

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio y caracterización de los restos óseos encontrados en la
región de Puxcatán en el municipio de Tacotalpa, Tabasco mediante
el análisis del DNA mitocondrial”**

T E S I S

Que presenta

MARÍA TERESA NAVARRO ROMERO

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de la Tesis: Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno.

Ciudad de México

Octubre, 2020

DEDICATORIA

La expresión escrita es un arte y quiero aprovechar este espacio para dedicar mi tesis producto de un trabajo lleno de dedicación y pasión; que significa la culminación de mi formación académica como estudiante y el inicio de una nueva etapa como profesional.

A mi Mamá que ha sido la fortaleza más grande, la palabra oportuna, el apoyo incondicional, la luz en la oscuridad y el amor infinito, así como, el mejor ejemplo que he tenido como ser humano y profesionista.

A Papá Panchito y Mamá Tere por llenarme de amor y cariño, por su apoyo incondicional, por sus consejos y sobre todo por compartir su sabiduría que es inigualable en tiempo y espacio, todo ello con el propósito de contribuir en mi crecimiento personal.

A mis tías y tíos que han sido como otros padres para mí, en quienes siempre he encontrado una palabra de aliento y el más sincero de los consejos.

A mi tío que es el ángel que cuida de todos nosotros y que hoy se une a este logro desde el cielo.

A mis primos grandes y chiquitos, mismos que con el transcurso del tiempo también se han hecho grandes, por simplemente regalarme sonrisas que sirvieron para convertir los días grises en días llenos de mágicos colores.

En ocasiones no hay palabras para expresar el respeto, la gratitud y el amor

por esta razón a todos ellos que son un "Motivo en mi Vida"

les dedicó este escrito...

AGRADECIMIENTOS

CONACYT

Por el financiamiento económico (beca: 380118) otorgado durante los cuatro años (2014-2018) de Doctorado y por el financiamiento económico (beca mixta: 290936) otorgada en el año 2015-2016 para realizar una Estancia Doctoral en el extranjero.

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno

Por aceptarme en su grupo de trabajo, darme la confianza y la libertad de decidir, diseñar y planear el Proyecto de Investigación que desarrollé durante el doctorado y finalmente por contribuir en mi última etapa de formación académica como Investigadora.

Dr. Ben Krause-Kyora

Por su colaboración en el desarrollo experimental de librerías genéticas, secuenciación de nueva generación y el análisis de datos a través de herramientas bioinformática; y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo durante mi Estancia Doctoral.

Dr. Carlos Serrano Sánchez

Por su valiosa colaboración durante todo el doctorado y su asesoría relacionada con aspectos históricos de Mesoamérica y el desarrollo de las civilizaciones Olmeca, Zoque y Maya. Por su importante contribución en el análisis cefalométrico de los cráneos de estudio que presentaban deformación craneal intensional, por su disponibilidad de tiempo para discutir aspectos relacionados con el Proyecto y por compartir su conocimiento.

Arqueólogo Enrique Alcalá Castañeda

Por su colaboración arqueológica relacionada con información sobre el contexto histórico y los restos óseos prehispánicos encontrados en la Cueva de Puyil, lugar donde se obtuvieron las muestras de estudio. Por su asesoría para elaborar el mapa de la Cueva y por su descripción detallada de la primera expedición arqueológica realizada en el sitio.

M. en C. Eladio Terreros Espinoza

Por su colaboración antropológica relacionada con información sobre el contexto histórico y los vestigios arqueológicos encontrados en la Cueva de Puyil.

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y Dr. Luis Kameyama Kawabe

Por su asesoría, disponibilidad de tiempo, sugerencias experimentales y retroalimentación durante el desarrollo del Proyecto de Investigación.

Quiero agradecer a todo el personal que conforma el Laboratorio 1 de la Sección II de Genética y Biología Molecular comenzando por los auxiliares Miguel y Rosi por sus contribuciones académicas en los seminarios internos, a los técnicos Hebert y Donají por su excelente trabajo dentro de los laboratorios, a Gerardo por su contribución académica y ser parte importante en la organización del insectario, lugar donde realice el proyecto de investigación y en especial a mis compañeros de laboratorio que después se volvieron amigos Eduardo, Angélica y Ashael por su apoyo, paciencia, comprensión y sobre todo por su amistad.

Quiero agradecer al grupo de trabajo del Instituto de Biología Molecular Clínica de la Universidad de Kiel en Alemania a Marcel, Lisa, Marion, Yara y Julian por su contribución académica en la parte de secuenciación masiva y análisis bioinformático durante la Estancia Doctoral en Alemania y en especial a Guillermo, Lisa, Janina y Amit por brindarme su sincera amistad.

Quiero agradecer especialmente a la comunidad de la localidad de Puxcatán, ubicada en el municipio de Tacotalpa, en el Estado de Tabasco por su hospitalidad, cooperación y ayuda en las expediciones y visitas a la Cueva de Puyil.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos de vida Alberto, Eliza, Axa, Miguel, Grecia y Mine por estar al pendiente de mi durante todo este proceso y por su infinita amistad.

María del Refugio Navarro Romero

Por ser la fortaleza más grande en mi vida y por enseñarme que el camino siempre debe vivirse con pasión y entrega. Por ser la persona que ha creído y confiado en mí incondicionalmente y la que me ha enseñado a hacer realidad mis sueños, sin importar el tamaño de ellos. Por brindarme su apoyo incondicional, guiarme, escucharme y siempre tener la palabra de aliento correcta para salir victoriosa de cada dificultad. Por ser mi persona favorita y darme el amor más desinteresado y sincero ¡GRACIAS!.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. MESOAMÉRICA.....	1
1.2. CIVILIZACIÓN OLMECA.....	2
1.3. CIVILIZACIÓN ZOQUE.....	3
1.4. CIVILIZACIÓN MAYA.....	4
1.5. DEFORMACIÓN CRANEAL INTENCIONAL.....	6
1.6. DNA ANTIGUO (ADNA).....	7
1.6.1. ESTUDIO DEL ADNA.....	7
1.6.2. LIMITACIONES DEL ESTUDIO DEL ADNA.....	7
1.6.3. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS).....	8
1.7. MITOCONDRIA.....	8
1.7.1. CARACTERÍSTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL.....	9
1.8. GENÉTICA DE POBLACIÓN.....	10
1.8.1. HAPLOGRUPO.....	11
1.8.2. DISTRIBUCIÓN HAPLOTÍPICA EN AMÉRICA.....	12
1.9. PALEOPATOLOGÍA.....	12
1.9.1. DIABETES.....	12
1.9.2. ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES EN CIVILIZACIONES PREHISPÁNICAS.....	13
1.10. IDENTIFICACIÓN DE SEXO EN RESTOS ANTIGUOS.....	13
1.11. CUEVA DE PUYIL.....	14
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. DESCRIPCIÓN DEL SITIO ARQUEOLÓGICO.....	21
4.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	22
4.3. DATACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	22
4.4. ANÁLISIS CEFALOMÉTRICO.....	22

4.5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	23
4.6. EXTRACCIÓN DE DNA	24
4.7. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA RHV-I.....	24
4.8. PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS	25
4.8.1. TRATAMIENTO CON UDG.....	25
4.8.2. LIGACIÓN DE LOS ADAPTADORES.....	25
4.8.3. RELLENAR.....	26
4.8.4. INDEXING PCR.....	26
4.8.5. REAMPLIFICACIÓN DE LAS LIBRERÍAS.....	26
4.8.6. CUANTIFICACIÓN DE LAS LIBRERÍAS Y SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN	26
4.9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO NGS.....	26
4.10. CLASIFICACIÓN DE HAPLOGRUPOS	27
4.11. CONFIRMACIÓN DE LOS HAPLOGUPOS POR PCR EN TIEMPO REAL	27
4.12. REDES HAPLOTÍPICAS	27
4.13. CLASIFICACIÓN DE VARIANTES ASOCIADAS A DIABETES	27
4.14. CONFIRMACIÓN DE LA VARIANTE ASOCIADA A DIABETES POR PCR-TR.....	28
4.15. DETERMINACIÓN DEL SEXO POR LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE <i>AMEL</i>.....	29
4.16. ANÁLISIS DEL CROMOSOMA X Y Y PARA IDENTIFICAR EL SEXO MASCULINO ...	29
4.17. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO MASCULINO USANDO MARCADORES.....	31
5. RESULTADOS	33
5.1. DATACIÓN POR ¹⁴ C.....	33
5.2. ANÁLISIS CEFALOMÉTRICO.....	33
5.3. AMPLIFICACIÓN DE LA RHV-I Y RHV-II	34
5.4. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS).....	35
5.5. IDENTIFICACIÓN DEL HAPLOGRUPO	38
5.6. ANÁLISIS DE REDES HAPLOTÍPICAS.....	39
5.7. ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL	43
5.8. ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS DEL GENOMA NUCLEAR.....	44
5.9. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO POR LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>AMEL</i>	44
5.10. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO POR EL ANÁLISIS DEL CROMOSOMA X AND Y	45
5.11. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS POR PCR DE LOS GENES <i>TTY7</i> , <i>TSPY3</i> , <i>TTY2</i> AND <i>TTY22</i> EN MUESTRAS CONTEMPORÁNEAS.....	45

5.12. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS POR PCR DE LOS GENES <i>TTY7</i> , <i>TSPY3</i> , <i>TTY2</i> AND <i>TTY22</i> EN MUESTRAS ANTIGUAS PREHISPÁNICAS.....	46
6. DISCUSIÓN.....	48
7. CONCLUSIONES.....	57
8. PRESPECTIVAS.....	59
9. REFERENCIAS.....	61
10. APÉNDICE.....	69
I. NOMBRES DE LOS SITIOS ARQUEOLÓGICOS DE LA CULTURA MAYA.....	69
II. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA NGS.....	71
11. ANEXO.....	75
I. PRIMERA PUBLICACIÓN.....	75
II. SEGUNDA PUBLICACIÓN.....	90
III. TERCERA PUBLICACIÓN.....	91
IV. CAPITULO DE LIBRO.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LA REGIÓN MESOAMERICANA.....	1
FIGURA 2. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LA CULTURA OLMECA	2
FIGURA 3. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN NATIVA CONTEMPORÁNEA ZOQUE.....	4
FIGURA 4. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LA CULTURA MAYA Y SUS PRINCIPALES ASENTAMIENTOS.	5
FIGURA 5. TIPOS DE DEFORMACIÓN CRANEAL INTENCIONAL EN LAS CIVILIZACIONES PREHISPÁNICAS MESOAMERICANAS.....	6
FIGURA 6. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN MORFOLÓGICA DE LA MITOCONDRIA.....	9
FIGURA 7. ESTRUCTURA DEL GENOMA MITOCONDRIAL.....	10
FIGURA 8. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LA CUEVA DE PUYIL	15
FIGURA 9. FOTOGRAFÍAS DE LA CUEVA DE PUYIL.....	16
FIGURA 10. ESTRUCTURA NATURAL CALCÁREA EN LA CÁMARA DOS.....	17
FIGURA 11. VISTA INTERIOR DE LA TERCERA SECCIÓN DE LA CÁMARA CUATRO	17
FIGURA 12. MAPA DE LAS CÁMARAS 4, 5 Y 6 DENTRO DE LA CUEVA DE PUYIL Y LA LOCALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESTUDIO DENTRO DE LA CUEVA.	21
FIGURA 13. DISEÑO DE LA SONDA PARA DETERMINAR LA VARIANTE M.16519T>C.	28
FIGURA 14. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN HIPERVARIABLE I DE ADNA.....	34
FIGURA 15. AMPLIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE LA RHV- I DEL mTDNA	34
FIGURA 16. CUANTIFICACIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE ADNA	35
FIGURA 17. CONTROL DE CALIDAD DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS POR EL SOFTWARE FASTQC.....	36
FIGURA 18. PATRÓN DE DAÑO DE LA MUESTRA PUXTABMEX003	36
FIGURA 19. DATOS PORCENTUALES DE DNA ENDÓGENO SIN TRATAMIENTO Y TRATADO CON UDG PRESENTE EN CADA MUESTRA PREHISPÁNICA DE ESTE ESTUDIO	37
FIGURA 20. COBERTURA DEL GENOMA COMPLETO 1X SIN TRATAMIENTO Y TRATADO CON UDG	37
FIGURA 21. COBERTURA DEL GENOMA MITOCONDRIAL 1X SIN TRATAMIENTO Y TRATADO CON UDG.....	38

FIGURA 22. RED HAPLOTÍPICA DEL HAPLOGRUPO A.....	41
FIGURA 23. RED HAPLOTÍPICA DEL HAPLOGRUPO C.	42
FIGURA 24. RED HAPLOTÍPICA DEL HAPLOGRUPO D	43
FIGURA 25. AMPLIFICACIÓN DE REGIONES ESPECÍFICAS DEL CROMOSOMA X Y Y PARA DETERMINAR EL SEXO EN MUESTRAS PREHISPÁNICAS ENCONTRADAS EN LA CUEVA DE PUYIL	44
FIGURA 26. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA ESPECÍFICA DE LOS GENES <i>TTY22</i> , <i>TTY7</i> , <i>TTY2</i> Y <i>TSPY3</i> PARA DETERMINAR EL SEXO EN DNA HUMANO CONTEMPORÁNEO	46
FIGURA 27. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA ESPECÍFICA DEL GEN <i>TTY7</i> EN MUESTRAS PREHISPÁNICAS ENCONTRADAS EN LA CUEVA DE PUYIL	46
FIGURA 28. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA ESPECÍFICA DEL GEN <i>TSPY3</i> EN MUESTRAS PREHISPÁNICAS ENCONTRADAS EN LA CUEVA DE PUYIL	47
FIGURA 29. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA ESPECÍFICA DEL GEN <i>TTY2</i> EN MUESTRAS PREHISPÁNICAS ENCONTRADAS EN LA CUEVA DE PUYIL	48
FIGURA 30. RELACIÓN GENÉTICA DE LAS MUESTRAS PUXTABMEX001, PUXTABMEX002 Y PUXTABMEX004 CON POBLACIONES NATIVAS CONTEMPORÁNEAS.....	49
FIGURA 31. RELACIÓN GENÉTICA DE LA MUESTRA PUXTABMEX006 CON POBLACIONES NATIVAS CONTEMPORÁNEAS.....	510
FIGURA 32. RELACIÓN GENÉTICA DE LAS MUESTRAS PUXTABMEX003, PUXTABMEX005, PUXTABMEX007 Y PUXTABMEX010, CON POBLACIONES NATIVAS CONTEMPORÁNEAS	53
FIGURA 33. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL CHR-Y DONDE SE MUESTRA LAS REGIONES PAR1, PAR2 Y NRY.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. VARIANTES ESPECÍFICAS EN LA REGIÓN CONTROL PARA LOS CUATRO HAPLOGRUPOS FUNDADORES DE LOS NATIVOS AMERICANOS (A, B, C Y D).....	12
TABLA 2. IDENTIFICACIÓN ARQUEOLÓGICA DE LAS DIEZ MUESTRAS DE ESTUDIO (PUXTABMEX001-PUXTABMEX010) ENCONTRADAS EN LA CUEVA DE PUYIL.....	22
TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE LOS 18 GENES Y 48 VARIANTES EL DNA NUCLEAR ASOCIADOS COMO FACTOR DE RIESGO A DT2 ENCONTRADOS EN POBLACIÓN MEXICANA Y ASIÁTICA.....	28
TABLA 4. GENES QUE SE ANALIZARON PARA LA DETECCIÓN DE SEXO.....	30
TABLA 5. DATACIÓN POR ¹⁴ C DE LAS MUESTRAS ENCONTRADAS EN LA CUEVA DE PUYIL.....	33
TABLA 6. TAMAÑO DE LAS LECTURAS ALINEADAS DEL GENOMA COMPLETO.....	38
TABLA 7. TAMAÑO DE LAS LECTURAS ALINEADAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL.....	39
TABLA 8. COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DIFERENTES PARA IDENTIFICAR EL SEXO EN MUESTRAS PREHISPÁNICAS ENCONTRADAS EN LA CUEVA DE PUYIL.....	47

RESUMEN

Muestras prehispanicas del periodo Arcaico antecesoras de las civilizaciones mesoamericanas y muestras Mayas del periodo Clásico con importancia histórica fueron analizadas por secuenciación de nueva generación para conocer características del DNA mitocondrial de las civilizaciones mesoamericanas. Las muestras fueron encontradas en diferentes depósitos mortuorios en la Cueva de Puyil localizada en el municipio de Tacotalpa, en el estado de Tabasco, México. Debido a las condiciones en las que se encontraba la cueva, el origen étnico, la edad, si fue un evento o varios eventos a través del tiempo no se pudieron determinar, por lo que, este estudio se enfocó en la estimación de la edad y el análisis de las secuencias a nivel molecular para identificar el origen genético materno a través del análisis del DNA mitocondrial, su distribución haplotípica, su relación con civilizaciones antiguas y contemporáneas de América y Asia; así como, aspectos de la deformación cefálica intencional, su sexo y variantes asociadas como factor de riesgo a Diabetes. Los haplogrupos encontrados fueron A, A2, C1, C1c, y D4, el haplogrupo B no se identificó en ninguna de las muestras. Los resultados de redes haplotípicas mostraron la relación genética que existió entre Mayas de México y Guatemala, así como la relación entre poblaciones nativas contemporáneas de Bolivia, Brasil, Republica Dominicana, China, Asia y Beringia. Los resultados apoyan la teoría migratoria del poblamiento de América de Norte a Sur y después una ruta de regreso del Sur a Norte de América pasando por las islas del Caribe y que el ancestro común de los haplogrupos fundadores del Nuevo Mundo encontrados en este estudio provenían de Asia. Se identificaron variantes nucleares y mitocondriales asociadas como factor de riesgo a Diabetes; así como el desarrollo una nueva metodología para identificar el sexo masculino en restos óseos antiguos, mediante el análisis *in silico* de quince genes del cromosoma Y. Las secuencias específicas para evaluar el sexo masculino se identificaron en los genes *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* y *TTY22* dando positivo para el sexo masculino en las diez muestras de estudio. La deformación cefálica intencional también se identificó, lo que permitió definir su posible origen étnico.

ABSTRACT

Pre-Hispanic samples from the Archaic period, predecessors of Mesoamerican civilizations and Mayan samples from Classic period with historical importance were analyzed by Next Generation Sequencing and Sanger to know characteristics of Mesoamerican civilizations. The samples were found in different mortuary deposits into the Puyil cave located in Tacotalpa municipality, in Tabasco state, Mexico. Ethnic origin, age, whether it was an event or several events through the time were unknown, for this reason, this project has focused on the study of age and sequences analysis to identify the maternal genetic lineage by mitochondrial DNA, its haplotype distribution, its relationship with ancient and contemporary civilizations of America, Asia and Beringia, as well as, aspects of intentional cephalic deformation, its gender identification and its variants associated as a risk factor in Diabetes. The haplogroups were found A, A2, C1, C1c and D4, and haplogroup B was not identified in this samples. The results of the haplotype networks show the genetic relationship that existed between Mayas of Mexico and Guatemala, as well as the relationship between contemporary native populations from Bolivia, Brazil, Dominican Republic, China, Asia and Beringia. The results support the migration theory of settlement from North to South America and then a return route from South to North America passing through the Caribbean islands. Our results also shown that the common ancestor of the founding haplogroups of the New World found in this study came from Asia. The nuclear and mitochondrial variants associated as a risk factor in Diabetes were identified. In addition a new methodology was developed to identify the male sex in ancient bone remains by *in silico* analysis of 15 genes of the Y chromosome; the specific sequences to evaluate the male sex were identified in the genes *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* and *TTY22*; the results shown that all of the study samples were male.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MESOAMÉRICA

Mesoamérica es una región en el continente americano en donde habitaron múltiples culturas, entre las más importantes se encuentran, la Olmeca, Zoque, Maya, Zapoteca, Teotihuacana, Tolteca y Azteca; geográficamente se localiza en el centro y sur de México y países de América Central como: Guatemala, El Salvador y al Oeste de Honduras, Nicaragua y Costa Rica¹ (Fig. 1). La historia prehispánica se ha dividido en cuatro períodos de tiempo, también denominados horizontes culturales: Arcaico (8000–2000 AC), Preclásico (2000 AC–200 DC), Clásico (200–800 DC) y Postclásico (800–1521 DC)^{2,3}. Las civilizaciones mesoamericanas practicaban la deformación craneal intencional y el limado e incrustación dental como distinción entre las clases sociales.

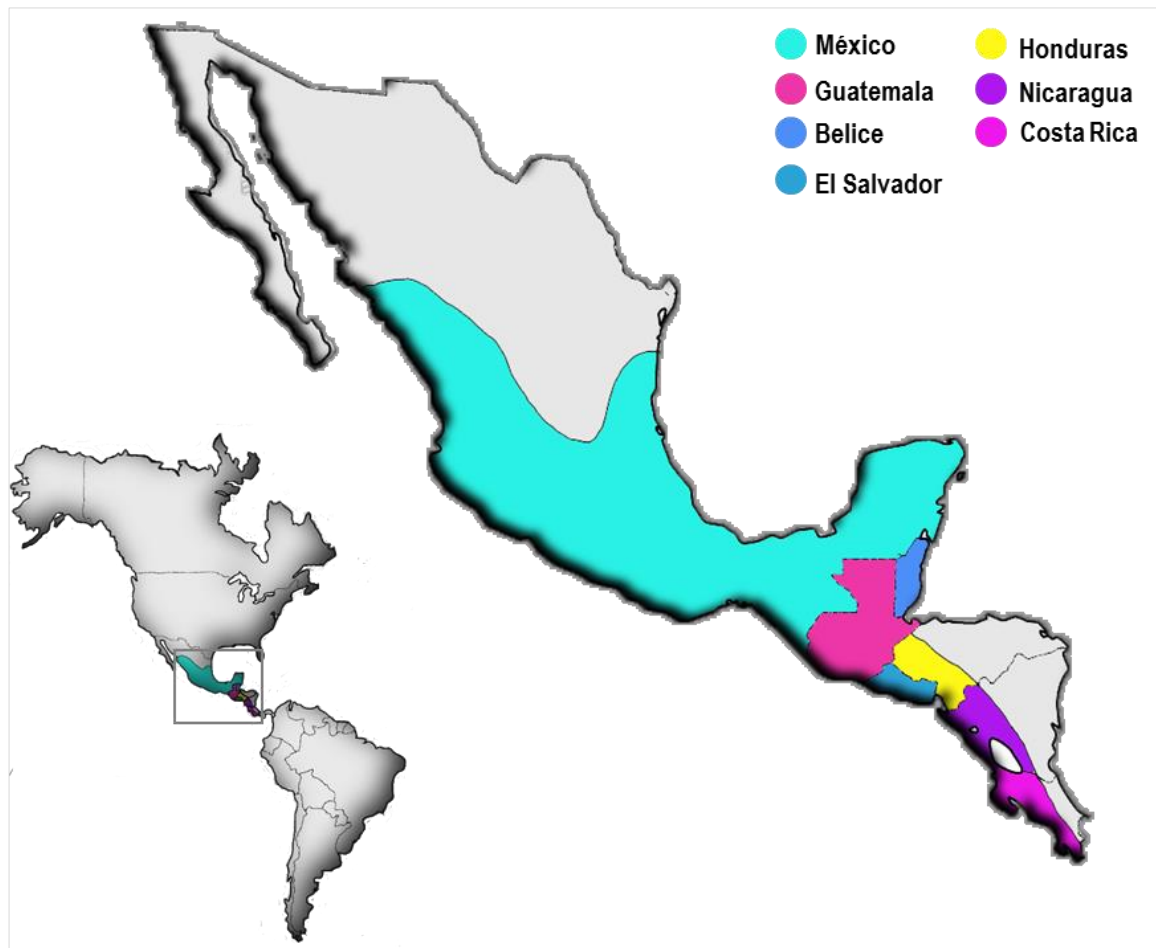


Figura 1. Localización geográfica de la región Mesoamericana, dentro del continente americano en Centro y sur de México, Guatemala, Belice, El Salvador y al Oeste de Honduras, Nicaragua y Costa Rica.

1.2. CIVILIZACIÓN OLMECA

El acontecimiento más significativo del período Preclásico ocurrió entre los años 2000–400 AC con el surgimiento de la cultura Olmeca, considerada actualmente como la civilización madre mesoamericana, debido a su influencia en urbanismo, escultura, matemáticas y astronomía. Los olmecas habitaron principalmente en la parte sureste del estado de Veracruz y en el oeste del estado de Tabasco en México^{4,5} (Fig. 2).

