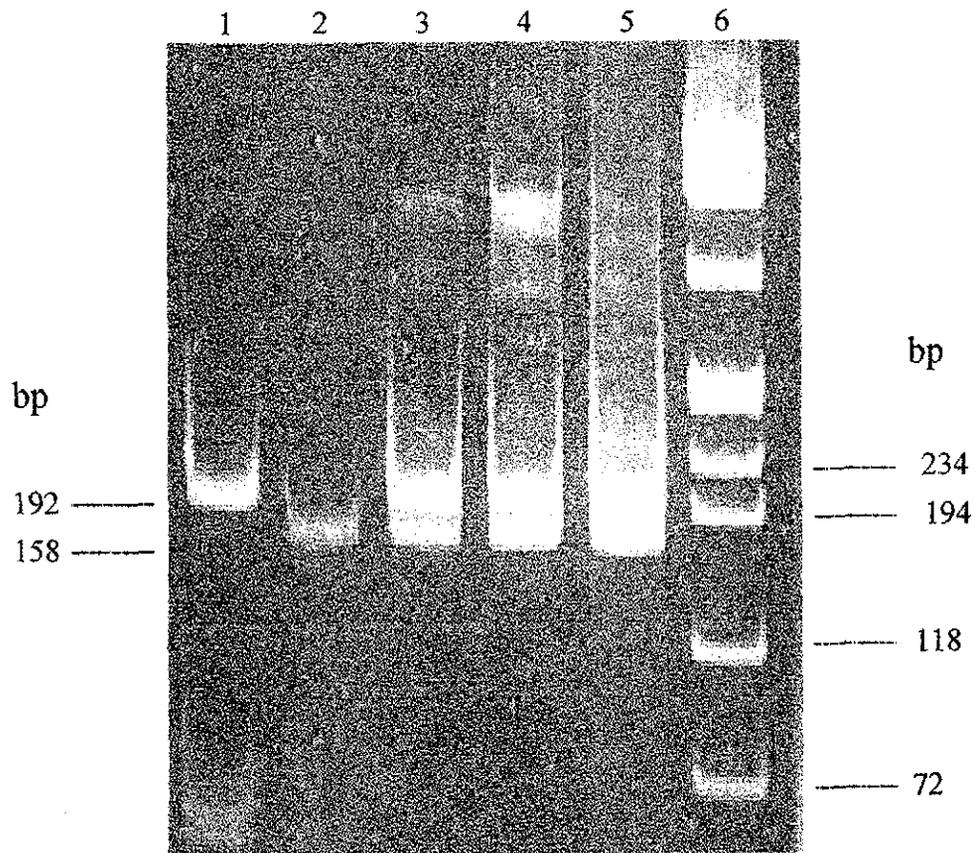


**Figura 4:** Gel de poliacrilamida al 14 % teñido con bromuro de etidio, mostrando el producto de amplificación del cromosoma Y (218 bp) de un resto óseo prehispánico de Tlatelolco. Carriles 1, 2, 4-6: Productos de amplificación del cromosoma Y. Carriles 3, 7: Extractos de DNA sin amplificar. Carril 8: DNA contemporáneo control (Miguel Angel). Carril 9: Marcador estándar  $\phi$ x174/Hae III

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## Productos de amplificación del cromosoma X y Y utilizando los iniciadores COM, XSP y YSP



**Figura 5:** Productos de amplificación del cromosoma X (192 bp) y Y (158 bp) de un Individuo infantil, analizados en un gel de poliacrilamida al 14% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Producto de amplificación del cromosoma X. Carril 2: Producto de amplificación del cromosoma Y. Carril 3: Productos de amplificación del cromosoma X y Y. Carril 4: DNA contemporáneo control (Miguel Angel). Carril 5: Control de contaminantes. Carril 6: Marcador estándar  $\phi$ x174/Hae III.