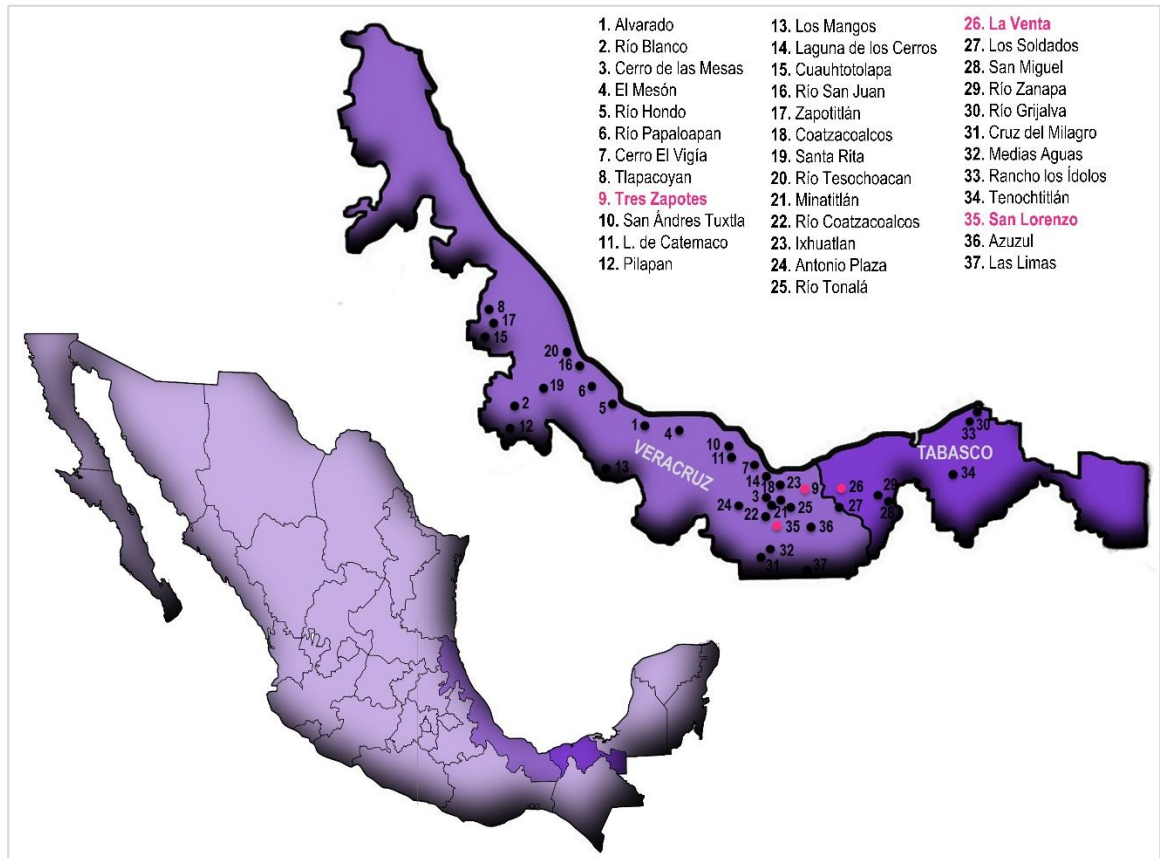


Figura 2. Localización geográfica de la Cultura Olmeca en los estados de Veracruz y Tabasco en México y sus principales asentamientos.

El término “Olmeca” significa en náhuatl “Gente del país del hule”. Los olmecas hablaron una lengua perteneciente a la familia Mixe-Zoque; Mixe (incluye las lenguas mixes de Oaxaca y las lenguas populares del estado de Veracruz) y Zoque (incluye las lenguas zoque de los estados de Chiapas, Oaxaca y Tabasco)⁶. Actualmente los sitios ceremoniales más importantes de la cultura Olmeca son: San Lorenzo Tenochtitlán, La Venta y Tres Zapotes (Fig. 2)⁷.

- ⊕ San Lorenzo Tenochtitlán (~1800–1000 AC): Es conocido como el centro más antiguo, está situado en el estado de Veracruz cerca del río Coatzacoalcos. El lugar floreció en el año ~1150 AC época de la que datan la mayor parte de las esculturas y elementos arquitectónicos que caracterizan a la cultura olmeca, los cuales se conservan en el sitio⁶.
- ⊕ La Venta (~1000–400 AC): Fue el centro ceremonial más importante de los olmecas, se distingue por su arquitectura, sus esculturas, sus ofrendas de jade, cuenta con la pirámide más antigua de Mesoamérica y también se han encontrado cabezas colosales, se cree que pudo llegar a albergar hasta 18,000 habitantes^{6,7}.
- ⊕ Tres Zapotes (hasta ~400 AC): Fue el último lugar en donde se desarrolló la cultura Olmeca, es el más conocido ya que sobrevivió hasta una época más cercana⁶.

La civilización Olmeca fue muy rica en elementos culturales, estableció un calendario de avanzada perfección que se basaba en el movimiento del Sol y la Luna. Fue una cultura que duró aproximadamente ~1000 años, tuvieron su esplendor y desaparecieron, quizás por las constantes invasiones o por las migraciones que originaron otros grupos, entre ellos la civilización Zoque y Maya^{8–10}.

1.3. CIVILIZACIÓN ZOQUE

Los zoques están arqueológicamente y lingüísticamente relacionados con los olmecas que hablaron el idioma proto-mixe-zoque en 1800–1600 AC⁴. En los años 1450–1350 AC se describe la primera gran expansión cuando los olmecas migraron a otros lugares del estados de Veracruz y Tabasco, originando la variante mixe-zoque en 1350–1300 AC^{8,9,11,12}, lengua hablada por los Zoques que habitaron el estado de Tabasco, por esta razón los arqueólogos que estudian esta civilización creen que los zoques fueron descendientes directos de los olmecas. Actualmente, la comunidad nativa contemporánea zoque habita en el sur de México en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca y Chiapas¹¹ (Fig. 3); la única evidencia arqueológica conocida hasta el momento se encuentra es Malpasito en el municipio de Huimanguillo en Tabasco, México.

Dada la situación topográfica del área, el clima y la hidrología en Tabasco, se formaron una gran cantidad de cavernas aprovechadas por el hombre en numerosas ocasiones y de manera muy diversa durante el curso de la historia¹³. Estos lugares han desempeñado un componente importante

en la religión de los pueblos mesoamericanos, y particularmente para las civilizaciones que habitaron en la sierra tabasqueña utilizaron algunas cavernas para establecer centros ceremoniales, dándole de esta manera un sentido sagrado a las cuevas¹⁴, representaban un importante concepto cosmogónico del mundo, ya que las consideraban como el origen de la vida y/o la entrada al inframundo.

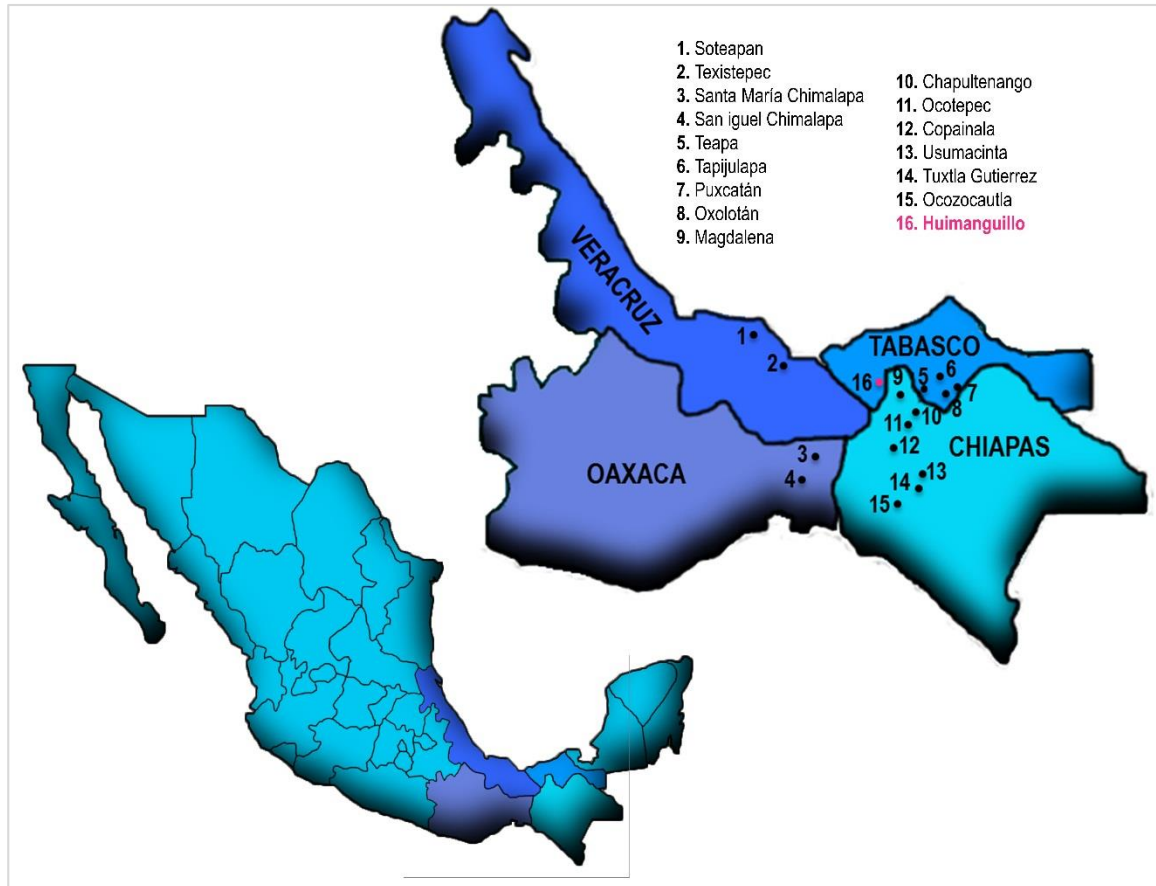


Figura 3. Localización geográfica de la población nativa contemporánea Zoque y la ubicación geográfica de la zona arqueológica Malpasito en el municipio de Huimanguillo en el estado de Tabasco, México.

1.4. CIVILIZACIÓN MAYA

Los Antiguos Mayas son una de las culturas mesoamericanas prehispánicas más importantes, debido a su extenso conocimiento en diferentes áreas como astronomía, arquitectura, matemáticas, escultura, el desarrollo de su calendario y su escritura^{15,16}. Ellos comenzaron a desarrollarse en el año ~250 DC y continuaron hasta la llegada de los españoles. La civilización Maya habitó en una región muy amplia ubicada geográficamente en el territorio del sureste de México, en los estados de

Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán; y en los países ubicados en América Central, Belice, Guatemala, Honduras y El Salvador¹⁷ (Fig. 4).

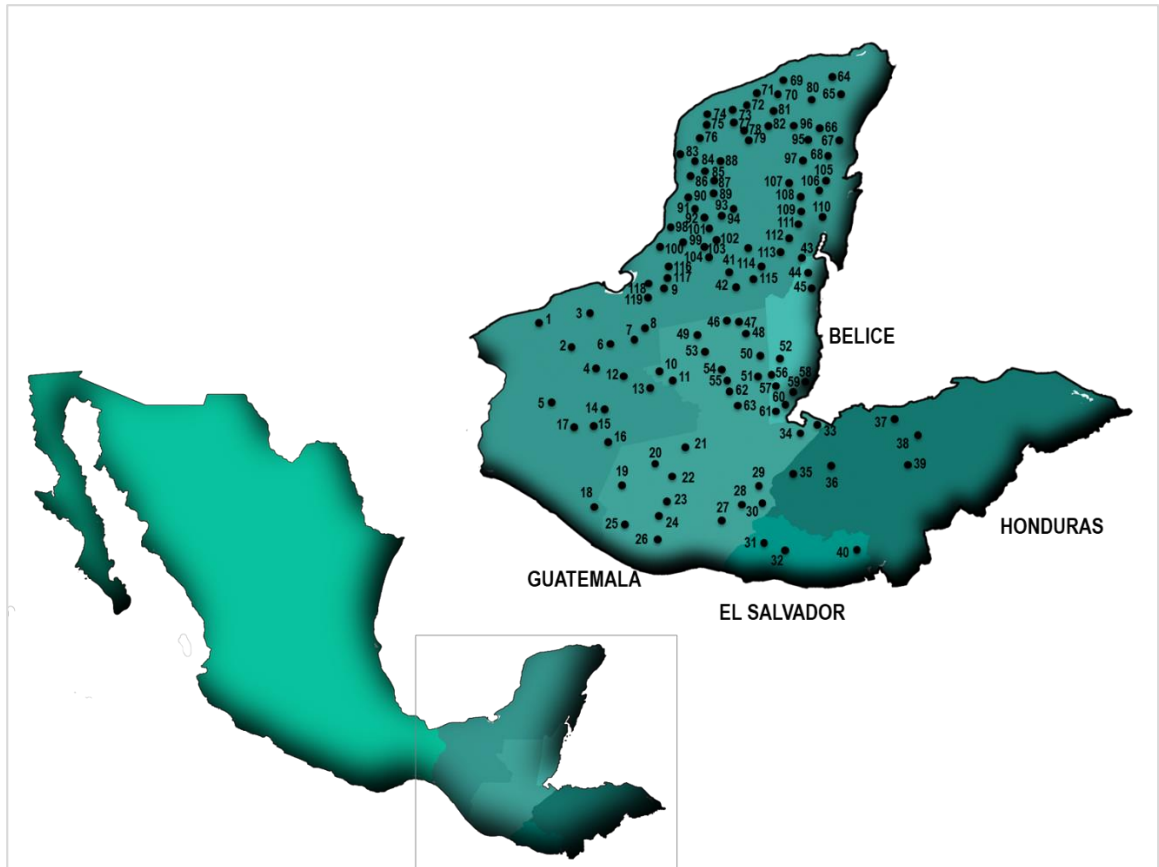


Figura 4. Localización geográfica de la Cultura Maya y sus principales asentamientos (los nombres de las zonas marcadas con números se encuentran en el Apéndice I) al Sur de México y en los países de América Central, Guatemala, Belice, El Salvador y Honduras.

En el territorio Maya se hablaron cerca de 44 lenguas diferentes, la agricultura era una actividad central en la vida de los mayas, combinada con las técnicas de caza y pesca¹⁸. El maíz fue la base de su alimentación, otros alimentos importantes fueron el cacao, el balché, la chaya, el chicle, la calabaza, el chile habanero, el frijol, la sal y la miel. Los materiales de las casas para los muros y techos eran de madera y palma, la vivienda podía estar formada por tres estructuras principales (dormitorios, cocina y bodega). La mayoría de la gente vestía sencillamente: las mujeres con el huipil o una falda y su manto y los hombres con una especie de calzón llamado patí. La nobleza utilizaba complicados atuendos bordados con plumas y gemas, calzaban sandalias de cuero y lucía grandes tocados de plumas, además de collares, pectorales y pesados cinturones con incrustaciones de nácar y piedras grabadas¹⁸. La deformación del cráneo por alargamiento se efectuaba mediante la

colocación de dos tablas, una en la frente y otra atrás y era practicada entre la primera semana de nacimiento y los tres años de edad¹⁸.

La sociedad maya estaba organizada sobre la base de una marcada estratificación social, a la cabeza se encontraba la nobleza y en orden jerárquico: el gobernante supremo de la provincia, los jefes locales de las poblaciones que conformaban las provincias, el comandante militar supremo, los administradores de los barrios, los delegados, los funcionarios encargados de las cuestiones sociales y ceremoniales, y finalmente la categoría más baja estaba conformada por los funcionarios, los sacerdotes, el supremo sacerdote y los mercaderes¹⁸.

1.5. DEFORMACIÓN CRANEAL INTENCIONAL

La deformación craneal intencional se ha practicado desde la época de los Neandertales aproximadamente ~40.000 años¹⁹. La práctica era común en todos los continentes, excepto en la Antártida, y el mejor ejemplo es Mesoamérica, donde culturas como la Olmeca, Zoque y Maya realizaban la deformación intencional craneal que era considerada como un indicador de jerarquía dentro de la estructura social de las poblaciones prehispánicas, siendo aún más importante si iba acompañada por el limado dental^{14,20} (Fig. 5a). Los principales tipos de deformación son el tabular oblicuo (Fig. 5b) y el tabular erecto (Fig. 5c), estos se clasificaron como perfecto o imperfecto, debido a la simetría de la deformación²⁰. La deformación craneal cambiaba dependiendo de las técnicas empleadas para realizarla, la temporalidad y el origen étnico de la población.

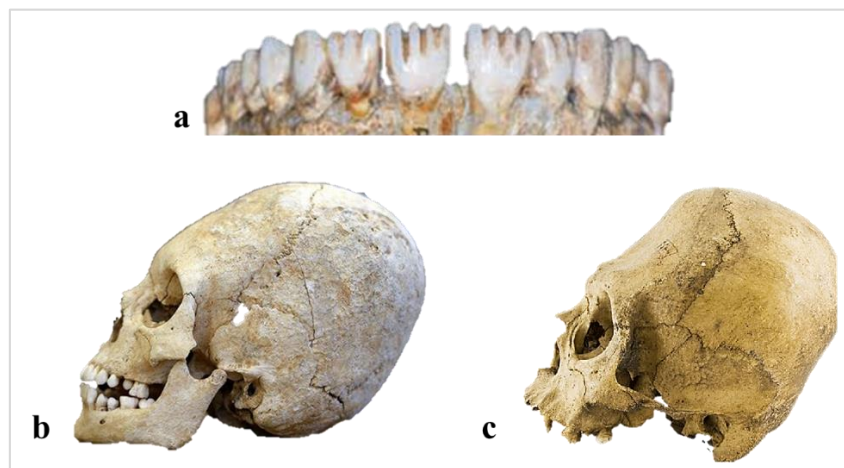


Figura 5. Tipos de deformación craneal intencional en las civilizaciones prehispánicas mesoamericanas. **(a)** Limado dental. **(b)** Deformación craneal intencional tabular oblicua. **(c)** Deformación craneal intencional tabular erecta.

1.6. DNA ANTIGUO (aDNA)

Se conoce como DNA antiguo (aDNA) a cualquier material genético recuperado después de la muerte, generalmente de especímenes arqueológicos o históricos^{21,22}. El estudio del aDNA consiste en la extracción y el análisis de secuencias de DNA a partir de restos óseos antiguos²³.

Los datos obtenidos a partir del aDNA se han usado para hacer inferencias sobre el modo y el tiempo de los procesos evolutivos, para reconstruir las características genotípicas de los grupos prehistóricos o que tienen algún interés antropológico y poder considerar los efectos relativos de la selección y la demografía en la alteración de las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones humanas²³⁻²⁵. Los datos de aDNA, constituyen el medio más directo de investigación de eventos genéticos y proporcionan profundidad en los análisis genéticos de la historia evolutiva humana²³; su análisis ha contribuido a la elucidación de las migraciones y parentesco entre los individuos y las poblaciones.

1.6.1. Estudio del aDNA

El estudio del aDNA, se lleva a cabo mediante el análisis del DNA mitocondrial (mtDNA) que es heredado únicamente por vía materna, todas las células eucariotas tienen un genoma mitocondrial multicopia independiente del genoma nuclear²⁶. El primer genoma mitocondrial humano secuenciado por primera vez fue en 1981 y confirmado dieciocho años después^{27,28}. Para el estudio del mtDNA de muestras antiguas se han utilizado diferentes técnicas entre ellas la PCR de punto final, que permite la amplificación de segmentos cortos de la Región Hipervariable I o II (RHV-I/RHV-II)²⁹, esto ha favorecido la estimación de patrones de evolución para tener una mejor comprensión de las especies extintas en relación con las modernas.

1.6.2. Limitaciones del estudio del aDNA

El aDNA proveniente de restos antiguos óseos, está sujeto a varias limitaciones en relación con el DNA moderno; el aDNA generalmente es menos abundante que el DNA moderno y puede verse afectado significativamente por contaminantes exógenos y procesos químicos^{18,20,27}. Actualmente el genoma más antiguo secuenciado relacionado con el humano ha sido el del Neanderthal encontrado en Sima de los Huesos, España con una edad de 400,000 años³⁰; una desventaja de la obtención del aDNA es la alta degradación y contaminación del material genético^{21,23}.

1.6.3. Secuenciación de Nueva Generación (NGS)

Actualmente existe una nueva tecnología de secuenciación llamada secuenciación de nueva generación (NGS), que permite obtener fragmentos más cortos de aproximadamente 50 pb, lo que favorece el análisis de aDNA y permite tener mayor cantidad de DNA y de mejor calidad, es económica y proporciona información más detallada sobre restos antiguos de importancia histórica, evolutiva y de enfermedades³¹⁻³³.

1.7. MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares, rodeados de membrana presentes en organismos eucariotas que van desde las levaduras hasta los mamíferos³⁴, tiene su propio DNA, su tamaño es de 0.5 a 1.0 μm de diámetro y se componen de cinco compartimentos que llevan a cabo funciones especializadas: la membrana mitocondrial externa, el espacio entre membrana (espacio entre la membrana externa e interna), la membrana mitocondrial interna, las crestas (formado por invaginaciones de la membrana interna) y la matriz (espacio dentro de la membrana interna)³⁵ (Fig. 6). Las mitocondrias son orgánulos que juegan un papel esencial en la producción de energía y en diversos procesos celulares como el metabolismo y la transducción de señales; además, están involucrados en el metabolismo de lípidos, aminoácidos y desempeñan papeles importantes en diversos procesos celulares tales como la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación celular^{34,36}. Las mitocondrias están organizadas en el retículo y una de sus principales funciones es la producción de adenosín trifosfato (ATP) que es la principal fuente de energía de los organismos vivos. La producción de ATP se lleva a cabo durante las reacciones de los ácidos tricarbóxicos y a través del sistema de transporte de electrones³⁵.

El transporte de electrones está compuesto por 5 complejos (I-V) y se encuentran en la membrana mitocondrial interna; los complejos reciben electrones en forma reducida de NADH y FADH₂; durante la etapa inicial, los electrones son transferidos a los complejos I al IV de la cadena transportadora de electrones y finalmente el O₂ sirve como aceptor de electrones en el complejo IV, en este proceso los protones son bombeados fuera de la matriz, en el espacio entre la membrana, generando un gradiente electroquímico que representa la fuerza motriz, que permite al complejo V generar ATP por la fosforilación de ADP. La combinación de estos dos últimos procesos se describe como la fosforilación oxidativa³⁵.

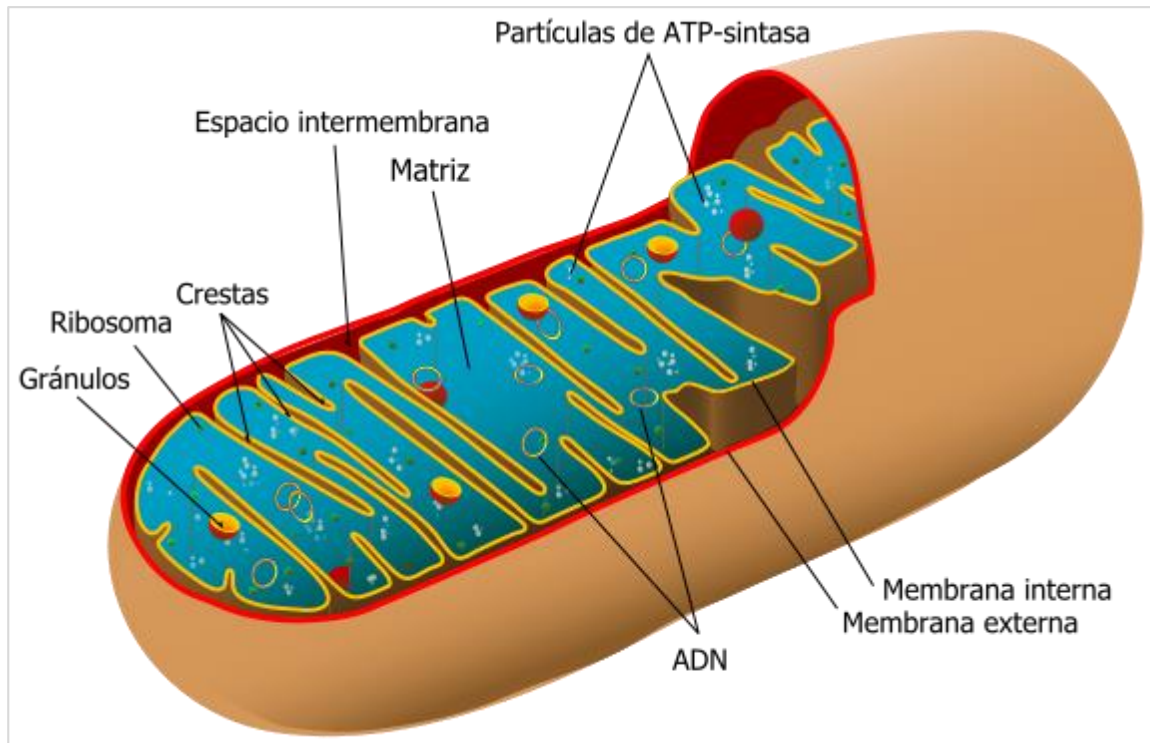


Figura 6. Estructura y composición morfológica de la mitocondria (imagen tomada del sitio web: https://es.wikipedia.org/wiki/Mitocondria#/media/File:Animal_mitochondrion_diagram_es.svg).

1.7.1. Características del genoma mitocondrial

La mayor parte del DNA de los seres humanos se empaqueta en los cromosomas dentro del núcleo, las mitocondrias poseen su propio DNA circular de doble hebra, por lo general se refiere como mtDNA, su tamaño es de 16569 pb, contiene 37 genes que codifican para 13 proteínas implicadas en el proceso de la fosforilación oxidativa, así como 2 rRNAs (12S y 16S) y 22 tRNAs que codifican para los genes esenciales para la síntesis de proteínas dentro de la mitocondria, tiene una región control no codificante de 1122 pb, en donde se encuentra la mayor cantidad de variantes que han dado lugar a la clasificación de haplogrupos. La región control se ha dividido en la RHV-I (16024-16383) y RHV-II (57-372)²⁶ (Fig. 7).

En las células de mamífero, el mtDNA se hereda exclusivamente a partir de la mitocondria del ovocito; este patrón de herencia se denomina generalmente como "herencia uniparental" y en este caso se le denomina "herencia materna"³⁶. Cuando el espermatozoide fecunda al óvulo penetra al núcleo y su cola la cual contiene las mitocondrias es destruida en el óvulo materno; por lo tanto, en el desarrollo del cigoto solo intervienen las mitocondrias contenidas en el óvulo^{34,37}.

Todas las proteínas necesarias para el correcto funcionamiento de las mitocondrias son codificadas por el genoma nuclear. En los últimos años se descubrió que las mitocondrias tienen un papel importante en el envejecimiento, isquemia, cáncer, enfermedades neurológicas y metabólicas^{34,38,39}.

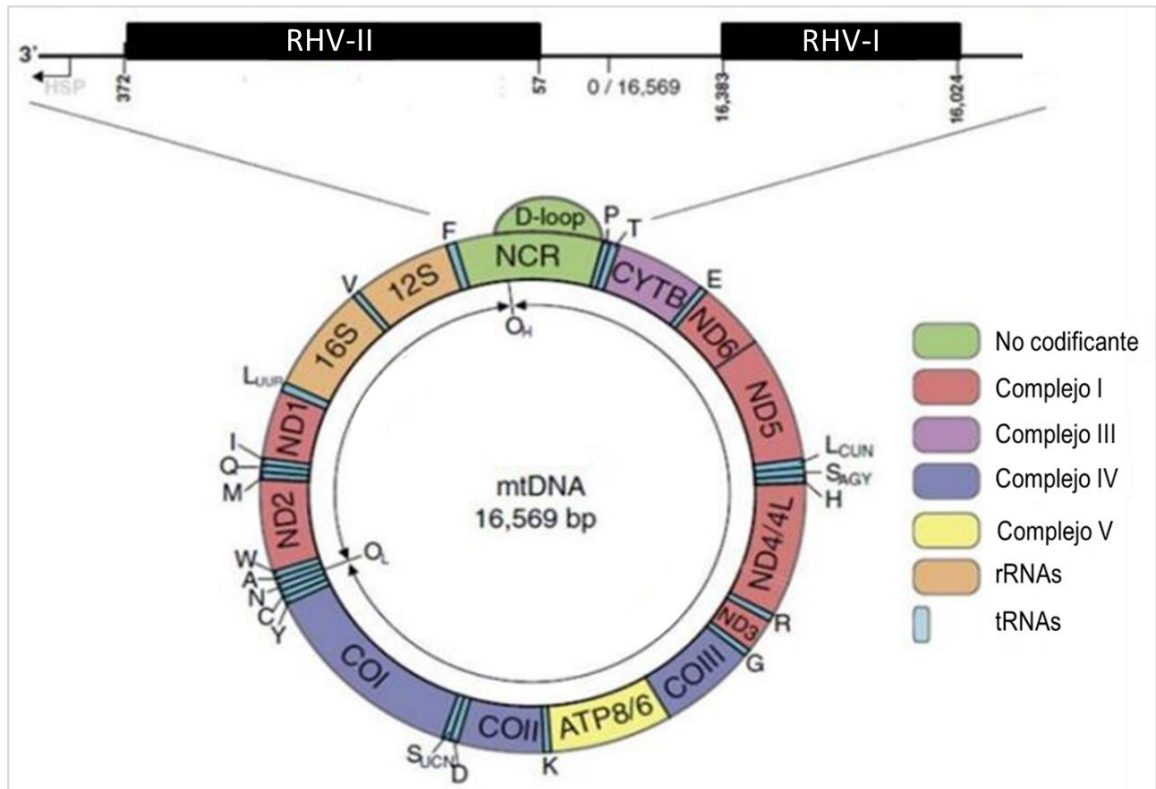


Figura 7. Estructura del Genoma Mitocondrial donde se muestra la región no codificante (RHV-I/RHV-II), los cinco complejos que están involucrados en el transporte de electrones, así como la localización de los 2 rRNAs y 22 tRNAs (Figura tomada del artículo Nicholls T. & Burger J, 2012.),

1.8. GENÉTICA DE POBLACIÓN

La región no codificante del genoma mitocondrial, conocida como región control o D-Loop, con un tamaño de 1122 pb, se caracteriza por su elevada tasa de mutación, diez veces mayor que en el genoma nuclear. La variabilidad en la región control se concentra básicamente la RHV-I y la RHV-II²².

El estudio del mtDNA desde el punto de vista genético resulta especialmente recomendado cuando se trabaja con muestras muy degradadas, como el aDNA, se calcula que una célula puede contener hasta un centenar de mitocondrias, y que dentro de cada mitocondria coexisten entre 1000 y 10000

copias del genoma mitocondrial, el elevado número de moléculas de mtDNA en la célula hace que su recuperación sea mucho más eficiente con respecto al DNA nuclear, el cual generalmente se encuentra escaso o degradado⁴⁰.

El mtDNA no sufre recombinación, por lo que la variación que presenta es el resultado de los cambios nucleotídicos que se originaron a través del tiempo, posee variantes conservadas en regiones codificantes y no codificantes que se han caracterizado y dieron origen a los llamados haplogrupos^{3,22,41}.

1.8.1. Haplogrupo

El haplogrupo es un conjunto de variantes comunes que se comparten dentro de un grupo y que ha dado lugar a una clasificación basada en marcadores genéticos específicos. Estas variantes consisten en cambios de un solo nucleótido y no presentan recombinación^{3,22,41}. El haplotipo es un grupo de variantes que son heredadas a cada individuo.

Los haplogrupos que llegaron a América de los nativos americanos se clasifican principalmente en cuatro linajes maternos fundadores de las poblaciones del Nuevo Mundo. El Linaje A se define por una ganancia de sitio HaeIII en el nucleótido 663 con respecto a la secuencia de referencia (Cambridge Reference Sequence)⁴², el Linaje B se define por la presencia de una deleción de 9 pb en la región intergénica entre el citocromo oxidasa II y el tRNA que codifica para la lisina, el Linaje C se define por una pérdida del sitio de restricción HincII en el nucleótido 13259 y una ganancia de sitio AluI en el nucleótido 13262 y el Linaje D se define por una pérdida del sitio de restricción AluI en el nucleótido 5176⁴²; relacionadas a estas variantes específicas para cada haplogrupo también se han observado variantes específicas en la región control⁴² que se muestra en la tabla 1. La RHV-I y RHV-II del mtDNA son las regiones genéticas primarias que los antropólogos moleculares utilizan para el análisis de las poblaciones antiguas, un beneficio es que estas regiones son relativamente cortas y han sido secuenciadas en su totalidad^{41,43}.

La evidencia arqueológica, lingüística y genética ha inferido que los primeros habitantes humanos del hemisferio occidental probablemente llegaron de Asia a través de una masa de tierra situada entre el noreste de Siberia y Alaska, llamada Beringia durante el último máximo glacial hace aproximadamente ~25000 a ~19000 años⁴¹.

Tabla 1. Variantes específicas en la región control para los cuatro haplogrupos fundadores de los nativos americanos (A, B, C y D).

HAPLOGRUPO	VARIANTE
A	m.16290C>T m.16319G>A
B	m.16189T>C
C	m.16327C>T
D	m.16362T>C

1.8.2. Distribución haplotípica en América

En las poblaciones prehispánicas mesoamericanas se han encontrado en alta frecuencia los haplogrupos A y C, mientras que los haplogrupos B y D se han identificado en baja frecuencia^{17,42,44}. El haplogrupo D1 se ha identificado con mayor frecuencia en poblaciones antiguas de Monte Verde en Sudamérica^{3,24,44,45} y en tres individuos mayas precolombinos de Palenque en Chiapas, Comalcalco y Sueños de Oro en Tabasco, México¹⁷.

1.9. PALEOPATOLOGÍA

La paleopatología es la rama del conocimiento que estudia la expresión de enfermedades que han tenido las poblaciones humanas antiguas⁴⁶. Actualmente, una de las enfermedades más comunes en México es la diabetes mellitus tipo 2 (DT2), que representa la segunda causa de mortalidad y aproximadamente el 9.4% de la población padece la enfermedad; es de interés conocer las variantes asociadas como factor de riesgo a esta enfermedad en individuos prehispánicos mediante la identificación de marcadores de susceptibilidad a la enfermedad⁴⁷.

1.9.1. Diabetes

La diabetes es una enfermedad compleja causada por la interacción de factores genéticos y ambientales como la dieta y los niveles de actividad física (epigenética). En los últimos años, se han estudiado variantes genéticas de riesgo o protección para la DT2 en diferentes poblaciones contemporáneas⁴⁸, incluidas las comunidades nativas mayas^{47,49}. Domínguez-Cruz et al. (2016) realizó estudios de asociación con DT2 en dos comunidades mayas contemporáneas de Yucatán, que es uno de los 5 estados en México con una tasa alta de diabetes. La proporción de la enfermedad

está asociada con variantes genéticas, la pregunta es si las poblaciones mayas prehispánicas tenían estas variantes asociadas a la DT2 y si la enfermedad en las poblaciones mayas contemporáneas está causada por factores ambientales además de las variantes heredadas por el mestizaje después de la conquista entre poblaciones prehispánicas y españolas.

1.9.2. Etiología de las enfermedades en civilizaciones prehispánicas

Las enfermedades mayas según sus creencias tenían diferentes orígenes; la etiología divina (castigo de los dioses), desobediencia a los padres, abuso sexual con parientes de sangre, hechizos o brujería causados por chamanes y aspectos de la naturaleza como el viento, las plantas y los cambios de temperatura⁵⁰. La medicina maya prehispánica se ha estudiado desde el contexto mágico-religioso en el que su cosmovisión estaba vinculada a la búsqueda del equilibrio personal y social, ya que se consideraba que el desequilibrio corporal causado por la enfermedad era una consecuencia de la mala conducta que alcanzó un desequilibrio cósmico.

En el códice Badiano y Florentino se describen los padecimientos de la diabetes por separado y los remedios herbolarios que usaban los Aztecas para contrarrestarlos, no existía el termino Diabetes como tal, pero se infiere que los síntomas eran característicos de esta enfermedad⁵¹. En el códice se describe como detectaban el incremento de azúcar en la sangre, la persona enferma orinaba cerca de un hormiguero, si las hormigas se acercaban a la orina se asumían que la persona tenía alto nivel de azúcar en el cuerpo⁵².

Hasta el momento no hay estudios enfocados en la paleopatología de las comunidades prehispánicas, en consecuencia, se propone el estudio de variantes genéticas asociadas como factor de riesgo a DT2 para contribuir con la identificación de marcadores genéticos en civilizaciones prehispánicas.

1.10. IDENTIFICACIÓN DE SEXO EN RESTOS ANTIGUOS

La identificación de sexo en individuos antiguos es importante ya que permite conocer aspectos de su cultura, estructura demográfica, prácticas religiosas, asociación de enfermedades e historia de las civilizaciones prehispánicas⁵³.

Actualmente existen tres métodos para determinar sexo en restos antiguos:

- ⊕ Criterio Antropométrico: Se basa en el análisis cualitativo de las características morfológicas de los huesos (cráneo, pelvis, vértebras, dientes y huesos largos)^{53–57}. La determinación del sexo usando este método es exitosa cuando el esqueleto está completo o es de un individuo adulto, sin embargo, cuando el esqueleto pertenece a un individuo joven o está fragmentado, la determinación del sexo no es precisa^{54,56}.
- ⊕ Prueba molecular de la amplificación del gen *AMELX/AMELY*: Se basa en la amplificación del gen *AMEL* en los cromosomas X y Y (*AMELX/AMELY*)^{54,56,58,59}, el locus *AMEL* tiene 2 genes homólogos, *AMELX* que se encuentra en el brazo corto distal del cromosoma X (Chr-X) (p22.1-p22.3) y *AMELY* ubicado cerca del centrómero del cromosoma Y (Chr-Y) (p11 .2). Tienen un 89% de homología y hay una eliminación de 6 pb en el tercer intrón de *AMELX* que no está presente en *AMELY*^{54,60,61}. La amplificación de otros genes como *DXYS156*, *SOX3*, *STS* y *TSPYL2*^{60,62} por PCR también se ha utilizado para determinar el sexo en restos antiguos. Sin embargo, la limitación de este método es la degradación del DNA en muestras antiguas que depende del contexto arqueológico^{54,63}.
- ⊕ Aproximación de la cuantificación del cromosoma X y Y por NGS: Recientemente, la identificación del sexo en restos humanos antiguos se ha determinado mediante la cuantificación de las secuencias que están alineadas con el Chr-Y y Chr-X, teniendo en cuenta que los individuos de sexo masculino tienen la mitad del material cromosómico X presente en individuos del sexo femenino^{56,64,65}, usando esta metodología la determinación del sexo se obtiene por la cuantificación de lecturas obtenidas por NGS, excluyendo las regiones homólogas entre ambos cromosomas^{56,64}. La limitación de esta aproximación es cuando la cobertura en relación con la secuencia de referencia de los cromosomas X y Y es baja.

Por esta razón se planteó el desarrollo de una nueva metodología basada en el análisis de genes específicos del Chr-Y para determinar sexo masculino en individuos antiguos.

1.11. CUEVA DE PUYIL

En el año 2007 un grupo de arqueólogos liderado por el arqueólogo Luis Alberto Martos-López descubrieron material arqueológico en una cueva localizada en medio de la selva, dentro de la montaña llamada San Felipe cerca de la localidad de Puxcatán, en el municipio de Tacotalpa en el estado de Tabasco en México (Fig. 8 y 9). La población de Puxcatán llama a la cueva “Puyil” que es una palabra del vocablo Chol que significa caracol, forma en la que se interpreta el interior de la

cueva. La comunidad actual de esta región realiza año con año una ceremonia en la cueva a fin de asegurar una buena cosecha por medio de los rituales practicados en este espacio sagrado.

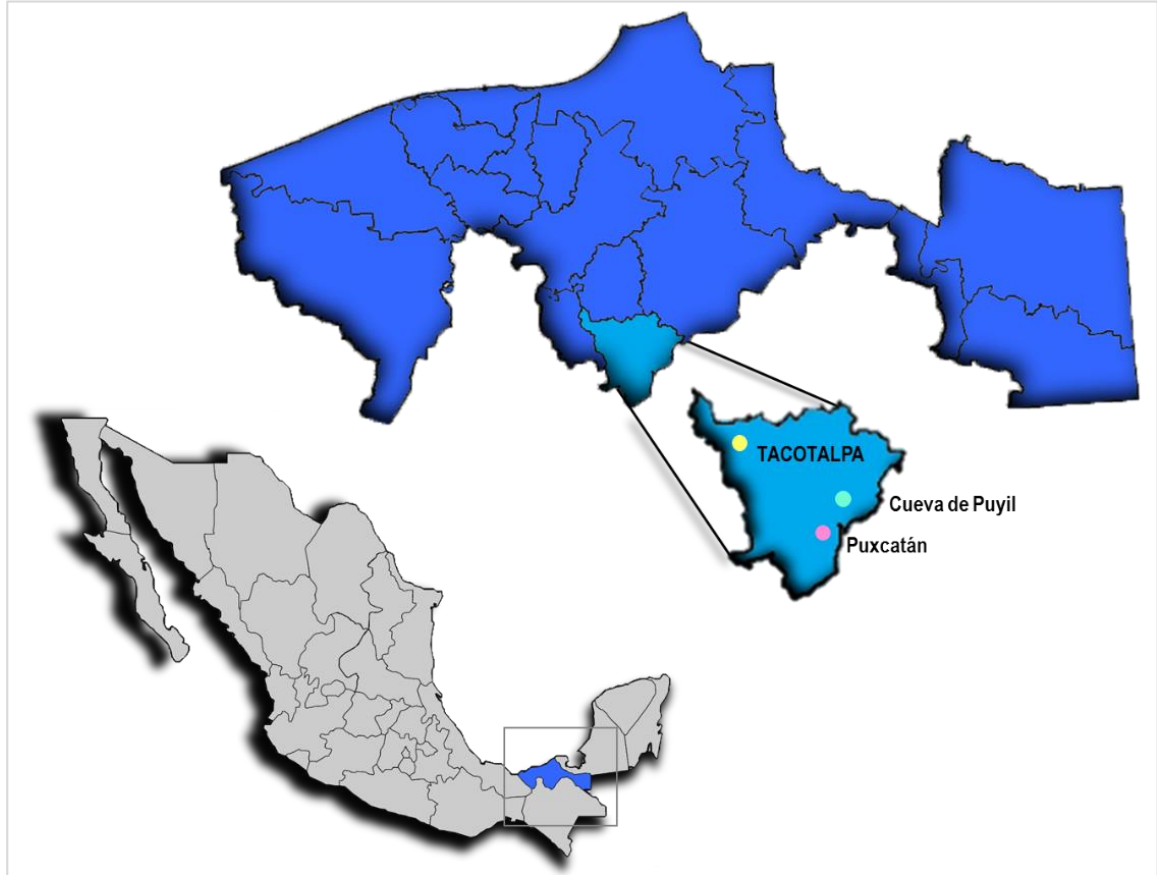


Figura 8. Localización geográfica de la Cueva de Puyil, ubicada dentro de la montaña de San Felipe, en la localidad de Puxcatán en el municipio de Tacotalpa en el estado de Tabasco en México, las coordenadas geográficas son 17°27'38.04"N y 92°39'28.5"O.

Las características geomorfológicas del interior de la cueva son a base de estructuras calcáreas: estalactitas y estalagmitas (Fig. 9), con abundantes sedimentos en el piso en altas condiciones de humedad. La cueva de Puyil se dividió en seis cámaras de acuerdo con la conformación de la bóveda, como las restricciones naturales; y cada cámara en secciones de acuerdo con la división creada por muros o estructuras calcáreas y el desnivel de piso.

La primera cámara tiene una dimensión de ~30x20x15 m, está ornamentada con grandes formaciones naturales: estalactitas y estalagmitas, para ingresar se debe descender ~10 m. En la segunda cámara se encuentra la manifestación más significativa de las actividades contemporáneas, donde se ubica una estructura natural calcárea de ~7 m de altura, semejante a una mazorca de maíz, lugar donde se hacen los rituales actualmente favoreciendo la actividad agrícola (Fig 10). Los restos

óseos se presentan desde la tercera cámara, se cree que fueron tomados de algún contexto más profundo y finalmente depositados en esta área.



Figura 9. Fotografías de la Cueva de Puyil. **(a y b)** Entrada a la cueva. **(c)** Representación de la formación de estalagmitas y estalactitas en la cámara 1. **(d)** Vestigios arqueológicos encontrados a partir de la cámara 4.

La cámara cuatro se divide en tres secciones escalonadas. En la primera se encontraron vestigios de osamentas con alto grado de deterioro y en la segunda sección aparecen osamentas en el interior de pequeñas oquedades formadas por el derrumbe de grandes estructuras calcáreas.

Siguiendo entre pasillos escarpados por esta cámara, se desciende por una rampa de ~2 m, a la tercera sección, donde se localizaron cinco cráneos sobre una superficie rocosa de ~3.5x2 m (Fig. 11); en esta sección se encontró una importante concentración de osamentas. En el piso hay una oquedad de ~3.5 m de profundidad, al fondo en dirección poniente y a nivel del piso se encuentra con otra pequeña oquedad lateral de ~0.5x0.3 m; se trata de un conducto de ~1.30 m de largo, por el que se llega en posición pecho a tierra, a un túnel de ~5x1.20x0.8 m, el cual se desarrolla, ligeramente en curva cargándose en dirección Sur y en descenso hasta desembocar en la cámara cinco, donde hay que descender hacia una rampa rocosa y fangosa de ~7x2.5 m, con orientación sur-poniente.

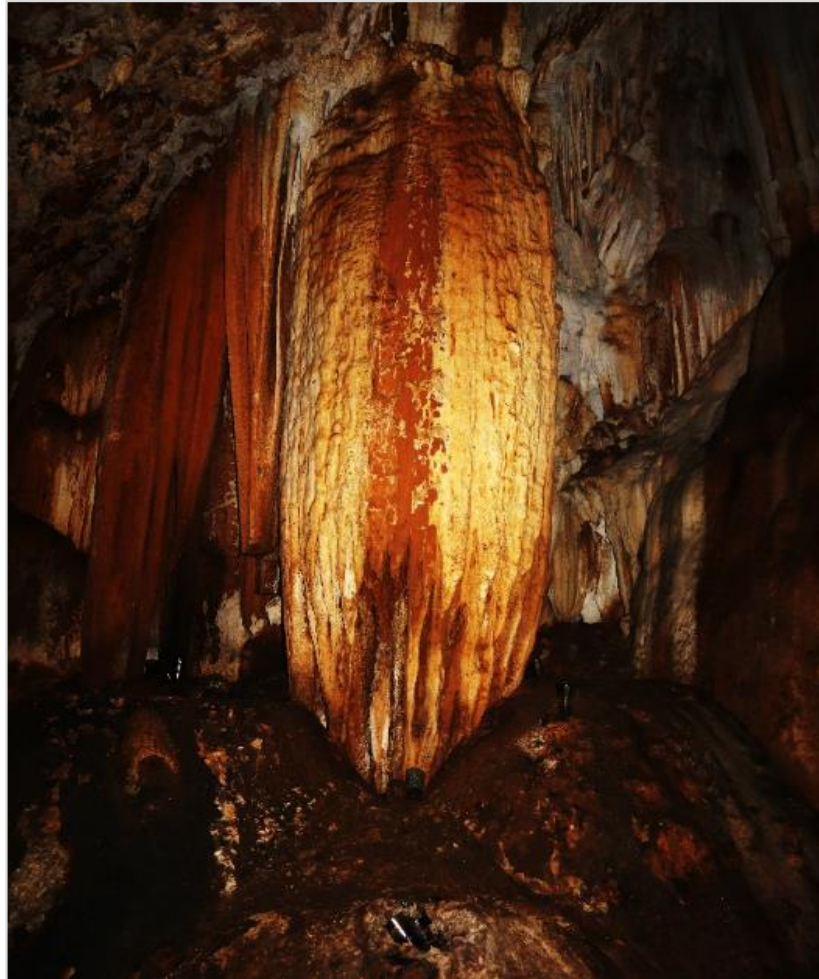


Figura 10. Estructura natural calcárea en la cámara dos de aproximadamente ~7m de altura en forma de mazorca de maíz, donde se encuentra evidencia de los rituales religiosos contemporáneos.

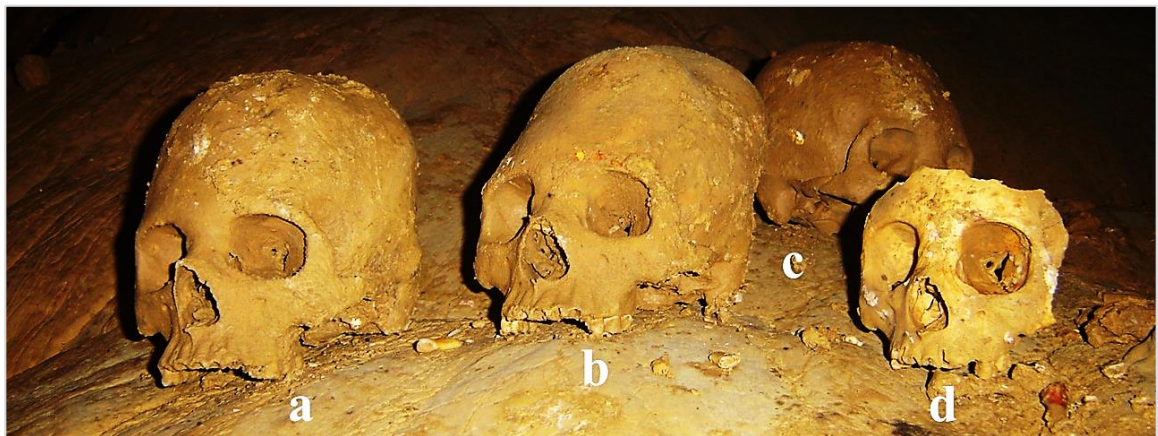


Figura 11. Vista interior de la tercera sección de la cámara cuatro. Cráneos incluidos en este estudio con deformación craneal intencional: (a) Muestra PUXTABMEX010, (b) Muestra PUXTABMEX009, (c) Muestra PUXTABMEX008 y (d) PUXTABMEX004.

La altura de la cámara 5 se va reduciendo hasta ~1.5 m, asimismo, el techo desciende de ~3.5 m hasta ~0.4 m de altura a lo largo de ~7 m, por donde se llega a la cámara seis; en la cámara 5 se encontraron 2 individuos. La cámara 6 tiene la longitud más amplia con orientación sur-norte de ~9 m, dividida en tres secciones, una vez cruzando la oquedad formada por el techo de bajo de la cámara 5 en dirección suroeste, se encontraron 9 individuos y 5 de ellos sin cráneo.

Debido a las condiciones de la cueva se tuvieron que hacer estudios para poder determinar la temporalidad de las muestras, su origen étnico y si fue un solo evento o varios eventos a través del tiempo.

Puxcatán estuvo habitada por zoques, grupo que no es de filiación Maya sino más bien guarda relación con culturas de la región de Oaxaca, antes de la conquista, mayas choles y chontales también habitaron este territorio, por esta razón, este hallazgo puede estar relacionado con ambas civilizaciones¹³.

Para contribuir al conocimiento de las poblaciones prehispánicas, este estudio se enfocó en analizar el origen genético materno de los individuos descubiertos en esta cueva, la distribución de haplogrupos, la relación genética con poblaciones nativas contemporáneas o antiguas del continente Americano, Asia y Beringia para reconstruir sus características genéticas y demográficas, conocer el origen étnico a través de la edad y el análisis cefalométrico, analizar variantes genéticas asociadas como factor de riesgo a DT2 e identificar el sexo masculino mediante el desarrollo de una nueva metodología utilizando técnicas de biología molecular y NGS en diez muestras de origen prehispánico encontradas en la Cueva de Puyil.

2. JUSTIFICACIÓN

La cultura Olmeca mesoamericana fue la primera civilización en establecerse en México, no obstante, su asentamiento es desconocido; se cree que la cultura Zoque y Maya surgió de los Olmecas, sin embargo, el conocimiento de sus orígenes hasta el momento es desconocido. En el año 2007 se encontraron vestigios de restos óseos antiguos en la Cueva de Puyil ubicada en la localidad de Puxcatán, en el municipio de Tacotalpa en el estado de Tabasco en México, sin saber su temporalidad, origen étnico, o si pertenecen a un evento o varios eventos a través del tiempo. En consecuencia, para contribuir a resolver algunas de estas incógnitas, en este estudio se evaluó el linaje materno a través del análisis del mtDNA, su distribución haplotípica, su temporalidad, la relación con otras civilizaciones antiguas y contemporáneas de América, Asia y Beringia, para elucidar su probable origen étnico. Así mismo, se buscaron las variantes genéticas asociadas como factor de riesgo a DT2 que se han descrito previamente en poblaciones indígenas contemporáneas. La identificación de sexo se realizó mediante el desarrollo de un nuevo método. Esto proporcionó información que nos permitió entender mejor la historia y las prácticas culturales realizadas a lo largo del tiempo de estas poblaciones.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Secuenciar el genoma completo de los restos óseos antiguos encontrados en la Cueva de Puyil con técnicas de NGS para identificar el haplogrupo/haplotipo, su distribución, así como, su relación con otras poblaciones contemporáneas y antiguas de América, Asia y Beringia. Determinar si existen variantes genéticas que hayan sido asociadas como factor de riesgo a DT2 y establecer un nuevo método para identificar el sexo masculino.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⊕ Determinar la época a la que pertenecen las muestras antiguas descubiertas en la Cueva de Puyil.
- ⊕ Identificar el tipo de deformación intencional de los cinco cráneos encontrados en la Cueva de Puyil.
- ⊕ Secuenciar el mtDNA y el genoma completo de los restos antiguos encontrados en la Cueva de Puyil con técnicas de secuenciación masiva (NGS) y Sanger.
- ⊕ Identificar el haplogrupo y el haplotipo de los restos antiguos descubiertos en la Cueva de Puyil.
- ⊕ Confirmar el haplogrupo obtenido por secuenciación a través de ensayos de discriminación alélica (PCR en Tiempo Real).
- ⊕ Realizar un estudio comparativo para conocer la distribución de haplogrupos y haplotipos en poblaciones nativas contemporáneas y antiguas usando un análisis de redes haplotípicas.
- ⊕ Identificar las variantes genéticas asociados como factor de riesgo a DT2 en las muestras antiguas encontradas en la Cueva de Puyil.
- ⊕ Identificar el sexo de los restos antiguos encontrados en la Cueva de Puyil.
- ⊕ Desarrollar un método para la identificación de sexo masculino mediante el análisis del genoma de los cromosomas X y Y para corroborar el sexo de las muestras de este estudio

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DESCRIPCIÓN DEL SITIO ARQUEOLÓGICO

Las diez muestras de estudio provenientes de la Cueva de Puyil, la cual se ha usado como Centro Ceremonial desde tiempos prehispánicos hasta nuestros días. Se localiza en la montaña de San Felipe, que pertenece a la localidad de Puxcatán en el municipio de Tacotalpa, al sur del estado de Tabasco en México (Fig. 8) con las coordenadas geográficas 17°27'38.04"N y 92°39'28.5"O. La cueva tiene una profundidad lineal de 175 m, está dividida en seis cámaras de acuerdo con la conformación de la bóveda y se encontraron ~40 restos óseos ubicados en las últimas tres cámaras (4, 5 y 6) (Fig. 12).

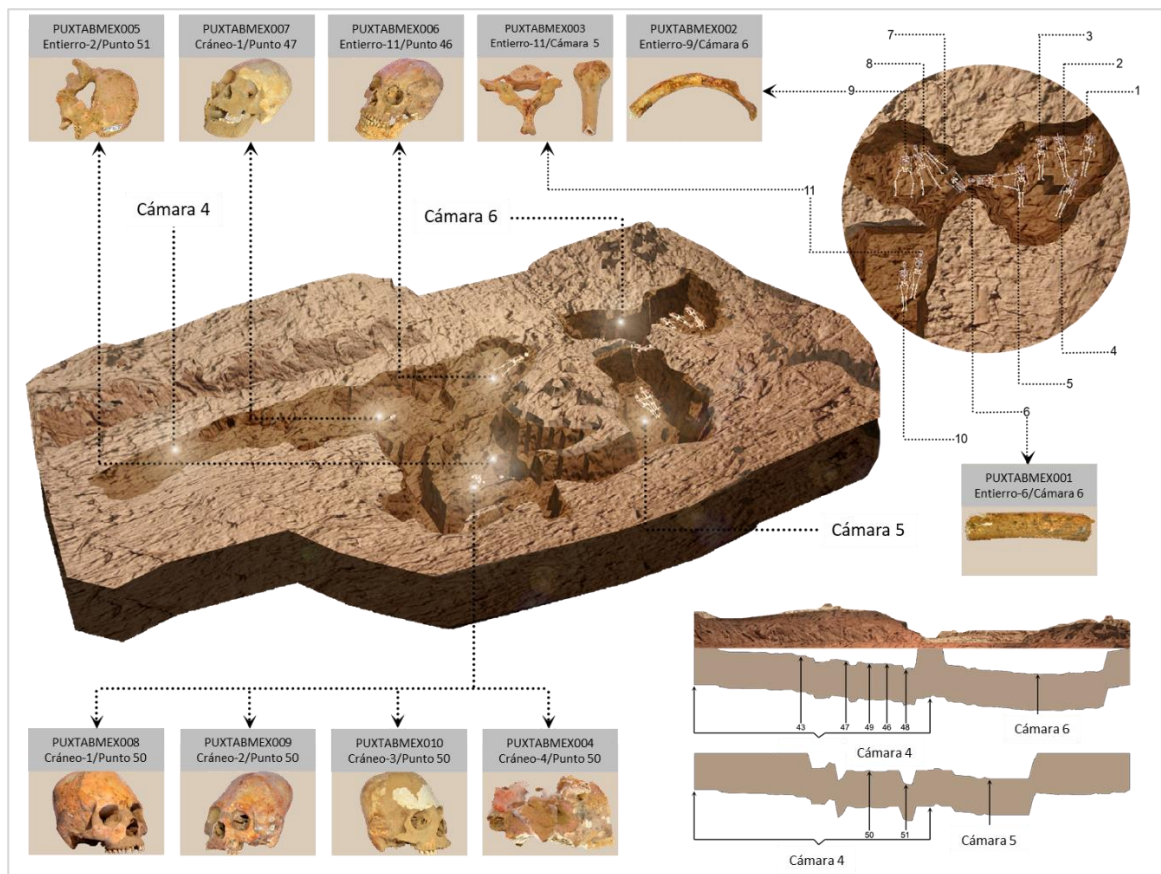


Figura 12. Mapa de las cámaras 4, 5 y 6 dentro de la Cueva de Puyil y la localización de las 10 muestras de estudio dentro de la cueva.

4.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS

El estudio de aDNA se llevó a cabo con diez muestras de diferentes individuos prehispánicos encontrados dentro de las cámaras 4, 5 y 6 en la Cueva de Puyil al sur de Tabasco, el levantamiento arqueológico se realizó en el año 2007 por un grupo de arqueólogos dirigidos por Luis Alberto Martos-López (Fig. 12 y Tabla 2). Debido a las condiciones climáticas y geológicas, los arqueólogos no han podido estimar la edad aproximada de las muestras, su origen étnico y si fue un evento o varios eventos a lo largo del tiempo.

Tabla 2. Identificación arqueológica de las diez muestras de estudio (PUXTABMEX001-PUXTABMEX010) encontradas en la Cueva de Puyil.

MUESTRA	CÁMARA	IDENTIFICACIÓN ARQUEOLÓGICA	TIPO DE HUESO
PUXTABMEX001	6	ENT-6/Cámara 6	Fémur
PUXTABMEX002	6	ENT-9/Cámara 6	Costilla izquierda
PUXTABMEX003	5	ENT-11/ Cámara 5	5ta o 6ta vértebra cervical
PUXTABMEX004	4	Cráneo-4/Punto 50	Cráneo temporal
PUXTABMEX005	4	Entierro-2/Punto 51	2da o 3ra vértebra lumbar
PUXTABMEX006	4	Entierro-11/Punto 46	Tercer molar-diente
PUXTABMEX007	4	Cráneo-1/Point 47	Hueso Mastoide
PUXTABMEX008	4	Cráneo-1/Punto 50	Hueso Mastoide
PUXTABMEX009	4	Cráneo-2/Punto 50	Hueso Mastoide
PUXTABMEX010	4	Cráneo-3/Punto 50	Hueso Mastoide

4.3. DATACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se dataron 7 muestras (PUXTABMEX001, PUXTABMEX002, PUXTABMEX004, PUXTABMEX006, PUXTABMEX007, PUXTABMEX009 y PUXTABMEX010) de los restos óseos encontrados en la Cueva de Puyil, fueron datados por la compañía Beta-Analytic Laboratory (Miami, Florida, USA).

4.4. ANÁLISIS CEFALOMÉTRICO

Se realizó el análisis cefalométrico de los cinco cráneos que presentaban deformación intencional craneal para corroborar el posible origen étnico y conocer las principales características morfológicas

de cada cráneo, las relaciones intercraneales (covariancia de estructuras) y el tipo de modelado cefálico intencional. Al mismo tiempo, con esta información se pudieron realizar análisis comparativos para conocer la variación entre individuos y origen étnico. Para el análisis morfológico se emplearon 14 marcas homólogas a los puntos craneométricos que abarcan los principales componentes del cráneo (región facial, neurocráneo y base). Las coordenadas de los puntos fueron adquiridas mediante un digitalizador MicroScribe G2X digitizer (Immersion Corporation Inc.) y posteriormente se utilizó el programa Rhinoceros 5.0⁶⁶. Se extrajo la información métrica lineal y angular a partir de transformaciones simples de la geometría de NURBS; a partir de los datos morfológicos craneales (medidas lineales y angulares) y se hizo el análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés). Los criterios tomados en cuenta para el trazado del polígono craneano, así como el protocolo de mediciones consideradas; quedaron acotados de acuerdo con las estrategias que ha sugerido Arturo Romano para el estudio de cráneos deformados⁶⁷ y para la caracterización de la variación normal craneal⁶⁸. El análisis se realizó en colaboración con el Dr. Carlos Serrano-Sánchez del Instituto de Investigaciones Antropológicas-UNAM y Jorge A. Gómez-Valdés del Posgrado de Antropología Física del Instituto Nacional de Antropología e Historia- INAH.

4.5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para eliminar el DNA exógeno de la superficie, cada muestra fue limpiada con 10% de Cloro concentrado, se incubó por 5 minutos, se enjuagó con agua destilada, se eliminó el sobrenadante, se incubó durante 5 minutos con agua destilada y de nuevo se enjuagó con agua destilada, las muestras se secaron a 37 °C durante toda la noche.

La extracción de aDNA, la amplificación por PCR punto final, la PCR en Tiempo Real y la construcción de las librerías se llevaron a cabo en un cuarto limpio con todos los lineamientos empleados para trabajar con restos antiguos^{69,70}. Los cuartos donde se llevaron a cabo los experimentos se limpiaron de manera rutinaria con cloro concentrado y con luz UV, todos los contenedores se limpian antes de colocarlos en el área de trabajo.

4.6. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de aDNA se llevó a cabo mediante dos métodos. El primero fue desarrollado en México utilizando la tecnología de perlas magnéticas (PerkinElmer, Baes-weiler, Waltham, Massachusetts, USA) en combinación con el Kit Prepito DNA Tissue10 (PerkinElmer, Baes-weiler, Waltham, Massachusetts, USA) usado por el equipo Prepito-D (PerkinElmer, Baes-weiler, Waltham, Massachusetts, USA) siguiendo las instrucciones de manufactura; el aDNA extraído se almaceno a -70 °C. El laboratorio tiene una base de datos que contiene secuencias de la región control del mtDNA para todo el personal que trabaja y que ha estado en contacto con los restos óseos antiguos, se utilizó un control negativo sin DNA durante todo el proceso. El segundo método se llevó a cabo en Alemania⁷¹ usando el Kit High Pure Viral Nucleotict Acid (Roche), después del pretratamiento de las muestras, la muestra pulverizada se incubo a 37 °C, en rotación durante toda la noche con el Buffer de extracción (EDTA 0.45 M, pH 8 (Life Technologies) & Proteínasa K, 0.25 mg/ml (Sigma)), la mezcla se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril, luego se siguieron las instrucciones de manufactura del Kit High Pure Viral Nucleotict Acid (Roche), se eluyó en 50 µl de Buffer TE y se almacenó a -20 °C, se usaron dos controles negativos durante todo el proceso. Los controles negativos fueron: todos los reactivos sin aDNA y todos los reactivos más agua, sin aDNA.

4.7. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA RHV-I

La amplificación de un fragmento de 211 pb de la región RHV-I del nucleótido 16190 al 16401 se obtuvo con los primers F_16190-R_161401, usando el protocolo de manufactura de la enzima Phusion Hot Start II Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Las condiciones de la reacción de PCR para 35 ciclos fueron: 98 °C (30 s), 98 °C (10 s), 60 °C (30 s), 72 °C (20 s) y 72 °C (10 min); este fragmento fue secuenciado por ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

F_16190 (5'- TACTTGACCACCTGTAGTAC-3')⁷²

R_16401 (5'- TGATTTACGGAGGATGGTG-3')⁷²

Para determinar la calidad del aDNA antes de construir las librerías se realizó la amplificación de un fragmento de la RHV-II con los primers F_00120-R_00287 y de un fragmento de la RHV-I con los primers F_16106-R_16256 obteniendo un fragmento de 167 pb y 150 pb respectivamente. Se usó el protocolo descrito por la compañía manufacturera para la enzima AccuPrime Pfx DNA Polimerase

(Thermo Fisher Scientific). Las condiciones de la reacción de PCR para 42 ciclos fueron: 94 °C (10 min), 94 °C (30 s), 60 °C (30 s), 72 °C (30 s) y 72 °C (10 min).

F_00120 (5'-CGCAGTATCTGTCTTTGATT-3')⁷³

R_00287 (5'-TTGTTATGATGTCTGTGTGG-3')⁷³

F_16106 (5'-GCCAGCCACCATGAATATTGT-3')⁷³

R_16256 (5'-GCTTTGGAGTTGCAGTTGATGTGT-3')⁷³

4.8. PREPARACIÓN DE LAS LIBRERÍAS

Las librerías se prepararon sin tratamiento y con tratamiento usando la enzima Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) para reparar el DNA, removiendo la desaminación de las citosinas siguiendo el protocolo descrito por Meyer y Kircher 2010⁷⁴.

4.8.1. Tratamiento con UDG

Para reparar el DNA se hace una mezcla de reacción en donde se adicionaron 20 µl de aDNA templado, 5 µl de NEB Buffer 2 (10X) (New England Biolabs), 0.6 µl de dNTPs (25 mM), 0.5 µl de BSA (25 mg/ml), 0.5 µl de ATP (10 mM), 2 µl de T4 PNK (Thermo Fisher Scientific), 3 µl de USER Enzyme (New England Biolabs) y 18.4 µl de H₂O para un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó durante 3 horas a 37 °C a 300 rpm, posteriormente se adicionaron 2 µl de T4 DNA Polimerasa (Thermo Fisher Scientific), se incubó a 25 °C por 30 min, después de la incubación se inactivó la T4 DNA Polimerasa por 5 min a 10 °C, y finalmente se purificó la reacción usando el protocolo de manufactura del Kit MinElute Purification (Qiagen) y se eluyó en un volumen final de 18 µl.

4.8.2. Ligación de los Adaptadores

A los 18 µl del DNA del paso anterior, se le adicionó 20 µl de Quick Ligasa Buffer (2X) (New England Biolabs) y 1 µl de Quick Ligasa (New England Biolabs) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Se purificó la reacción usando el protocolo de manufactura del Kit MinElute Purification (Qiagen) y se eluyó en un volumen final de 20 µl.

4.8.3. Rellenar

A los 20 µl del paso anterior, se le adicionaron 4 µl de ThermoPol Buffer (New England Biolabs), 0.2 µl de dNTPs (25 mM), 2 µl de Bsm DNA Polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y 13.8 µL de H₂O, y se incubo a 37 °C por 20 minutos; la enzima se inactivo a 80 °C por 20 min y se almaceno a -20 °C hasta el siguiente paso (Indexing-PCR).

4.8.4. Indexing PCR

A 10 µl de DNA del paso anterior, se le adicionaron 5 µl de Pfu Buffer (10 X), 0.4 µl de dNTPs (25 mM), 1 µl de Pfu Polimerasa, 30.6 µl de H₂O y 1.5 µl de cada adaptador (P5 y P7) (10 mM) para un volumen final de 50 µl. Finalmente se lleva a cabo la reacción de PCR y el amplicón se purificó usando el protocolo de manufactura del Kit MinElute Purification (Qiagen) y se eluyó en un volumen final de 50 µl.

4.8.5. Reamplificación de las librerías

Para concentrar el DNA se reamplificaron las librerías usando 5 µl de DNA del producto de la purificación del paso anterior, 5 µl de AccuPrimer Reaction Mix (10 X) (Invitrogen), 0.50 µl de AccuPrimer Pfx Polimerasa (Invitrogen), 0.15 µl de cada adaptador (P5 y P7) (0.3 µM) y 39.20 µl de H₂O, la reacción de PCR se llevó a cabo y el DNA se purifico usando el protocolo de manufactura del Kit MinElute Purification (Qiagen), y el DNA se concentró en un volumen final de 50 µl.

4.8.6. Cuantificación de las librerías y Secuenciación de Nueva Generación

Las librerías se cuantificaron con el equipo Agilent Bioanalyzer DNA 100 chip (Agilent). La secuenciación masiva se llevó a cabo utilizando la plataforma de Illumina (Kiel University & Max Plank Institute for the Science of Human History, Alemania).

4.9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO NGS

El análisis bioinformático se llevó a cabo usando los softwares: FASTQC⁷⁵ para conocer la calidad de la secuencia; bowTie²⁷⁶ para el alineamiento con la secuencia de referencia, Samtools-RMdup^{77,78} para remover los fragmentos duplicados y finalmente el software IGV^{79,80} se usó para visualizar el alineamiento. Se siguió la pipeline Eager⁸¹.

4.10. CLASIFICACIÓN DE HAPLOGRUPOS

Para determinar la clasificación de haplogrupos se tomaron los criterios de Starikovskaya (2005)⁸², Achilli (2008)⁸³, Derenko (2010)⁸⁴, Gómez-Carballa (2015)⁸⁵, Kumar (2011)⁴¹ y Rieux (2014)⁸⁶. Los polimorfismos se evaluaron mediante el análisis de secuencias con los softwares BioEdit 7.2.1⁸⁷ e IGV^{79,80}, después se confirmaron por Mitomaster^{88,89} y HaploGrep 2^{90,91}.

4.11. CONFIRMACIÓN DE LOS HAPLOGUPOS POR PCR EN TIEMPO REAL

Para confirmar el haplogrupo de las muestras se realizó un ensayo por triplicado de genotipificación por PCR en Tiempo Real usando las sondas TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific), para el diagnóstico de los marcadores moleculares del haplogrupos A (m.663A>G), C (m.13263A>G) y D (m.5178C>A).

4.12. REDES HAPLOTÍPICAS

Se construyeron Networks Filogenéticas usando el software Network 5.0.0.1⁹²⁻⁹⁴, se empleó una región del mtDNA de 346 pb del nucleótido 16224 al 16569 para el haplogrupo A; una región de 346 pb del nucleótido 16224 al 16569 para el haplogrupo C y una región de 508 pb del nucleótido 16064 al 16569 para el haplogrupo D. Para este análisis se utilizaron 992 secuencias de poblaciones nativas contemporáneas de América, Asia y Beringia, así como secuencias antiguas de Perú, Chile y Cuba.

4.13. CLASIFICACIÓN DE LAS VARIANTES ASOCIADAS A DIABETES COMO FACTOR DE RIESGO

Para este estudio se seleccionaron 18 genes nucleares con 48 variantes⁴⁷ (Tabla 3) y tres variantes mitocondriales m.3243A>G, m.16189T>C y m.16519T>C⁹⁵ clasificadas previamente como factor de riesgo en DT2 en poblaciones contemporáneas mexicana y asiática⁹⁶ se buscaron en las muestras prehispanicas encontradas en la Cueva de Puyil usando el alineamiento con la secuencia de referencia CRs_human_hg38⁹⁷ visualizado con el software IGV^{79,80}.

4.14. CONFIRMACIÓN DE LA VARIANTE ASOCIADA A DIABETES POR PCR EN TIEMPO REAL

Para confirmar la presencia del polimorfismo m.16519T>C que se ha asociado previamente en diabetes, enfermedades de desorden metabólico y cáncer de páncreas^{98,99}, se diseñó la sonda específica TaqMan® (Fig. 13) para corroborar el cambio nucleotídico por PCR en Tiempo Real usando el protocolo de manufactura TaqMan® SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific).

```
5'AACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAACTCCAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCCTAACAGTACATAGTAC
ATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTTGACCACCATCCT
CCGTGAAATCAATATCCCGCACAAAGAGTGCTACTCTCCTCGTCCGGGCCATAACACTTGGGGGTAGCTAAAGTAACTGTATCCGACATCTGG
TTCCTACTTCAGGG[T/C]CATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCCCTTAAATAAGACATCAGATGGATCACAGTCTATCACCCATTAAACCAC
TCACGGGAGCTCTCCATGCATTTGGTATTTTGTCTGGGGGTATGCACGCGATAGCATTGCGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCCCTATGTCGCA
GTATCTGTCTTTGATTCTGCCTCATCCTATTATTTATCGCACCTACGTTCAATATTACAGGGCAACATACTTACTAAAGTGTGTTAATTAATTAATG
CTTGTAGGACATAATAATAACAATTGAAT3'
```

Figura 13. Diseño de la sonda en File Builder 3.1 para determinar la variante m.16519T>C por PCR en Tiempo Real.

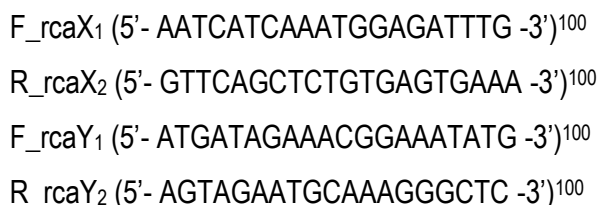
Tabla 3. Clasificación de los 18 genes y 48 variantes el DNA nuclear asociados como factor de riesgo a DT2 encontrados en población mexicana y asiática.

GEN	CROMOSOMA	TAMAÑO (pb)	VARIANTE
PPARG	3	12,287,368-12,471,013	rs1,801,282/Chr3-12,351,626
IGF2PB2	3	185,643,131-185,825,056	rs4,402,960/Chr3-185,793,899
WFS1	4	6,200,368-6,303,265	rs6,446,482/Chr4-6,293,966 rs10,010,131/Chr4-6,291,188
PGC1-α	4	23,755,044-24,472,771	rs8,192,678/Chr4-23,814,039
CDKAL1	6	20,534,457-21,232,404	rs10,946,398/Chr6-20,660,803 rs7,754,840/Chr6-20,661,019
VEGFA	6	43,770,184-43,786,487	rs2,010,963/Chr6-43,770,613 rs699,947/Chr6-43,768,652
SLC30A8	8	116,950,180-117,176,714	rs11558471/Chr-8117,173,494 rs13,266,634/Chr-8117,172,544
CDKN2A/2B	9	21,967,752-21,995,301	rs10,811,661/Chr9-22,134,095
CDC123/CAMK1	10	12,195,962-12,250,590	rs12,779,790/Chr10-12,286,011
SIRT1	10	67,884,662-67,918,390	rs7,896,005/Chr10-67,891,367
HHEX	10	92,689,924-92,695,651	rs1,111,875/Chr10-92,703,125 rs5,015,480/Chr10-92,705,802 rs7,923,837/Chr10-92,722,160
ADRA2A	10	111,077,032-111,080,907	rs553,668/Chr10-111,079,821
TCF7L2	10	112,950,219-113,167,678	rs4,506,565/Chr10-112,996,282 rs12,243,326/Chr10-113,029,056 rs7,903,146/Chr10-112,998,590 rs12,255,372/Chr10-113,049,143

KCNQ1	11	2,444,991-2,849,110	rs2,237,892/Chr11-2,818,521
LOC387761	11	42,165,869-42,232,128	rs7,480,010/Chr11-42,225,168
UCP2	11	73,974,667-73,983,307	rs659,366/Chr11-73,983,709
			rs3781907/Chr11-74,005,424
TPS3	17	7,661,779-7,687,550	rs1,042,522/Chr17-7,676,154
HNF4A	20	44,355,700-44,434,596	rs1,800,961/Chr20-44,413,724

4.15. DETERMINACIÓN DEL SEXO POR LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE AMELOGENINA

Para determinar el sexo mediante la amplificación por PCR punto final del gen *AMELX/AMELY* que es un gen que codifica para una proteína de la matriz extracelular que está relacionada con la organización de la estructura del esmalte dental, se usaron los primers F_rcaX₁-R_rcaX₂ obteniendo un fragmento de 130 pb para el Chr-X y los primers F_rcaY₁-R_rcaY₂ obteniendo un fragmento de 170 pb para el Chr-Y. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando el protocolo de manufactura de la enzima Phusion Hot Start II Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Las condiciones de la reacción de PCR para 35 ciclos fueron: 98 °C (30 s), 98 °C (10 s), 52 °C (30 s), 72 °C (20 s) y 72 °C (10 min).



4.16. ANÁLISIS DEL CROMOSOMA X y Y PARA IDENTIFICAR EL SEXO MASCULINO

La región no homóloga entre los cromosomas X y Y de la secuencia de referencia CRs_human_hg38/Chr Y (NC_000024.10)¹⁰¹ se analizó con el software IGV^{79,80} para buscar regiones específicas del Chr-Y. La tabla 4 muestra las secuencias identificadas de los siguientes 15 genes: *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, *TTY22*, *USP9Y*, *UTY*, *NLGN4Y*, *TTY14*, *FAM41AY1*, *AC007359.1*, *TTY4*, *PBY2B*, *DAZ1*, *DAZ3* y *DAZ4*. Las secuencias se clasificaron en 3 grupos: 1) la secuencia estaba presente solo en el Chr-Y; 2) las secuencias tuvieron similitud con el Chr-X; y 3) la secuencia también se identificó en los cromosomas autosómicos.

Tabla 4. Genes que se analizaron para la detección de sexo. Descripción de los 15 genes del Chr-Y utilizados para seleccionar secuencias específicas que permiten identificar el sexo masculino.

*Chr-Y Gen	Secuencia	Tamaño de Secuencia (pb)	Cobertura del Chr-X (%)	**Chr's Autosomales
TTY7 6449468-6457906 8439 pb	6453472-6453552	81	0	0
	6457811-6457861	51	0	0
TSPY3 9398421-9401223 2803 pb	9712721-9712755	35	0	0
	9340012-9340052	41	0	0
	9338261-9338286	26	0	0
TTY2 9736286-9758476 22191 pb	9738350-9738414	65	0	0
	9740557-9740591	35	0	0
TTY22 9801153-9813245 12093 pb	9811090-9811129	40	0	0
	9811192-9811267	76	0	0
USP9Y 12701231-12860844 159614 pb	12761218-12761250	33	100.0% (33)	0
	12852196-12852244	49	95.91% (47)	0
	12783154-12783189	36	51.28% (20)	0
UTY 13233920-13480673 246754 pb	13283351-13283407	57	85.96% (49)	0
	13356296-13356423	128	89.06% (114)	0
	13479887-13479942	56	42.86% (24)	0
	13378902-13378976	75	76.00% (57)	0
NLGN4Y 14522573-14845650 323043 pb	14564733-14564782	50	90.00% (45)	0
	14641102-14641191	90	92.22% (83)	0
	14530587-14530660	74	85.14% (63)	0
TTY14 18872501-19077547 205047 pb	14602714-14602806	93	43.01% (40)	0
	18993204-18993243	40	82.50% (33)	0
	19040591-19040663	73	89.04% (65)	0
	19051191-19051266	76	71.05% (54)	0
FAM41AY1 17500958-17516742 15785 pb	19076468-19076542	75	28.00% (21)	0
	18390242-18390268	27	0	5 y 16
	17514463-17514535	73	0	1, 3, 4, 9 y 18
AC007359.1 22100814-22147484 46671 bases	18391477-18391549	73	0	1, 3, 4, 9 y 18
	22122477-22122552	76	0	7, 9, 16 y 17
	22108467-22108519	53	0	7, 11 y 17
	22477887-22477939	53	0	7, 11 y 17
TTY4 22936455-22973284 36830 pb	22102367-22102415	49	0	7, 12 y 17
	22960559-22960618	60	0	2, 7, 8 y 19
	24586517-24586573	57	0	7 y 8
	24587660-24587731	72	0	7, 8, 16 y 19
	25070310-25070384	75	0	7-9, 14, 17 y 20

PBY2B 24607560-24639207 31648 pb	23005338-23005470	133	0	7 y 8
	24619544-24619592	49	0	21 y 2
	24622023-24622064	42	0	8
	23000633-23000734	102	0	7, 8 y 19
DAZ1 23129355-23199123 69769 pb	23139613-23139688	76	0	3 y 4
DAZ3 24763069-24813505 50437 pb	23267233-23267285	53	0	3 y 8
	24773336-24773411	76	0	3, 7 y 4
	23257864-23257932	69	0	3
	24771932-24772044	113	0	1, 7 y 10
DAZ4 24833800-24907040 73241 pb	24835630-24835705	76	0	2 y 3
	24896627-24896702	76	0	2, 7, 8 y 12
	24851394-24851450	57	0	3

*: Localización en el genoma GRCh38.p12. **: Se refiere a la secuencia cubierta en porcentaje bajo en los cromosomas autosomales.

4.17. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO MASCULINO USANDO MARCADORES

Para demostrar que la región seleccionada es específica para individuos de sexo masculino, se diseñaron primers específicos para las regiones seleccionadas, estos fueron para el gen *TTY7* (F_TTY7-R_TTY7) y tener un amplicón de 140 pb, para el gen *TSPY3* (F_TSPY3-R_TSPY3) y tener un amplicón de 121 pb, para el gen *TTY22* (F_TTY22-R_TTY22) y tener un amplicón de 124 pb y para el gen *TTY2* (TTY2-R_TTY2) y tener un amplicón de 133 pb. La amplificación por PCR se llevó a cabo usando el protocolo de manufactura de la enzima Phusion Hot Start II Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Las condiciones de la reacción de PCR para 35 ciclos fueron: 98 °C (30 s), 98 °C (10 s), Tm (30 s), 72 °C (20 s) y 72 °C (10 min). El set de primers por gen se probó en las muestras prehispánicas encontradas en la Cueva de Puyil por triplicado.

F_TTY7 (5'-CTGAGGCTGTGTGTTTGTGC-3')

R_TTY7 (5'-CCTGGGAGTTGTAGGGTTGA-3')

F_TSPY3 (5'-CACAAATGGGGAAGGGATA-3')

R_TSPY3 (5'-ACAACCTGGGAGTCCCCTAGA-3')

F_TTY22 (5'-GGGGAGTGATGTAGCTGTGG-3')

R_TTY22 (5'-TTTTTGGTCTTTTCATAAACATCAT-3')

F_TTY2 (5'-AGAACCCTCAACGACACACC-3')

5. RESULTADOS

5.1. DATACIÓN POR ^{14}C

Se dataron siete muestras por ^{14}C , tres muestras (PUXTABMEX004, PUXTABMEX006 y PUXTABMEX009) pertenecen al periodo Arcaico, una muestra (PUXTABMEX001) al periodo Clásico-Medio y tres muestras al periodo Clásico-Tardío (PUXTABMEX002, PUXTABMEX007 y PUXTABMEX010) como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Datación por ^{14}C de las muestras de estudio, mostrando el periodo histórico al que pertenecen.

MUESTRA	PERIODO HISTÓRICO
PUXTABMEX001	Clásico-Medio
PUXTABMEX002	Clásico-Tardío
PUXTABMEX003	ND
PUXTABMEX004	Arcaico
PUXTABMEX005	ND
PUXTABMEX006	Arcaico
PUXTABMEX007	Clásico-Tardío
PUXTABMEX008	ND
PUXTABMEX009	Arcaico
PUXTABMEX010	Clásico-Tardío

ND: No Determinada

5.2. ANÁLISIS CEFALOMÉTRICO

Se realizó el análisis morfológico de los cráneos (PUXTABMEX006-PUXTABMEX010), usando 14 marcas (landmarks) homólogos a los puntos craneométricos tradicionales que abarcan los principales componentes del cráneo. Para reducir la dimensionalidad de las variables y analizar conjuntamente los cambios de la morfología craneal se hizo un análisis de componentes principales (PCA) que presentó el 83.4% de varianza original de la morfología craneal, donde los valores positivos de la primera componente PCA1 ubican a los cráneos PUXTABMEX006 y PUXTABMEX007 con menor oblicuidad, mayor altura y menor longitud, mientras que hacia los valores negativos se ubican los cráneos PUXTABMEX008, PUXTABMEX009 y PUXTABMEX010 con mayor oblicuidad y largura neurocraneal, menor altura y protrusión facial. En la segunda componente PCA2 con 21.8% se cuantifica un cambio relacionado a la variación de la oblicuidad

frontal que se encontró en las muestras PUXTABMEX007 y PUXTABMEX009. El estudio morfoscópico y craneotrigométrico permitió establecer el tipo de deformación craneal.

5.3. AMPLIFICACIÓN DE LA RHV-I y RHV-II

Se amplificó un fragmento de la RHV-I del nucleótido 16190-16401 obteniendo un fragmento de 211 pb para las diez muestras de estudio (PUXTABMEX001-PUXTABMEX010) (Fig. 14).

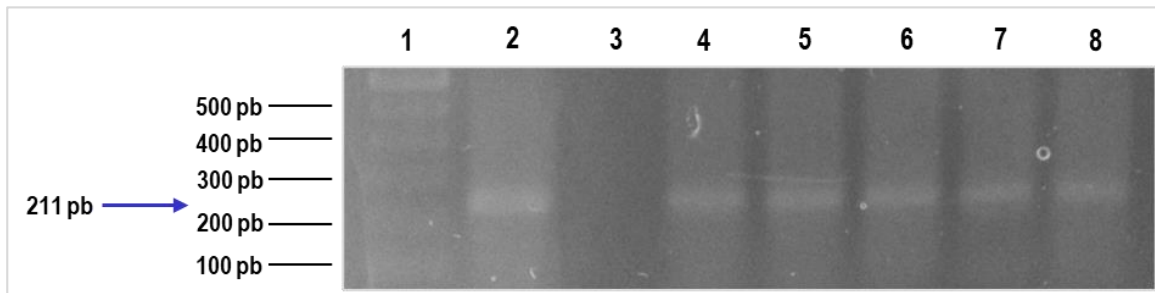


Figura 14. Amplificación de la Región Hipervariable I de aDNA. Control positivo (carril 2), control negativo (carril 3), amplicón de mtDNA de la RHVI de 211 pb de aDNA PUXTABMEX008 (carril 4), PUXTABMEX007 (carril 5), PUXTABMEX010 (carril 6), PUXTABMEX009 (carril 7), PUXTABMEX006 (carril 8). Marcador de peso molecular de 100 pb (carril 1).

Amplificación de un fragmento de la RHV-I de 150 pb del nucleótido 16106 al 16256 para conocer la calidad del aDNA antes de la construcción de las librerías (Universidad de Kiel) (Fig. 15). La cuantificación del aDNA de las librerías fue de 53.10+ a 75.90 ng/μl para la NGS (Fig. 16).

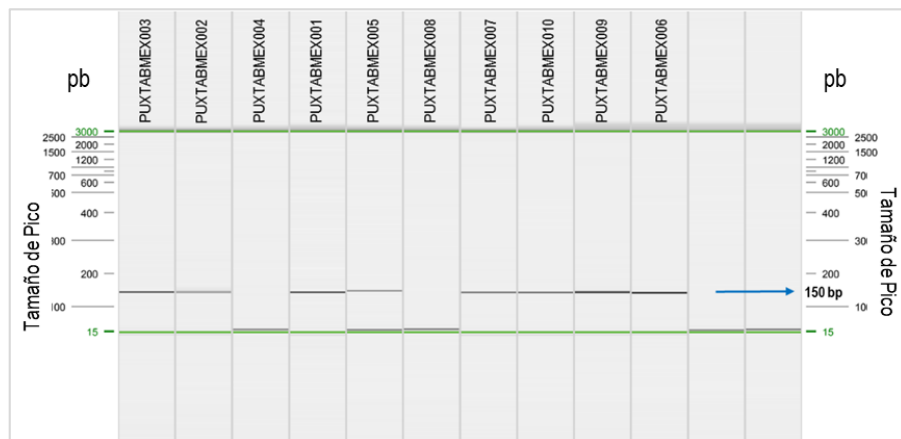


Figura 15. Amplificación de un fragmento de la RHV- I del mtDNA de 150 pb del nucleótido 16106-16256 para conocer la calidad e integridad del aDNA en cada muestra.

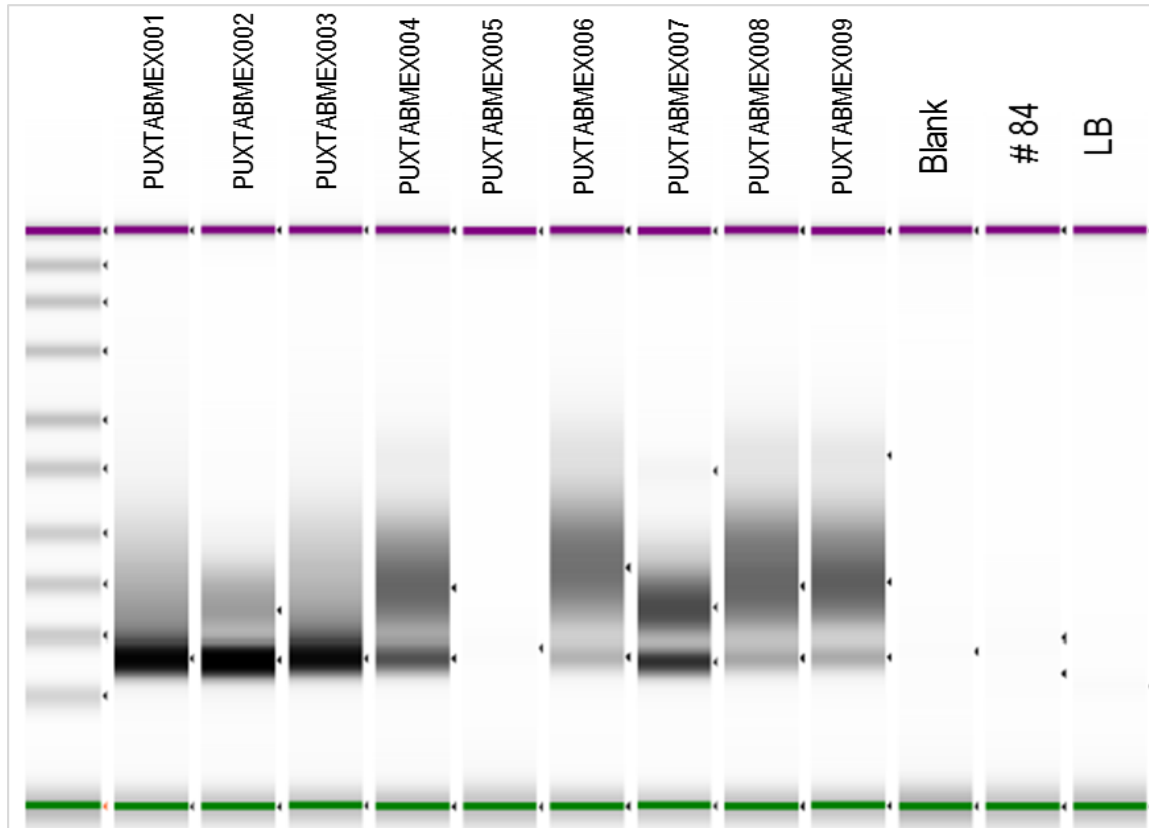


Figura 16. Cuantificación de las librerías de aDNA. PUXTABMEX001 (53.10 ng/ μ l), PUXTABMEX002 (75.90 ng/ μ l), PUXTABMEX003 (54.60 ng/ μ l), PUXTABMEX004 (71.90 ng/ μ l), PUXTABMEX005 (0.44 ng/ μ l), PUXTABMEX006 (63.60 ng/ μ l), PUXTABMEX007 (68.20 ng/ μ l), PUXTABMEX008 (66.60 ng/ μ l) y PUXTABMEX009 (65.40 ng/ μ l).

5.4. SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS)

Se secuenciaron diez muestras encontradas en la Cueva de Puyil por NGS obteniendo un control de calidad (QC) de secuencia para las muestras PUXTABMEX002-PUXTABMEX010 entre el 97-99% y para la muestra PUXTABMEX001 del 89.63% (Fig. 17). Se determinó el patrón de daño para distinguir entre secuencias antiguas y contemporáneas, las muestras fueron tratadas con UDG para reparar el DNA, se muestra un ejemplo del patrón de daño de la muestra PUXTABMEX003 (Fig. 18).

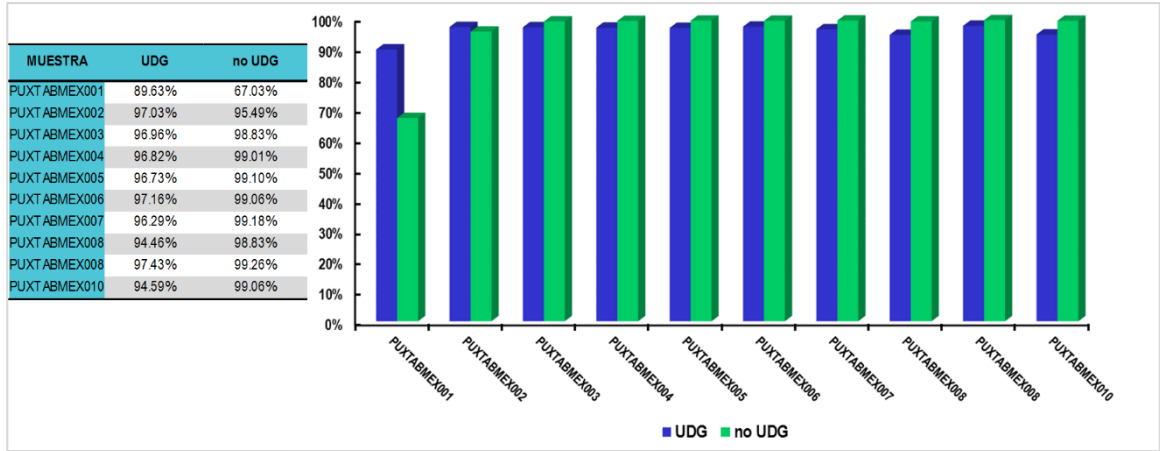


Figura 17. Control de Calidad de las secuencias obtenidas por el software FASTQC de las diez muestras prehispánicas de estudio.

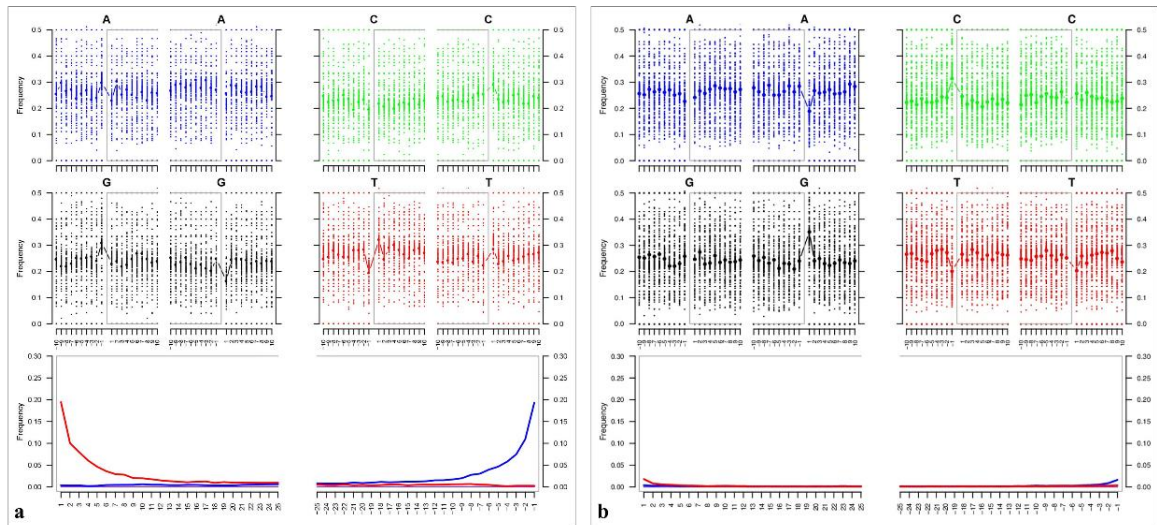


Figura 18. Patrón de daño de la muestra PUXTABMEX003. (a) Desaminación C>T en el extremo 5' (rojo) y G>A en el extremo 3' (azul). (b) Reparación del aDNA con UDG en el extremo 5' (rojo) y en el extremo 3' (azul). El patrón de daño fue similar para cada muestra prehispánicas de estudio.

El DNA endógeno presente en cada muestra fue menor al 1%, solo en las muestras PUXTABMEX001 y PUXTABMEX010 se obtuvo el 1.129% y 1.003% de DNA endógeno respectivamente (Fig. 19). La baja obtención de DNA endógeno es debido a las condiciones en las que se encontraron las muestras dentro la cueva, que afectaron la preservación del DNA.

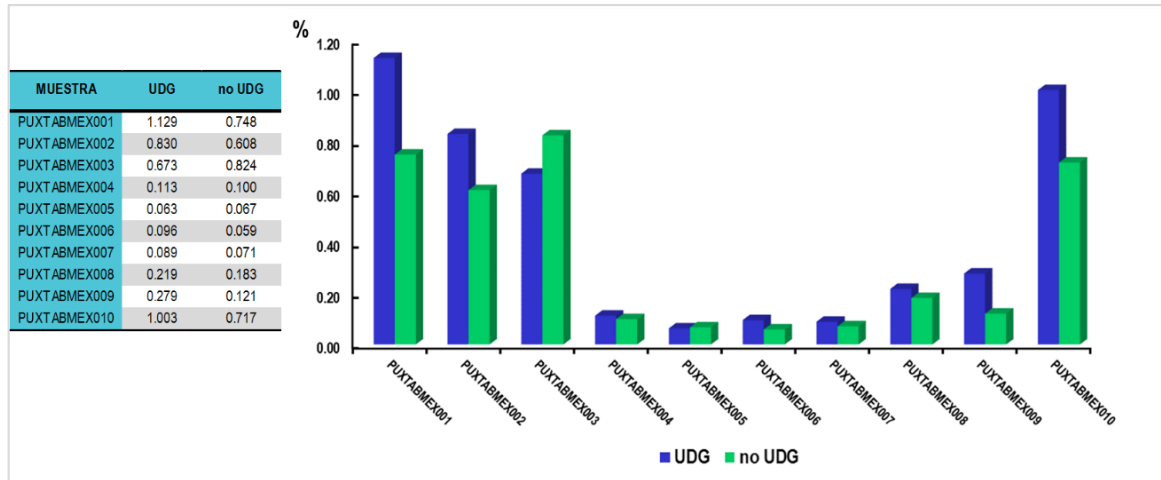


Figura 19. Datos porcentuales de DNA endógeno sin tratamiento y tratado con UDG presente en cada muestra prehispánica de este estudio.

Las muestras PUXTABMEX002, PUXTABMEX003, PUXTABMEX009 y PUXTABMEX010 tuvieron mayor cobertura 1X del genoma completo con 0.316%, 0.228%, 0.131% y 0.111% respectivamente (Fig. 20).

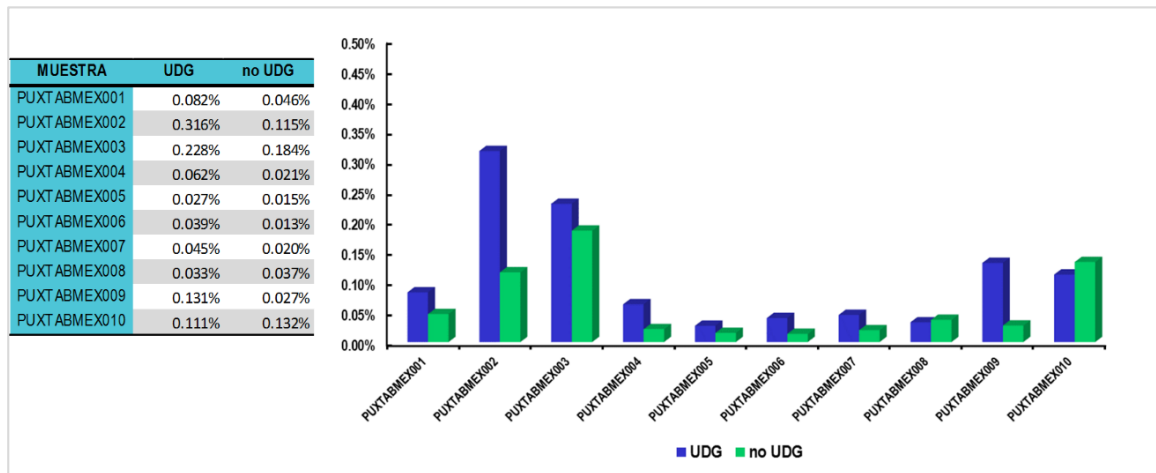


Figura 20. Cobertura del Genoma completo 1X sin tratamiento y tratado con UDG representado porcentualmente para cada muestra prehispánica de estudio.

Las muestras PUXTABMEX002, PUXTABMEX003 y PUXTABMEX006 tuvieron mayor cobertura 1X del mtDNA con 47.78%, 53.72% y 41.82% respectivamente (Fig. 21).

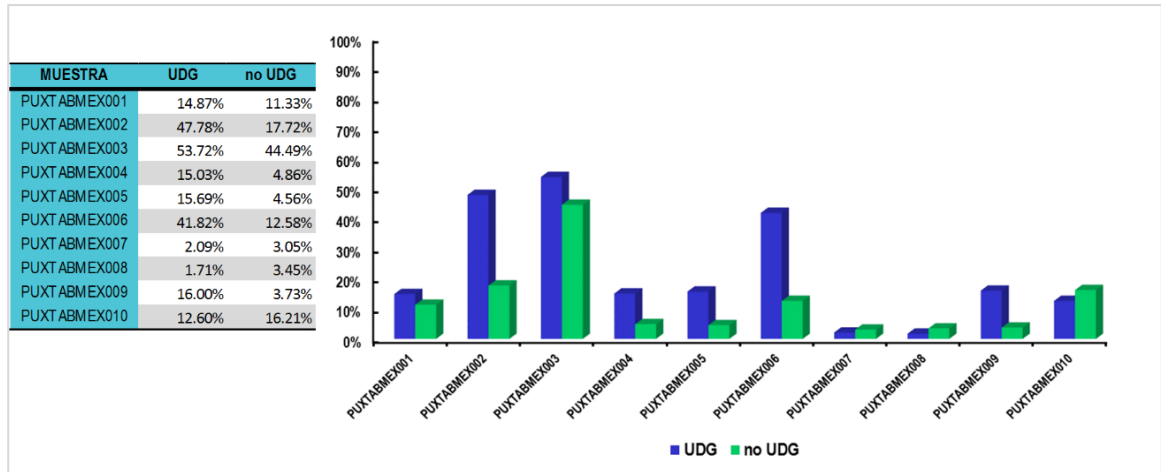


Figura 21. Cobertura del Genoma Mitocondrial 1X sin tratamiento y tratado con UDG representado porcentualmente para cada muestra prehispánica de estudio.

La longitud de los fragmentos alineados para el genoma completo y mitocondrial se encuentran en las tablas 6 y 7 respectivamente. Los demás datos estadísticos de la secuenciación masiva se encuentran en el Apéndice III.

Tabla 6. Tamaño de las lecturas alineadas del Genoma completo con la secuencia de referencia⁹⁷.

MUESTRA		Cobertura (pb)	Tamaño del Fragmento
PUXTABMEX001	UDG	101393	52 (40-72)
	no UDG	39871	64 (47-98)
PUXTABMEX002	UDG	181469	71 (47-76)
	no UDG	64061	59 (45-83)
PUXTABMEX003	UDG	140015	56 (42-76)
	no UDG	96267	57 (45-77)
PUXTABMEX004	UDG	41155	52 (40-71)
	no UDG	12881	51 (41-67)
PUXTABMEX005	UDG	17198	54 (40-76)
	no UDG	8863	54 (42-72)
PUXTABMEX006	UDG	27052	47 (36-64)
	no UDG	8311	50 (40-66)
PUXTABMEX007	UDG	23844	76 (48-76)
	no UDG	9206	64 (48-91)
PUXTABMEX008	UDG	27283	48 (36-68)
	no UDG	23059	48 (39-62)
PUXTABMEX009	UDG	79638	54 (41-76)
	no UDG	15876	51 (40-68)
PUXTABMEX010	UDG	124863	42 (34-56)
	no UDG	81806	49 (40-63)

Tabla 7. Tamaño de las lecturas alineadas del Genoma Mitocondrial con la secuencia de referencia⁹⁷.

MUESTRA		Cobertura (pb)	Tamaño del Fragmento
PUXTABMEX001	UDG	2463	47 (38-66)
	no UDG	1877	59 (49-77)
PUXTABMEX002	UDG	7917	76 (53.5-83.5)
	no UDG	2936	64.5 (49.5-87)
PUXTABMEX003	UDG	8901	66 (48-76)
	no UDG	7371	63 (48-84)
PUXTABMEX004	UDG	2490	52.5 (40.5-76)
	no UDG	805	56 (48.75-65.25)
PUXTABMEX005	UDG	2600	75 (51-83)
	no UDG	755	66 (51.5-76)
PUXTABMEX006	UDG	6929	55.5 (40-75.25)
	no UDG	2085	62 (48-84.5)
PUXTABMEX007	UDG	346	79 (72.25-93.25)
	no UDG	505	52.5 (41.5-85)
PUXTABMEX008	UDG	283	44 (38-51)
	no UDG	571	42.5 (40.75-53.75)
PUXTABMEX009	UDG	2651	62 (46-76)
	no UDG	618	63 (43.75-74)
PUXTABMEX010	UDG	2087	45 (37-72.5)
	no UDG	2685	58 (45-71)

5.5. IDENTIFICACIÓN DEL HAPLOGRUPO

Para confirmar el haplogrupo de cada muestra fue amplificado un fragmento de la RHV-I de 211 pb del nucleótido 16190 al 16401 y secuenciado por Sanger. Estas secuencias y las obtenidas por NGS fueron alineadas con la Secuencia de Referencia de Cambridge (CRs_human_hg38)⁹⁷. Los haplogrupos identificados fueron A, A2, C1, C1c y D4 de acuerdo a la clasificación de Kumar⁴¹, Mitomaster^{88,89} y HaploGrep2^{90,91}; el haplogrupo B no se identificó en este estudio. Los resultados se confirmaron por PCR en Tiempo Real usando sondas específicas para cada haplogrupo (descrita en Materiales y Métodos).

5.6. ANÁLISIS DE REDES HAPLOTÍPICAS

El análisis de redes haplotípicas se llevó a cabo para conocer la relación de las muestras prehispánicas con otras poblaciones de diferentes áreas geográficas, usando un fragmento representativo del mtDNA de poblaciones nativas antiguas y contemporáneas de América, Asia y Beringia.

El análisis para el haplogrupo A incluyó cinco secuencias de este estudio (PUXTABMEX003, PUXTABMEX005, PUXTABMEX006, PUXTABMEX007 y PUXTABMEX010) y 515 secuencias reportadas previamente del nucleótido 16224 al 16569 y reveló un total de 109 haplotipos (H) (Fig. 22). La muestra PUXTABMEX005 (H_106) y PUXTABMEX010 (H_109) haplogrupo A, se diversificaron con dos pasos mutacionales del nodo H_108 (PUXTABMEX007); la muestra PUXTABMEX007 (H_108) haplogrupo A y PUXTABMEX003 (H_105) haplogrupo A2 se diversificaron con dos pasos mutacionales de los nodos H_8 y H_94, que agruparon poblaciones de Xikrin de Brasil, Mayas de Yucatán y Tzotzil de México, posteriormente el nodo H_8 se diversificó del nodo H_4 que agrupó poblaciones Mayas de Kiche de Guatemala, Quintana Roo y Tzotzil de México, Han de China, Amazon de Brasil y Putumayo de Colombia. La muestra PUXTABMEX006 (H_107) haplogrupo A se diversificó con tres pasos mutacionales del nodo H_43 que agrupó poblaciones de Mongolia, Mayas Ladino, Verapaza y de la Tinta de Guatemala y Mayas de Tzotzil de México.

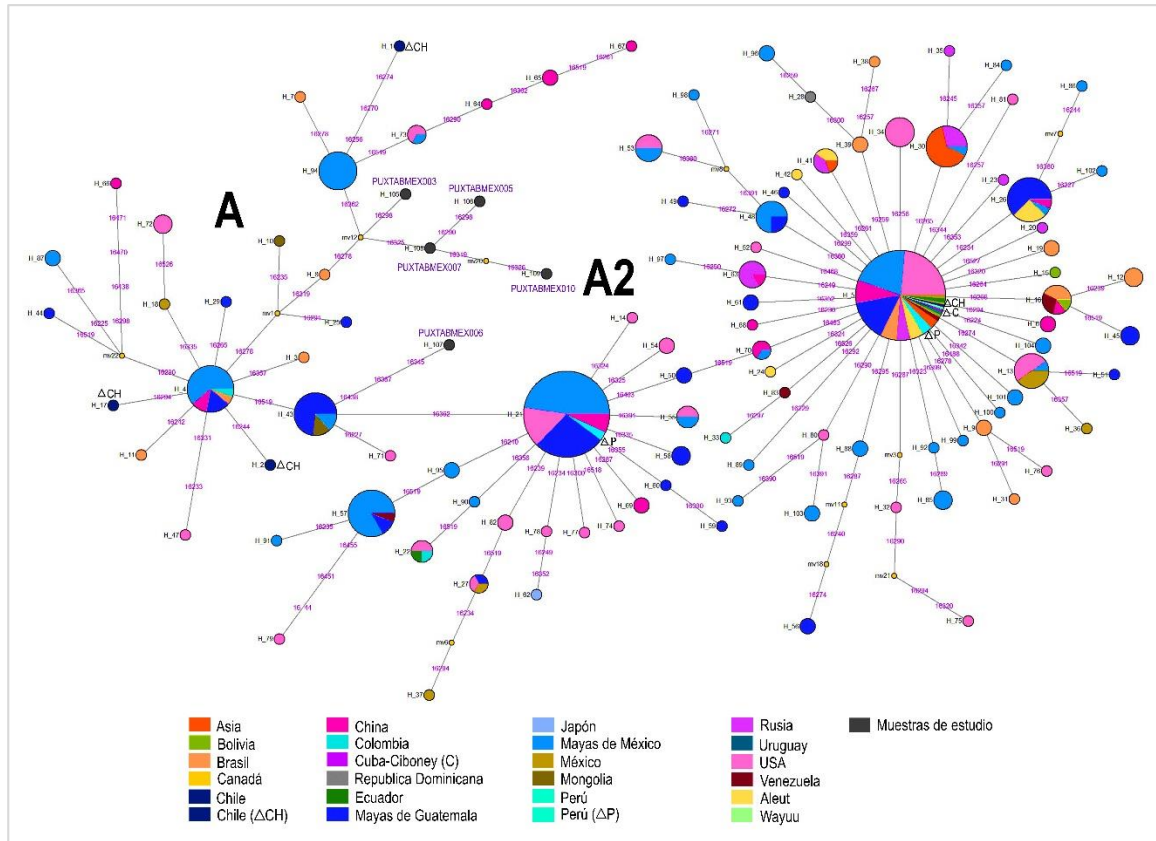


Figura 22. Red haplotípica del haplogrupo A construida con un fragmento de 346 pb de la RHV-I del mtDNA del nucleótido 16224 al 16569 con las muestras de estudio PUXTABMEX003 (H_105), PUXTABMEX005 (H_106), PUXTABMEX006 (H_107), PUXTABMEX007 (H_108) y PUXTABMEX010 (H_109) y 515 secuencias reportadas previamente. El triángulo antes de C, CH, y P indican las secuencias antiguas de Cuba, Chile y Perú respectivamente.

El análisis para el haplogrupo C incluyó tres secuencias de este estudio (PUXTABMEX001, PUXTABMEX002 y PUXTABMEX004) y 242 secuencias reportadas previamente del nucleótido 16224 al 16569 y reveló un total de 85 haplotipos (Fig. 23). La muestra PUXTABMEX002 (H_84) haplogrupo C1c y PUXTABMEX004 (H_85) haplogrupo C1 se diversificaron del nodo H_83 (PUXTABMEX001) haplogrupo C1 y este nodo se diversificó del nodo H_45 que agrupo la población Movima de Bolivia y este se diversificó del nodo H_45 que agrupo poblaciones Mayas de Yucatán, Campeche, Quintana Roo de México y República Dominicana.

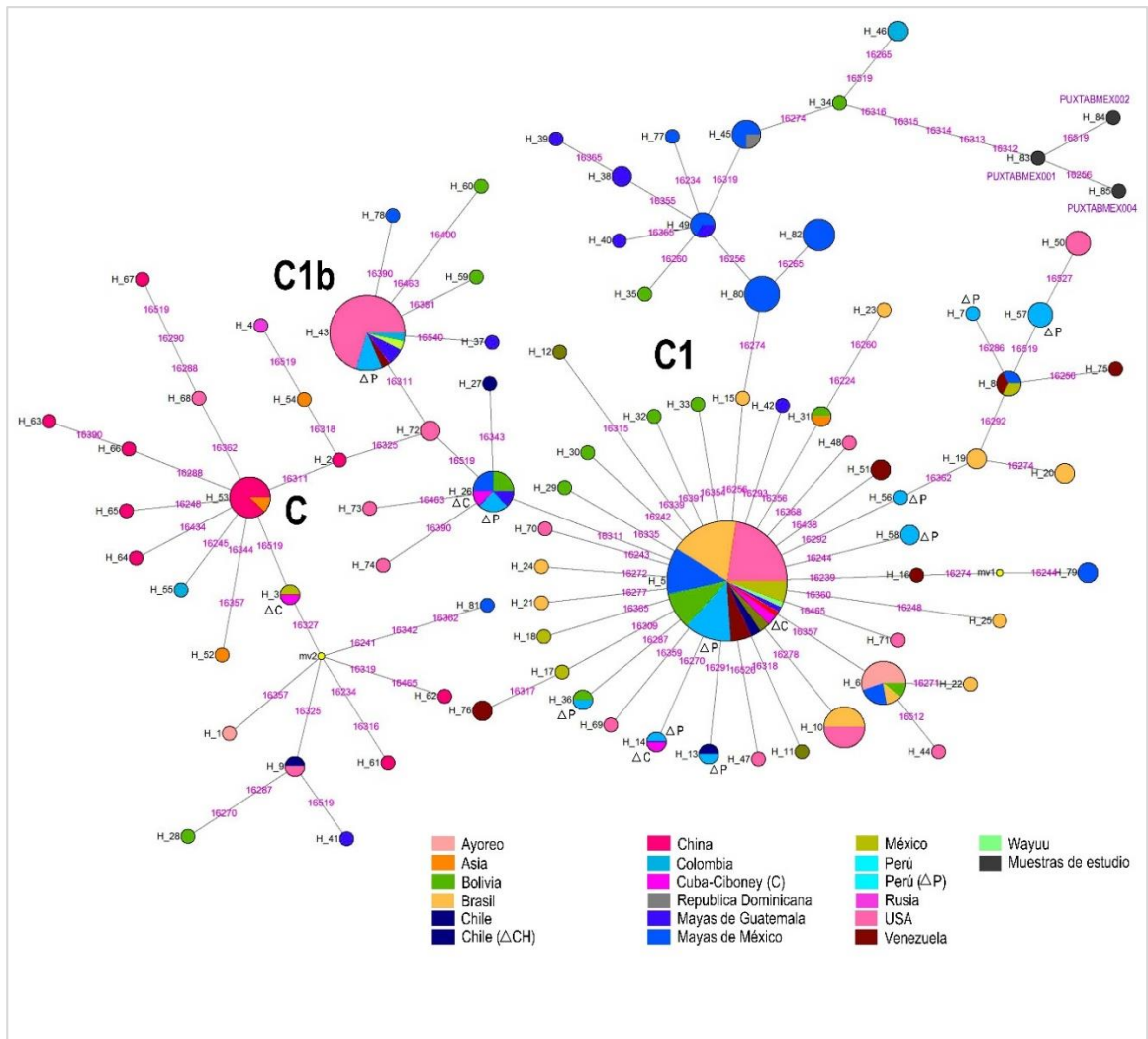


Figura 23. Red haplotípica del haplogrupo C construida con un fragmento de 346 pb, de la RHV-I del mtDNA del nucleótido 16224 al 16569 con las muestras de estudio PUXTABMEX001 (H_83), PUXTABMEX002 (H_84) y PUXTABMEX004 (H_85) y 242 secuencias previamente. El triángulo antes de CH, y P indican las secuencias antiguas de Chile y Perú respectivamente.

El análisis para el haplogrupo D incluyó una secuencia de estudio (PUXTABMEX009) y 235 secuencias reportadas previamente del nucleótido 16064 al 16569 revelaron un total de 133 haplotipos (Fig. 24). La muestra PUXTABMEX009 (H_133) haplogrupo D4 se diversificó del nodo H_119 que agrupo poblaciones Han de China, Norte de Brasil y Asia.

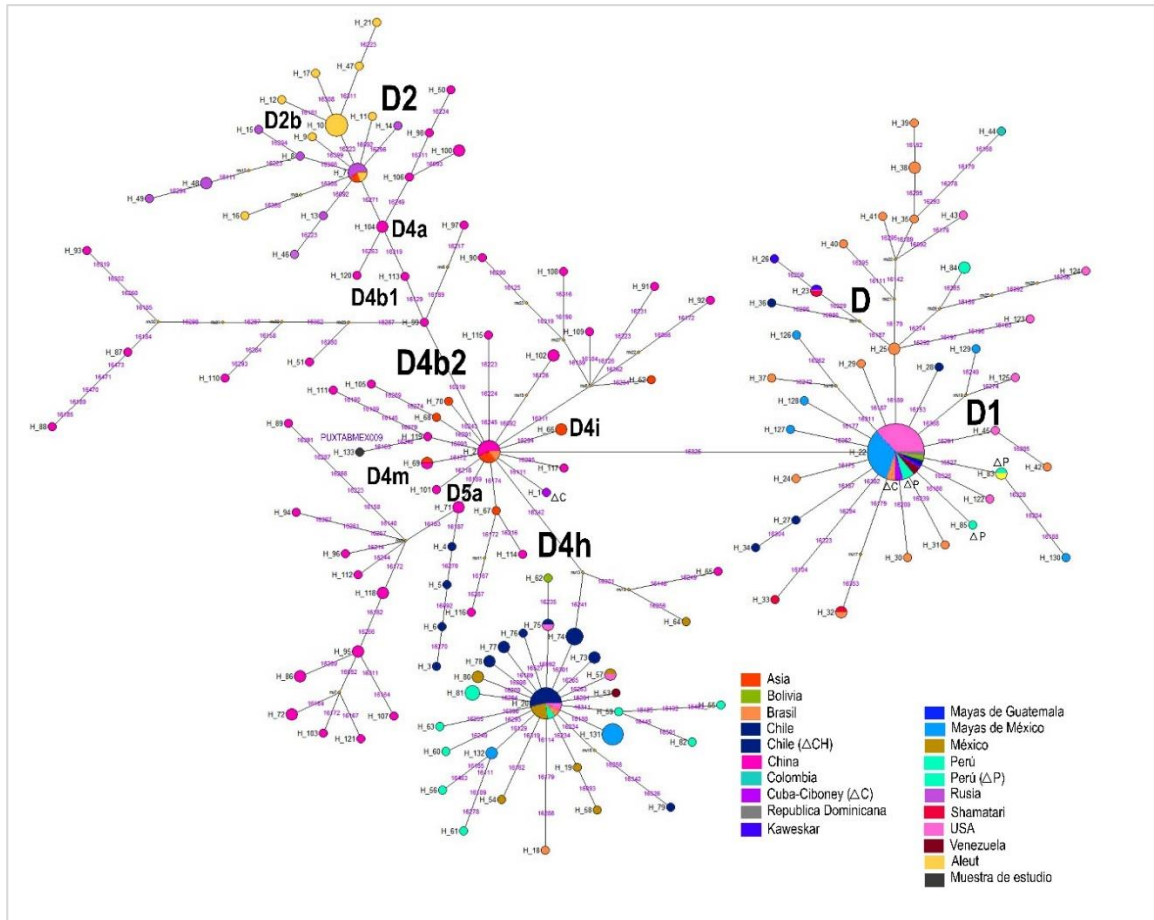


Figura 24. Red haplotípica del haplogrupo D construida con un fragmento de 508 pb, de la RHV-I del mtDNA del nucleótido 16064 al 16569 con la muestra de estudio PUXTABMEX009 (H_133) y 235 secuencias reportadas previamente. El triángulo antes de C, CH, y P indican las secuencias antiguas de Cuba, Chile y Perú respectivamente.

5.7. ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL ASOCIADAS A DIABETES COMO FACTOR DE RIESGO

Se analizaron las variantes m.3243A>G, m.16189T>C y m.16519T>C de las secuencias del genoma mitocondrial de las muestras prehispánicas de estudio con el programa IGV^{79,80}, encontrando resultados en las muestras PUXTABMEX002, PUXTABMEX003, PUXTABMEX004 y PUXTABMEX006.

No se ha reportado la presencia de estas variantes en poblaciones prehispánicas, sin embargo, en estudios recientes la variante m.16519T>C se ha asociado a diferentes enfermedades, por esta

razón para comprobar los resultados obtenidos en secuenciación masiva se decidió confirmar la variante m.16519T>C por PCR en Tiempo Real.

5.8. ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS DEL GENOMA NUCLEAR ASOCIADAS A DIABETES COMO FACTOR DE RIESGO

Las variantes propuestas en la tabla 3 presentes en diferentes genes que han sido asociados como factor de riesgo a DT2 en poblaciones contemporáneas mexicanas y asiáticas, fueron analizados en el programa IGV^{79,80}. El único gen cubierto fue *WFS1*, las otras no fueron cubiertas en ninguna de las muestras por NGS.

5.9. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO POR LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN *AMELX/AMELY*

Para determinar el sexo por la prueba de *AMELX/AMELY*, se amplificaron regiones específicas del cromosoma X y Y, obteniendo un fragmento de 130 pb y 170 pb respectivamente (Fig. 25), sin embargo, no fue posible determinar con exactitud el sexo, ya que el Chr-Y se encuentra más degradado que el Chr-X. Todas las muestras amplificaron para el Chr-X y las muestras (PUXTABMEX001-PUXTABMEX004) amplificaron para el Chr-Y (Tabla 8, Fig. 26).

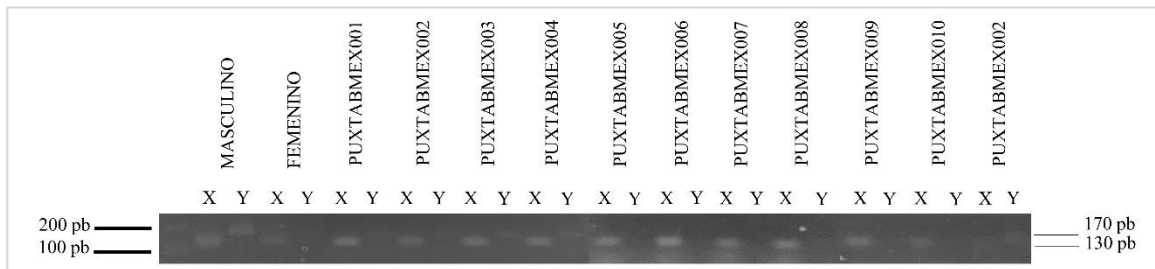


Figura 25. Amplificación de regiones específicas del cromosoma X y Y para determinar el sexo en muestras prehispánicas encontradas en la cueva de Puyil, obteniendo 4 muestras positivas para el sexo masculino (PUXTABMEX001-PUXTABMEX004). Amplicón del Chr-X de 130 pb y del Chr-Y de 170 pb. Marcador de Peso Molecular de 100 pb (carril 1) (Figura tomada del artículo Navarro-Romero et al., 2020).

5.10. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO POR EL ANÁLISIS DEL CROMOSOMA X AND Y

Previamente se ha reportado que los genes *TTY14* y *TTY4* son específicos para el Chr-Y^{102,103}, el análisis *in silico* mostró un 89% de identidad con el Chr-X o cromosomas autosómicos (Tabla 4), por esta razón no se usaron para determinar el sexo masculino, en consecuencia se buscaron nuevas secuencias en otros genes usando el programa IGV^{79,80}. Las secuencias analizadas fueron en los genes del Chr-Y: *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, *TTY22*, *USP9Y*, *UTY*, *NLGN4Y*, *TTY14*, *FAM41AY1*, *AC007359.1*, *TTY4*, *PBY2B*, *DAZ1*, *DAZ3* y *DAZ4*.

Las secuencias que fueron específicas para evaluar el sexo masculino fueron en el gen *TTY7* del nucleótido 6453472 al 6453552 y 6457811 al 6457861 correspondientes a fragmentos de DNA de 81 pb y 51 pb respectivamente; en el gen *TSPY3* del nucleótido 9712721 al 9712755, 9340012 al 9340052 y 9338261 al 9338286 correspondientes a fragmentos de DNA de 35 pb, 41 pb y 26 pb respectivamente; en el gen *TTY2* del nucleótido 9738350 al 9738414 y 9740557 al 9740591 correspondientes a fragmentos de DNA de 65 pb y 35 pb respectivamente y en el gen *TTY22* del nucleótido 9811090 al 9811129 y 9811192 al 9811267 correspondientes a fragmentos de DNA de 40 pb y 76 pb respectivamente (Tabla 4).

5.11. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS POR PCR DE LOS GENES *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* AND *TTY22* EN MUESTRAS CONTEMPORÁNEAS

Para verificar la especificidad de las secuencias seleccionadas de cada gen para identificar el sexo masculino se amplificó un fragmento de 140 pb del gen *TTY7* del nucleótido 6453443 al 6453582, un fragmento de 121 pb del gen *TSPY3* del nucleótido 9400901 al 9401021, un fragmento del gen *TTY22* de 124 pb del nucleótido 9811189 al 9811312 y un fragmento del gen *TTY2* de 133 pb del nucleótido 9738313 al 9738445. Se utilizaron muestras contemporáneas de sexo femenino y masculino para comprobar la especificidad de la secuencia para el sexo masculino. El amplicón específico para cada gen se obtuvo en la muestra contemporánea masculina y la ausencia del amplicón en la muestra contemporánea femenina (Fig. 26). La sensibilidad del método para determinar el sexo masculino en muestras contemporáneas y antiguas es de 3 ng/μl de DNA.

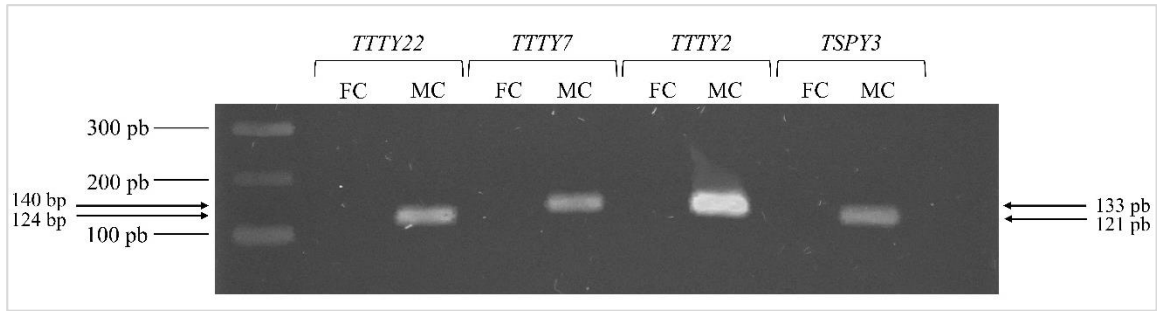


Figura 26. Amplificación de la secuencia específica de los genes *TTY22*, *TTY7*, *TTY2* y *TSPY3* para determinar el sexo en DNA humano contemporáneo, en las muestras contemporánea femenina hubo ausencia del amplicón. FC: Control Femenino y MC: Control Masculino. Marcador de Peso Molecular de 100 pb (carril 1) (Figura tomada del artículo Navarro-Romero et al., 2020).

5.12. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS POR PCR DE LOS GENES *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* AND *TTY22* EN MUESTRAS ANTIGUAS PREHISPÁNICAS

Para determinar el sexo en muestras prehispánicas encontradas en la Cueva de Puyil, se amplificaron las regiones específicas de los genes *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* y *TTY22* (Fig. 27, 28, 29 y Tabla 8). Los genes *TTY7*, *TSPY3* y *TTY2* analizados en las muestras prehispánicas mostraron los amplicones específicos del Chr-Y, que confirman que todos tienen sexo masculino, hubo ausencia del amplicón en las muestras PUXTABMEX002, PUXTABMEX003, PUXTABMEX004 y PUXTABMEX005 para el gen *TSPY3* (Fig. 29 y Tabla 8) y en la muestra PUXTABMEX003 para el gen *TTY2* (Fig. 30 y Tabla 8). La secuencia específica del gen *TTY22* no amplificó para ninguna de las diez muestras.

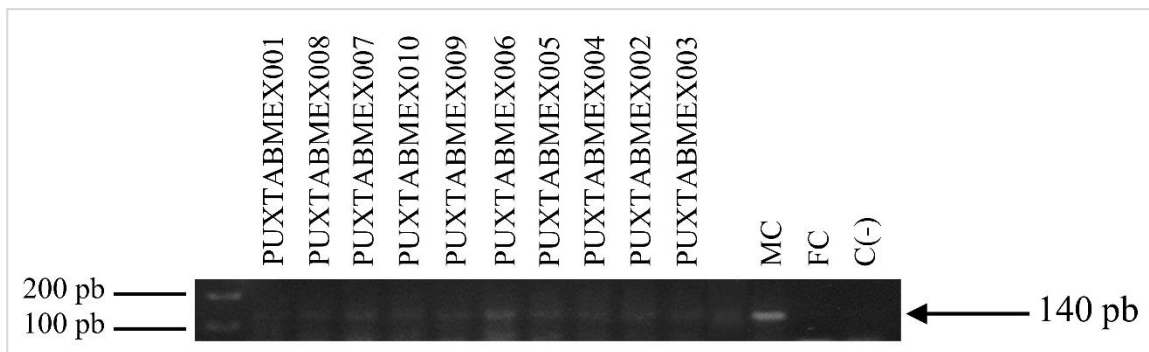


Figura 27. Amplificación de la secuencia específica del gen *TTY7* en todas las muestras prehispánicas de estudio (PUXTABMEX001-PUXTABMEX010) encontradas en la Cueva de Puyil, obteniendo un fragmento de 140 pb. FC: Control Femenino, MC: Control Masculino, C (-): Control negativo. Marcador de Peso Molecular de 100 pb (carril 1) (Figura tomada del artículo Navarro-Romero et al., 2020).

Tabla 8. Comparación de tres métodos diferentes para identificar el sexo en muestras prehispánicas. Amplificación de las secuencias específicas de *TTY7*, *TSPY3* y *TTY2*, prueba *AMELX/AMELY* y Criterio Antropométrico.

MUESTRA	<i>TTY7</i>	<i>TSPY3</i>	<i>TTY2</i>	<i>AMELX/AMELY</i>	*Reporte Antropométrico
PUXTABMEX001	+	+	+	X/Y	Masculino
PUXTABMEX002	+	-	+	X/Y	Masculino
PUXTABMEX003	+	-	-	X/Y	Femenino
PUXTABMEX004	+	-	+	X/Y	ND
PUXTABMEX005	+	-	+	X	Masculino
PUXTABMEX006	+	+	+	X	Masculino
PUXTABMEX007	+	+	+	X	Masculino
PUXTABMEX008	+	+	+	X	Masculino
PUXTABMEX009	+	+	+	X	Masculino
PUXTABMEX010	+	+	+	X	Femenino

ND: No se Determinó. *Identificación de sexo usando el Criterio Antropométrico.

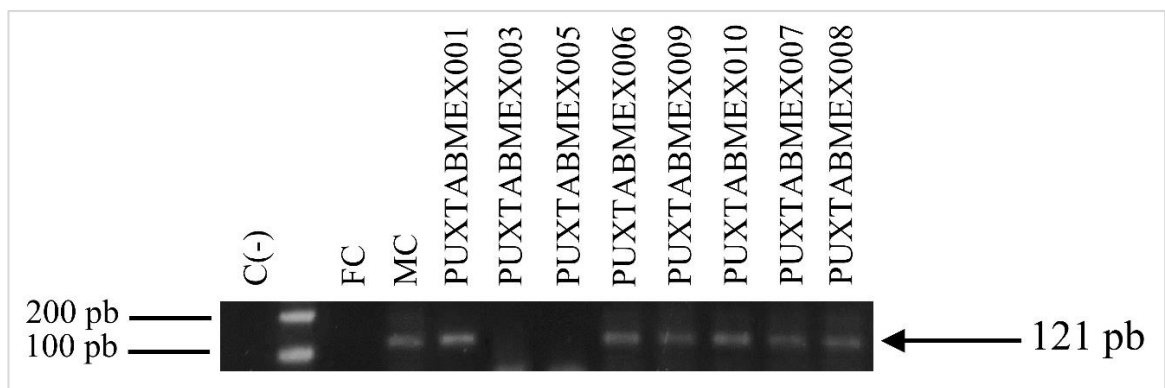


Figura 28. Amplificación de la secuencia específica del gen *TSPY3* en seis muestras prehispánicas (PUXTABMEX001, PUXTABMEX006-PUXTABMEX010) encontradas en la Cueva de Puyil, obteniendo un fragmento de 121 pb. FC: Control Femenino, MC: Control Masculino, C (-): Control negativo. Marcador de Peso Molecular de 100 pb (carril 2) (Figura tomada del artículo Navarro-Romero et al., 2020).

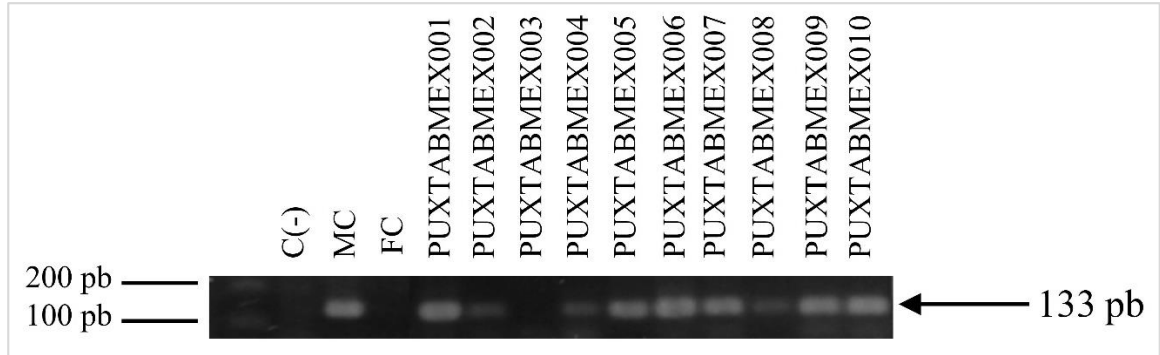


Figura 29. Amplificación de la secuencia específica del gen *TTY2* en nueve muestras prehispánicas (PUXTABMEX001, PUXTABMEX002, PUXTABMEX004-PUXTABMEX010) encontradas en la Cueva de Puyil, obteniendo un fragmento de 133 pb. FC: Control Femenino, MC: Control Masculino, C (-): Control negativo. Marcador de Peso Molecular de 100 pb (carril 1) (Figura tomada del artículo Navarro-Romero et al., 2020).

6. DISCUSIÓN

Las cuevas fueron utilizadas en las culturas mesoamericanas como centros ceremoniales, lo que ha provocado un gran interés en el estudio de las muestras prehistóricas encontradas en la Cueva de Puyil. cinco de las muestras tienen deformación craneal intencional que sugieren diferencias culturales y genéticas. La datación por ^{14}C mostro temporalidades dentro del periodo Arcaico y Clásico.

De las diez muestras analizadas, los individuos PUXTABMEX004, PUXTABMEX006 y PUXTABMEX009 pertenecieron al periodo Arcaico, su haplogrupo fue C1, A, y D4, respectivamente. El individuo PUXTABMEX004, con una edad de 5 a 10 años, corresponde al cráneo mutilado ubicado en el punto 50 y genéticamente está relacionado con poblaciones nativas contemporáneas de México, Guatemala, Bolivia y República Dominicana (Fig. 30), estos resultados apoyan la teoría de la ruta migratoria del continente Americano de Norte a Sur^{41,104}. El haplogrupo C1 tiene una edad estimada de 21.4 ± 2.7 kya / 16.4 ± 1.5 kya⁴¹.

El haplogrupo más común identificado previamente en otras poblaciones prehispanicas fue el A2^{41,105}, sin embargo, el haplogrupo A se ha encontrado en baja frecuencia en América; previamente se ha identificado en un individuo prehistórico de Comalcalco en Tabasco¹⁷, y también se identificó en el individuo PUXTABMEX006. La deformación craneal intencional de este cráneo se determinó como imperfecta y presentaba mutilación dental, practicas comunes en la cultura Maya de Guatemala y México. La deformación craneal imperfecta sugirió una técnica incipiente utilizada en ese momento, que posteriormente evolucionó con el tiempo. La deformación intencional severa y la mutilación dental que se encuentra en el cráneo del individuo PUXTABMEX006 desde el periodo Arcaico son muy importantes, ya que no se han reportado resultados parecidos previamente, por lo tanto, se requieren estudios adicionales para comprender más sobre estas prácticas, ya que solo hay un estudio que describe una leve deformación del cráneo en Mesoamérica con una temporalidad de ~8500-7000¹⁰⁶. Debido a estos hallazgos y a su relación con poblaciones mayas contemporáneas de México y Guatemala (Fig. 31), se puede inferir que este individuo tiene un ancestro común con los antecesores de las poblaciones mayas.

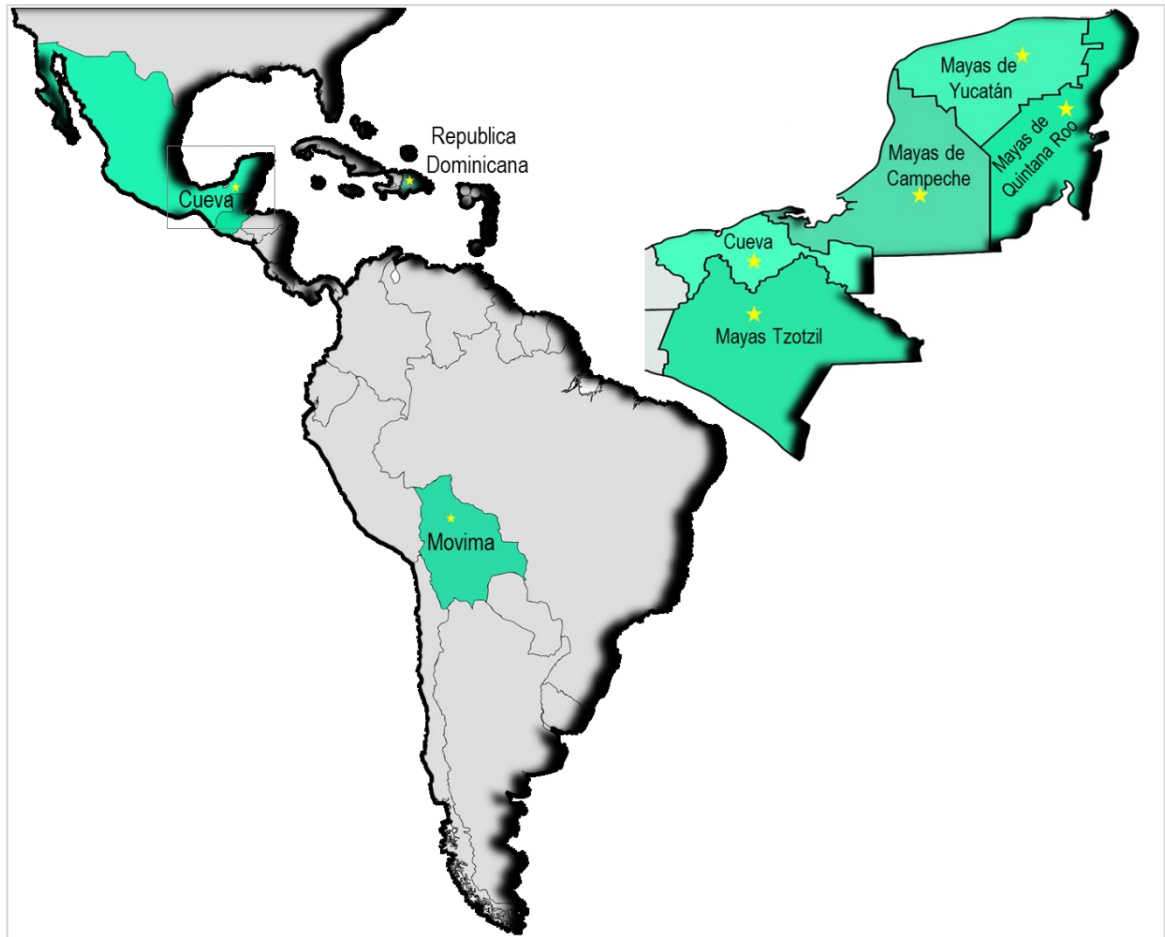


Figura 30. Relación genética de las muestras PUXTABMEX001, PUXTABMEX002 y PUXTABMEX004 con poblaciones nativas contemporáneas de México (Mayas de Chiapas, de Campeche, Yucatán y Quintana Roo), República Dominicana y Bolivia (Movima).

El individuo PUXTABMEX009 con deficiencias nutricional y una edad de 25-30 años al morir, haplogrupo D4, está relacionado geográficamente con población contemporáneas del Norte de Brasil, Han en China y Asia, perteneció al período Arcaico, una época en la que se desarrolló la agricultura y se establecieron pueblos definidos, por lo tanto, se infiere que este individuo podría pertenecer a un antecesor de la población Olmeca. La deformación intencional cefálica fue perfecta, lo que sugiere un refinamiento de la técnica a través del tiempo. Este tipo de deformación ha sido reportada previamente en el período Arcaico (2,500-2000 AC) en el centro Andino y al Norte de la Patagonia¹⁰⁷. En conjunto con la deformación craneal, su relación genética con las poblaciones de América del Sur y Asia, la alta frecuencia del haplogrupo D en América del Sur^{3,24,44,45} y la

identificación por primera vez del haplogrupo en Monte Verde hace 14.5 kya⁴¹ sugieren una ancestro común que emigró del Norte a Sur de América.

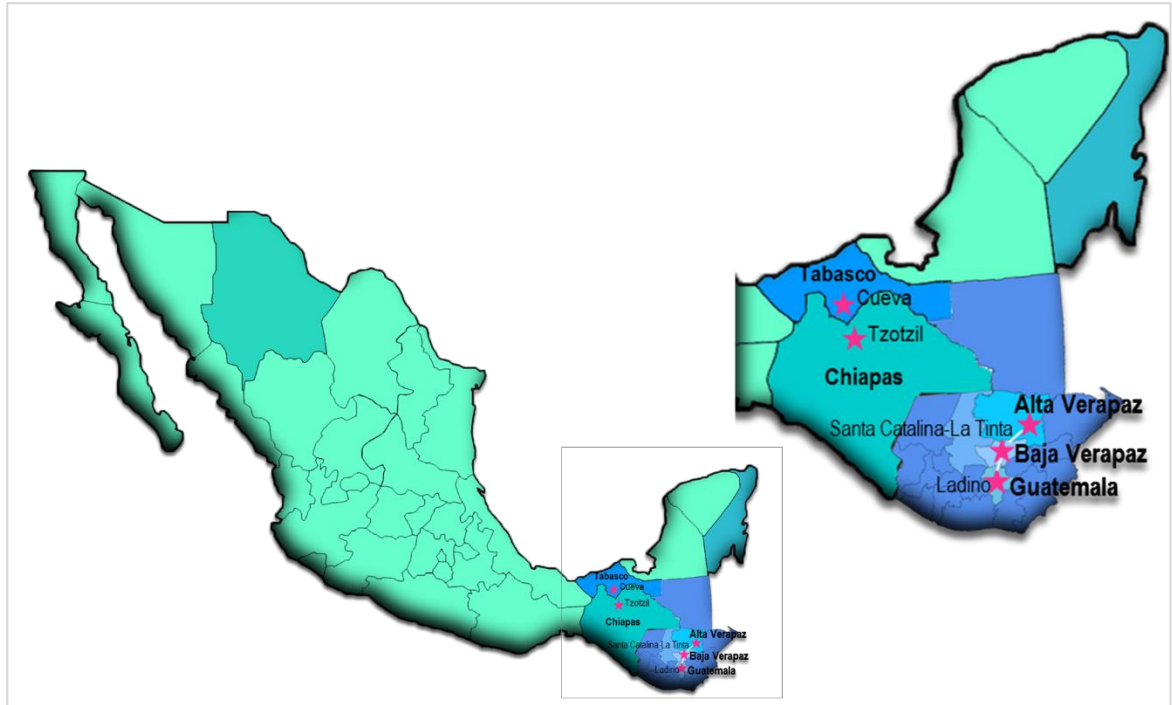


Figura 31. Relación genética de la muestra PUXTABMEX006 con poblaciones nativas contemporáneas de México (Mayas de Chiapas), Guatemala (Mayas de Ladino, Verapaz y La Tinta) y Mongolia (no representado en este mapa).

Los resultados de este estudio y la evidencia anterior sugirieron prácticas funerarias y rituales durante el período Arcaico por los predecesores de las poblaciones Olmeca, Maya y del Sur de América^{14,108}. Se infiere que desde que el hombre era nómada y cazador-recolector comenzó a usar las cavernas como centros ceremoniales para hacer rituales religiosos, de esta manera las tradiciones y costumbres se fueron heredando de generación en generación desde las civilizaciones prehispanicas hasta nuestros tiempos.

Los individuos PUXTABMEX001, PUXTABMEX002, PUXTABMEX007 y PUXTABMEX010 pertenecieron al periodo Clásico (200-800 DC). El individuo PUXTABMEX001 con una edad al morir de 20-25 años, perteneció al periodo Clásico-Medio, haplogrupo C1, está relacionado con poblaciones de México, Guatemala, Bolivia y Republica Dominicana (Fig. 30). El individuo PUXTABMEX002 con una edad de 20-25 años al morir, tenía una ofrenda asociada al período Clásico-Tardío, que está de acuerdo con la temporalidad de la muestra. Este individuo fue

haplogrupo C1c, haplogrupo que muestra una edad estimada de 15.8 ± 4.7 kya/ 10.8 ± 2.0 kya⁴¹ y está también relacionado con poblaciones de México, Guatemala, Bolivia y República Dominicana (Fig. 30), lo que sugiere un ancestro común maya para el individuo PUXTABMEX001 y PUXTABMEX002.

El individuo PUXTABMEX007 con una edad al morir de 25-30 años, con occipitalización del atlas, haplogrupo A, está relacionado geográficamente con poblaciones de México y Brasil (Fig. 32). La deformación intencional identificada en el cráneo PUXTABMEX007 ha sido identificada en aproximadamente el 50% de los mayas del período Clásico y en el 70% de los mayas del período Clásico-Tardío (Nakbe, Uaxactun, Peten y Seiba)¹⁰⁶. El individuo PUXTABMEX010 tenía 20-25 años al morir, haplogrupo A, que está relacionado geográficamente con poblaciones de México y Brasil (Fig. 32) y deformación craneal intencional es del tipo Olmecoide, encontrada en baja proporción en Comalcalco en Tabasco y Palenque en Chiapas¹⁰⁶. Ambos individuos podrían haber sido personas de alto rango social y económico en la civilización Maya, ya que en ambos casos las deformaciones craneales eran perfectas. Teniendo en cuenta que estos individuos eran del mismo período de tiempo y tenían una deformación craneal intencional diferente, es posible que provengan de diferentes regiones mayas en México. Los resultados también sugieren que la muerte de los individuos PUXTABMEX002, PUXTABMEX007 y PUXTABMEX010 ocurrió en la misma época, ya que tienen temporalidades parecidas, pero esto no significa que haya ocurrido en el mismo ritual funerario.

El individuo PUXTABMEX008 tenía 25-30 años al morir, no se pudo determinar el haplogrupo debido a que el rendimiento y calidad del DNA extraído fue muy baja. La deformación craneal intencional encontrada se ha observado en el 77% de las poblaciones ubicadas en los territorios que rodean el río Usumacinta en Petén y Copán¹⁰⁶, el individuo tenía desgaste dental, tabique nasal desviado, indicando que recibió un golpe perimorten, debido a que la deformación intencional no se realizó correctamente y su ubicación en la cueva, se infiere que este individuo era de bajo rango, o un acompañante de alguno de los individuos de alto rango.

El individuo PUXTABMEX003 tenía 20-25 años al morir, presento haplogrupo A2, que se distribuye en alta frecuencia de Norte a Sur de América. La edad de coalescencia estimada para este haplogrupo fue de 19.5 ± 1.3 kya / 16.1 ± 1.5 kya⁴¹ y se ha identificado con alta frecuencia en las poblaciones de Aleuts y Nativos Americanos. Realizando un análisis más específico el individuo PUXTABMEX003 se relacionó geográficamente con poblaciones nativas Mayas de México y

Guatemala, indicando que este individuo probablemente comparte un ancestro en común con Mayas de estas dos poblaciones.

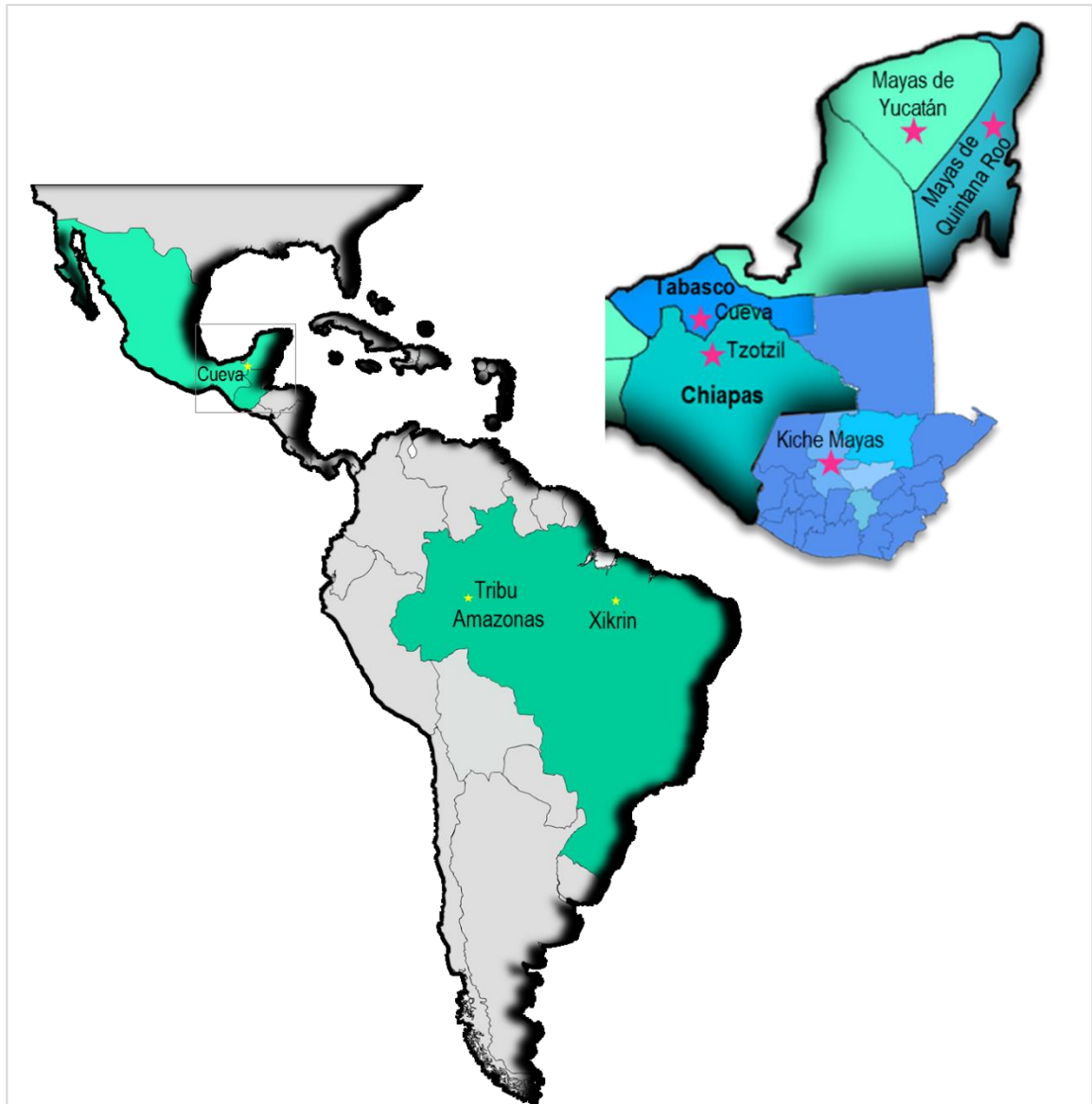


Figura 32. Relación genética de las muestras PUXTABMEX003, PUXTABMEX005, PUXTABMEX007 y PUXTABMEX010, con poblaciones nativas contemporáneas de México (Mayas de Chiapas, Yucatán y Quintana Roo), Guatemala (Mayas Kiche), Brasil (Xikrin y Amazonas) y China (Han) (no representado en este mapa).

La frecuencia para cada haplogrupo que conjunta a todas las muestras es: A 55.55%, C 33.33%, y D 11.11%, tienen una distribución parecida a las frecuencias de haplogrupo reportadas previamente para poblaciones mayas antiguas¹⁷ y poblaciones mayas contemporáneas de México y Guatemala.

La ausencia del haplogrupo B puede apoyar la teoría que fue un haplogrupo que llegó más tarde al continente americano¹⁷. El análisis genético de los individuos prehispánicos de la cueva de Puyil nos ayuda a tener más información sobre las primeras poblaciones de nativos americanos que llegaron a América con haplogrupos A, C y D, lo que respalda la presencia temprana de los predecesores de los mayas, además de otras culturas como la olmeca o la zoque que se establecieron en Tabasco y que probablemente fueron el resultado de la dispersión de estos predecesores.

En conclusión, este estudio analizó muestras prehispánicas de los predecesores de las civilizaciones mesoamericanas Olmeca, Maya y Zoque del período Arcaico y Clásico por NGS, contribuyendo al conocimiento de las civilizaciones antiguos. Los resultados mostraron la estrecha relación genética entre los mayas de México y Guatemala, así como la relación entre las poblaciones nativas contemporáneas de Bolivia, Brasil, República Dominicana, China, Mongolia y Asia, además, los resultados respaldan la teoría de las rutas migratorias y el asentamiento de poblaciones antiguas de Norte a Sur de América a través del Caribe, así como el origen de los principales haplogrupos fundadores nativos americanos A, C y D que provienen de Asia. Estos resultados también sugieren que las prácticas de deformación cefálica intencional comenzaron en el período Arcaico y persistieron hasta la conquista y que las cuevas se utilizaron como centros ceremoniales, influyendo en su organización social, hasta nuestros tiempos.

El estudio de posibles marcadores genéticos que se han asociado en la actualidad a enfermedades importantes como la diabetes también han sido de interés para identificarlos en poblaciones prehispánicas y la posible influencia que tuvo el mestizaje durante la conquista. Por este motivo también se buscaron variantes del mtDNA que se han asociado a diferentes enfermedades en poblaciones contemporáneas mexicanas y asiáticas. Las variantes analizadas asociadas en la actualidad como factor de riesgo a DT2, cáncer pancreático/hepático^{109,110} y a enfermedades del mtDNA. fueron la m.3243A> G, m.16189T> C y m.16519C> T del mtDNA

La variante m.3243A>G se localiza en la parte codificante del mtDNA, afecta el tRNA^{Leu} (UUR) y está relacionada con enfermedades metabólicas como Diabetes y Melas^{111,112}. Esta variante no se encontró en la muestra PUXTABMEX006 y en el resto de las muestras prehispánicas no se cubrió el fragmento de la secuencia. La variante m.16189T>C localizada en la región no codificante del mtDNA se ha asociado con la resistencia a insulina^{113,114}, no fue identificada en las muestras PUXTABMEX003 y PUXTABMEX004, y en el resto de las muestras prehispánicas no se cubrió la secuencia de esa región. Las alteraciones mitocondriales actualmente se consideran parte

importante del proceso carcinogénico, ya que favorece el crecimiento anormal celular y aumenta la resistencia celular a la apoptosis¹¹⁵. La variante m.16519T>C se localiza en la región no codificante del mtDNA; se sabe que esta variante altera la producción de proteínas que intervienen en la fosforilación oxidativa a nivel transcripcional¹¹⁵. Estudios recientes han mostrado que la presencia de esta variante en pacientes diabéticos con cáncer de páncreas aumenta la agresividad de la enfermedad^{98,115}. Otros estudios recientes han asociado a las variantes m.16189T>C y m.16519T>C con nuevos padecimientos crónicos como la hipertensión y la enfermedad coronaria. La variante m.16519T>C fue identificada en las muestras PUXTABMEX002 y PUXTABMEX006 por NGS y PCR en Tiempo Real, no se identificó en las ocho muestras prehispánicas restantes.

Se han descrito variantes de los genes nucleares (Tabla 3) que se han asociado como factor de riesgo a DT2. Las secuencias de genes mostradas en la tabla 3 se buscaron en las secuencias obtenidas por NGS y no fueron cubiertas para ninguna muestra prehispánica. Únicamente la variante *WFS1* rs6446482C>G se identificó en la muestra PUXTABMEX002. El gen *WFS1* se localiza en el brazo corto del cromosoma 4^{48,116} codifica para la proteína Wolframina que permite la regulación de calcio en las células, es importante para la comunicación celular, contracción muscular e interviene en diferentes procesos proteicos, la proteína se encuentra en páncreas, cerebro, corazón, huesos, musculo, pulmón, hígado y riñones⁴⁸. Esta proteína participa en el funcionamiento de las células β y la variante rs6446482C>G se ha encontrado asociada a DT2 en población mexicana^{96,117}. La muestra PUXTABMEX002 tuvo las variantes, en el DNA nuclear *WFS1* rs6446482C>G y en el mtDNA la variante m.16519T>C.

Desde que el hombre era recolector y antes de que se formaran lo que hoy se conoce como civilizaciones, ya se tenían mutaciones que actualmente se consideran como factor de riesgo a enfermedades actualmente están influenciadas por su dieta, estilo de vida y factores ambientales, es probable que estas variantes no tuvieran ningún impacto en la salud de los individuos prehispánicos.

La identificación del sexo en restos óseos antiguos fue un factor importante a considerar en este estudio, ya que era de interés identificar el sexo de los individuos de la cueva de Puyil pertenecientes al periodo Arcaico y Clásico involucrados en las ceremonias religiosas de poblaciones prehispánicas, incluyendo al individuo joven que se descubrió en esta cueva. Inicialmente usamos diferentes técnicas con el objetivo de definir el sexo. En la publicación de este trabajo¹¹⁸, se encontró que todos los individuos de la cueva de Puyil eran de sexo masculino. Para llegar a esta conclusión se

emplearon los siguientes métodos: análisis de los genes *AMELX/AMELY*, las mediciones antropométricas y el análisis del Chr-Y.

El Chr-Y es el tercer cromosomas más pequeño en humanos^{101,119,120} con el 2-3% del genoma haploide, está compuesto de una porción pseudoautosomal (PAR) que se divide en dos regiones: PAR1 localizada en la región terminal del brazo corto (Yp11.32) y PAR2 localizada en el brazo largo (Yq12) (Fig. 33), las regiones pseudoautosomales son las que se recombinan con la parte pseudoautosomal del Chr-X (Xp22.3 and Xq28) durante la meiosis^{62,119,120}. PAR1 y PAR2 representan el 5% de todo el cromosoma y el 95% es la región no recombinante Y (NRY), en esta región los genes se pueden clasificar en 2 categorías, la primera comprende los genes que tienen homología con el Chr-X y su principal función es de mantenimiento y la segunda categoría incluye a los genes con funciones especializadas que se expresan en los testículos¹¹⁹. Teniendo esta información se seleccionaron secuencias de 15 genes localizados en el Chr-Y: *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, *TTY22*, *USP9Y*, *UTY*, *NLGN4Y*, *TTY14*, *FAM41AY1*, *AC007359.1*, *TTY4*, *PBY2B*, *DAZ1*, *DAZ3* Y *DAZ4* (Fig. 33).

De los quince genes analizados los genes *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* and *TTY22* se localizan en el brazo corto del Chr-Y (Yp11.2)^{101,103} (Fig. 33). El análisis de las secuencias por el programa IGV^{79,80} indicó que estas secuencias son exclusivas de individuos de sexo masculino.

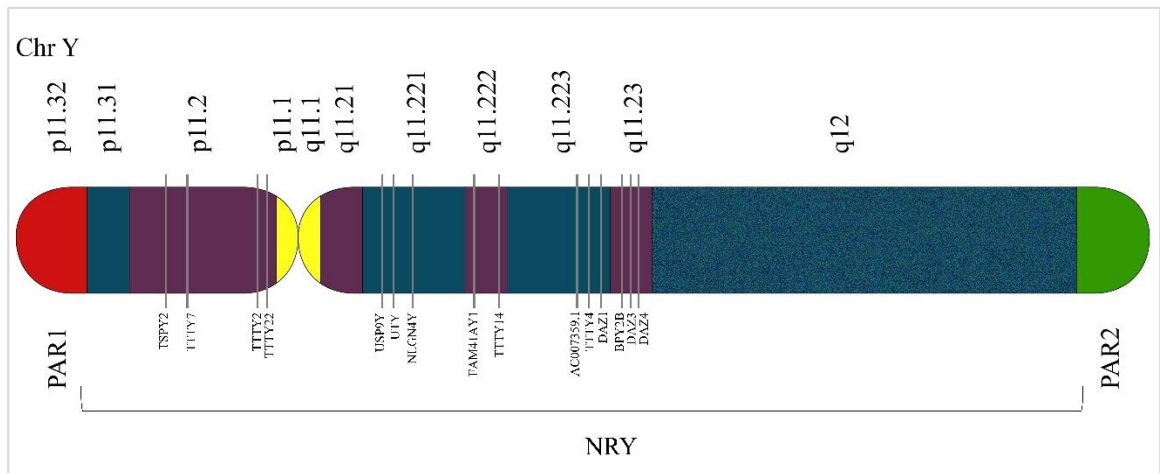


Figura 33. Representación esquemática del Chr-Y donde se muestra las regiones PAR1, PAR2 y NRY, así como la ubicación de los 15 genes utilizados para encontrar secuencias específicas para identificar el sexo masculino en muestras antiguas (Figura tomada del artículo Navarro-Romero et al., 2020).

De las muestras analizadas por el método *AMELX/AMELY* cuatro fueron positivos masculinos (PUXTABMEX001-PUXTABMEX004) y las seis muestras restantes (PUXTABMEX005-PUXTABMEX010) dieron positivo para el amplicón del Chr-X, esto se debe a que los hombres contienen ambos cromosomas. Los resultados sugieren que la región de DNA correspondiente a *AMELY* probablemente sea más susceptible a degradación. Estos datos también indican que la prueba *AMELX/AMELY*, no siempre es exitosa en la amplificación de Chr-Y y en ocasiones puede mostrar falsos positivos, por lo tanto, la evaluación de los genes *TTY7*, *TSPY3* y *TTY2* fue importante para saber con precisión el sexo de los individuos de estudio. La muestra PUXTABMEX004 fue un niño (5-10 años) y no fue posible determinar su sexo por el criterio antropométrico, sin embargo, se identificó como masculino utilizando los genes específicos *TTY7*, *TTY2* y *AMELX/AMELY* (Tabla 8).

La nueva metodología desarrollada para identificar el sexo masculino por la amplificación de *TTY7*, *TSPY3* y *TTY2* fue exitosa en la identificación de sexo en poblaciones antiguas, cuando el sexo no puede determinarse por mediciones antropométricas o la prueba *AMELX/AMELY* solo amplifique el Chr-X es recomendable utilizar los genes propuestos en este estudio, estos genes se pueden buscar *in silico* si se tienen resultados de secuenciación masiva.

7. CONCLUSIONES

- ⊕ De las siete muestras datadas, los individuos PUXTABMEX004, PUXTABMEX006 y PUXTABMEX009 pertenecen al periodo Arcaico y los individuos PUXTABMEX001, PUXTABEX002, PUXTABMEX007 y PUXTABMEX010 al periodo Clásico.
- ⊕ Los haplogrupos identificados fueron A, A2, C1b C1c y D4, mientras el haplogrupo B no estuvo presente en las muestras de estudio.
- ⊕ El análisis de la red de haplotipos mostró una estrecha relación genética entre los mayas de diferentes regiones de México y Guatemala, las poblaciones nativas contemporáneas de Bolivia, Brasil, Republica Dominicana, China, Mongolia y Asia.
- ⊕ Los resultados apoyan las teorías de rutas migratorias de Norte a Sur a través de las islas del Caribe y confirman un ancestro en común de las poblaciones asiáticas que emigraron a América.
- ⊕ Los individuos PUXTABMEX002, PUXTABMEX003, PUXTABMEX005, PUXTABMEX006, PUXTABMEX007, PUXTABMEX008 y PUXTABMEX010 posiblemente tuvieron un ancestro en común maya, mientras que la muestra PUXTABMEX009 posiblemente tuvo un ancestro en común Olmeca.
- ⊕ El individuo PUXTABMEX009 posiblemente perteneció a una población que migró de Norte a Sur de América, se infiere que algunos individuos se establecieron en diferentes regiones como Puxcatán, lo que podría explicar la baja proporción del haplogrupo D4 en el Norte y el Centro del Continente Americano.
- ⊕ La deformación intencional cefálica imperfecta en las muestras Arcaicas (PUXTABMEX006 y PUXTABMEX009) sugieren que con el tiempo la técnica de la deformación craneal se fue modificando, hasta lograr una deformación intencional perfecta.
- ⊕ Los resultados también sugieren que por su temporalidad, deformación craneal y ubicación funeraria dentro de la cueva la muerte de los individuos PUXTABMEX002, PUXTABMEX007 y

PUXTABMEX010 ocurrieron en la misma época, pero esto no indica que ocurrieran en el mismo ritual funerario.

- ⊕ La deformación craneal en el individuo (PUXTABMEX006) del período Arcaico sugiere que la práctica de deformación craneal, limado dental y los rituales religiosos se practicaban desde el periodo Arcaico hasta la conquista española.
- ⊕ La variante nuclear *WFS1* rs6446482C>G y la variante mitocondrial m.16519T>C que se han asociado como factor de riesgo a diabetes, se identificó en el individuo PUXTABMEX002.
- ⊕ La muestra PUXTABMEX006 tuvo la variante mitocondrial m.16519T>C previamente asociada como factor de riesgo en DT2.
- ⊕ Se desarrolló una nueva metodología molecular para determinar el sexo masculino, mediante el análisis de regiones cortas de los genes *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* y *TTY22* presentes solamente en el Chr-Y.
- ⊕ Todas las muestras encontradas en la Cueva de Puyil fueron masculinas utilizando la nueva metodología y cuatro de ellas (PUXTABMEX001-PUXTABMEX004) se confirmaron mediante la prueba *AMELX/AMELY*.
- ⊕ La nueva metodología desarrollada para identificar el sexo masculino mediante la amplificación de *TTY7*, *TSPY3* y *TTY2* puede ser útil en la identificación de género en poblaciones humanas antiguas o estudios forenses. El uso de la nueva metodología se recomienda para restos antiguos y medicina forense porque es rápida, fácil y barata.
- ⊕ Es recomendable utilizar los genes *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2* y *AMELX/AMELY* para determinar el sexo de manera simultánea, ya que estas dos metodologías son complementarias.

8. PRESPECTIVAS

- ⊕ Analizar a los individuos que se encontraban en la cámara 6 sin cráneo, para saber si los cráneos encontrados en la entrada de la cámara 4 corresponden a los individuos dentro de la cámara 6 sin cráneo.
- ⊕ Analizar secuencias de individuos prehispánicos Olmecas y Zoques para poder seguir con la línea genética materna.
- ⊕ Extracción de DNA y secuenciación de comunidades nativas Zoques para enriquecer el análisis de genética de poblaciones.
- ⊕ Analizar una cantidad mayor de restos antiguos de diferentes culturas para ampliar los análisis de genotipo y fenotipo.

9. REFERENCIAS

1. Paul Kirchhoff. *Mesoamérica, sus límites geográficos, composición étnica y caracteres culturales*. (Escuela Nacional de Antropología e Historia, Sociedad de Alumnos, 1967).
2. Serrano-Ursúa, F. J. et al. *Mesoamérica*. (ed Carcache-Cabezas, H.) (Editorial Galería Guatemala, 2005).
3. González-Martín, A. *et al.* Demographic History of Indigenous Populations in Mesoamerica Based on mtDNA Sequence Data. *PLOS ONE* **10**, e0131791 (2015).
4. Campa, V. & Winter, M. Mixes, Zoques y la arqueología del Istmo Sur de Tehuantepec. Medio ambiente, antropología, historia y poder regional en el occidente de Chiapas y el Istmo de Tehuantepec. (eds Whiting, T. L., Domenici, D., Esponda, V. C. and Carlos Uriel, C.) 219-234 (Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, 2009).
5. Rust, W. F. & Sharer, R. J. Olmec settlement data from la venta, tabasco, Mexico. *Science* **242**, 102–104 (1988).
6. Clark J.E. *Los Olmecas en Mesoamerica* (2017). Available at: <https://es.scribd.com/document/343436334/Los-Olmecas-en-Mesoamerica-pdf>. (2017).
7. Florescano, E. Los olmecas: el primer reino de Mesoamérica. *Rev. Univ. México* (2007).
8. Pye, M. E. & Clark, J. E. Los Olmecas son Mixe-Zoques: Contribuciones de Gareth W. Lowe a la arqueología del formativo. 73-74 (Ministerio de Cultura y Deportes: Guatemala, 2006).
9. Campbell, L. & Kaufman, T. A Linguistic Look at the Olmecs. *American Antiquity*. **41**, 80-89 (1976).
10. Wichmann, S., Beliaev, D. & Davletshin, A. Posibles correlaciones lingüísticas y arqueológicas involucrando a los olmecas. Available at: <https://www.rsu.ru/upload/main/knor/binary/Olmecs.pdf> (2017).
11. Terreros-Espinosa, E. Arqueología zoque de la región serrana tabasqueña. *Estudios mesoamericanos*. **7**, 29-43 (2006).
12. Navarrete, C. Fuentes para la historia cultural de los Zoques. *An. Antropol.* **7**, 207-246 (1970).
13. Blaha-Pfeiler, B. et al. Tabasco serrano: miradas plurales: geografía, arqueología, historia, lingüística y turismo. (ed Ruz-Sosa, M. H.) (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014).
14. Monte de la Paz, J. & Linares-Villanueva, E. Un caso prehispánico de occipitalización del atlas: estudio antropofísico de un cráneo humano de la cueva El Tapesco del Diablo, Chiapas. *Diario de Campo*. **10**, 46-54 (2015).

15. Muñoz, M. L. et al. Migration of pre-Hispanic and contemporary human Mexican populations. Causes and consequences of human migration: an evolutionary perspective. (eds Crawford, M. H. and Campbell, C.), 417-435, (Cambridge University Press, 2012).
16. Law, D. Mayan Historical Linguistics in a New Age. *Lang. Linguist. Compass* 7, 141-156 (2013).
17. Ochoa-Lugo, M. I. et al. Genetic Affiliation of Pre-Hispanic and Contemporary Mayas Through Maternal Linage. *Hum. Biol.* **88**, 136–167 (2016).
18. Baudez, C.F. Capítulo III. Los últimos siglos antes de la Conquista (1250-1525). *Una historia de la religión de los antiguos mayas* 293–380 (Centro de estudios mexicanos y centroamericanos, 2013).
19. Rendu, W. et al. Evidence supporting an intentional Neandertal burial at La Chapelle-aux-Saints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 81–86 (2014).
20. Bautista Martínez, J. La deformación cefálica intencional en el México Prehispánico. *Estud. Antropol. Biológica* **12**, (2010).
21. Callaway, E. Ancient DNA reveals secrets of human history. *Nat. News* **476**, 136–137 (2011).
22. Carracedo, A. et al. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci. Int.* **110**, 79–85 (2000).
23. Kirsanow, K. & Burger, J. Ancient human DNA. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* **194**, 121–132 (2012).
24. Gorostiza, A. et al. Reconstructing the history of Mesoamerican populations through the study of the mitochondrial DNA control region. *PLoS One* **7**, e44666 (2012).
25. Skoglund, P. et al. Genetic evidence for two founding populations of the Americas. *Nature* **525**, 104 (2015).
26. Nicholls, T. J. & Minczuk, M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp. Gerontol.* **56**, 175–181 (2014).
27. Anderson, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457 (1981).
28. Andrews, R. M. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **23**, 147 (1999).
29. Millar, C. D., Huynen, L., Subramanian, S., Mohandesan, E. & Lambert, D. M. New developments in ancient genomics. *Trends Ecol. Evol.* **23**, 386–393 (2008).
30. Arsuaga, J. L. et al. Neandertal roots: Cranial and chronological evidence from Sima de los Huesos. *Science* **344**, 1358–1363 (2014).

31. Rizzi, E., Lari, M., Gigli, E., De Bellis, G. & Caramelli, D. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet. Sel. Evol. GSE* **44**, 21 (2012).
32. Knapp, M., Clarke, A. C., Horsburgh, K. A. & Matisoo-Smith, E. A. Setting the stage - building and working in an ancient DNA laboratory. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* **194**, 3–6 (2012).
33. Mardis, E. R. Next-generation sequencing platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* **6**, 287–303 (2013).
34. Sukhorukov, V. M., Dikov, D., Reichert, A. S. & Meyer-Hermann, M. Emergence of the Mitochondrial Reticulum from Fission and Fusion Dynamics. *PLOS Comput. Biol.* **8**, e1002745 (2012).
35. Reddy, P. H. & Reddy, T. P. Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases. *Curr. Alzheimer Res.* **8**, 393–409 (2011).
36. Sato, M. & Sato, K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 1979–1984 (2013).
37. Schwartz, M. & Vissing, J. New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **310**, 247–251 (2003).
38. Templeton, J. E. L. *et al.* DNA capture and next-generation sequencing can recover whole mitochondrial genomes from highly degraded samples for human identification. *Investig. Genet.* **4**, 26 (2013).
39. Wang, W., Wei, Z., Lam, T.-W. & Wang, J. Next generation sequencing has lower sequence coverage and poorer SNP-detection capability in the regulatory regions. *Sci. Rep.* **1**, 55 (2011).
40. Gredilla, R., Bohr, V. A. & Stevnsner, T. Mitochondrial DNA repair and association with aging—an update. *Exp. Gerontol.* **45**, 478–488 (2010).
41. Kumar, S. *et al.* Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins. *BMC Evol. Biol.* **11**, 293 (2011).
42. González-Oliver, A., Márquez-Morfin, L., Jiménez, J. C. & Torre-Blanco, A. Founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in ancient Maya from Xcaret, Quintana Roo. *Am. J. Phys. Anthropol.* **116**, 230–235 (2001).
43. Larcombe, L. A., Nickerson, P., Hoppa, R. D. & Matheson, C. Detection of a single nucleotide polymorphism in the IL-6 promoter region of ancient nuclear DNA. *Infect. Genet. Evol.* **5**, 117–122 (2005).

44. Qi, X. *et al.* Genetic evidence of paleolithic colonization and neolithic expansion of modern humans on the tibetan plateau. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 1761–1778 (2013).
45. Fagundes, N. J. R. *et al.* Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 583–592 (2008).
46. DeWitte, S. N. & Stojanowski, C. M. The Osteological Paradox 20 Years Later: Past Perspectives, Future Directions. *J. Archaeol. Res.* **23**, 397–450 (2015).
47. Lara-Riegos, J. C. *et al.* Diabetes susceptibility in Mayas: Evidence for the involvement of polymorphisms in HHEX, HNF4 α , KCNJ11, PPAR γ , CDKN2A/2B, SLC30A8, CDC123/CAMK1D, TCF7L2, ABCA1 and SLC16A11 genes. *Gene* **565**, 68–75 (2015).
48. Prasad, R. B. & Groop, L. Genetics of Type 2 Diabetes—Pitfalls and Possibilities. *Genes* **6**, 87–123 (2015).
49. Domínguez-Cruz, M. G. *et al.* Distribution of Six Polymorphisms in Two Communities with a Historical High Incidence of Diabetes and Obesity in Yucatan, Mexico. *Br. J. Med. Med. Res.* **17**, 1–12 (2016).
50. Pérez, P. V. El misterio maya. *InterSedes Rev. Las Sedes Reg.* **V**, (2003).
51. Sánchez-Pozos, K. & Menjívar, M. Genetic Component of Type 2 Diabetes in a Mexican Population. *Arch. Med. Res.* **47**, 496–505 (2016).
52. Barba de Piña Chan, B. Diabetes y medicina tradicional en México. *Cienc. - Acad. Mex. Cienc.* **53**, 18–23 (2002).
53. Ovchinnikov, I. V., Ovtchinnikova, O. I., Druzina, E. B., Buzhilova, A. P. & Makarov, N. A. Molecular genetic sex determination of Medieval human remains from North Russia: Comparison with archaeological and anthropological criteria. *Anthropol. Anz.* **56**, 7–15 (1998).
54. Álvarez-Sandoval, B. A., Manzanilla, L. R. & Montiel, R. Sex determination in highly fragmented human DNA by high-resolution melting (HRM) analysis. *PloS One* **9**, e104629 (2014).
55. Hora, M. & Sládek, V. Population specificity of sex estimation from vertebrae. *Forensic Sci. Int.* **291**, 279.e1-279.e12 (2018).
56. Skoglund, P., Storå, J., Götherström, A. & Jakobsson, M. *Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing.* **40**, (2013).
57. Veroni, A., Nikitovic, D. & Schillaci, M. A. Brief communication: Sexual dimorphism of the juvenile basicranium. *Am. J. Phys. Anthropol.* **141**, 147–151 (2010).

58. Gibbon, V., Paximadis, M., Strkalj, G., Ruff, P. & Penny, C. Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Forensic Sci. Int. Genet.* **3**, 74–79 (2009).
59. Tschentscher, F., Frey, U. H. & Bajanowski, T. Amelogenin sex determination by pyrosequencing of short PCR products. *Int. J. Legal Med.* **122**, 333–335 (2008).
60. Butler, E. K. & Li, R. Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis. (2014). *J Forensic Investigation.* **2**, 3.
61. Dutta, P. *et al.* Amelogenin Gene - The Pioneer in Gender Determination from Forensic Dental Samples. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **11**, ZC56-ZC59 (2017).
62. Bashamboo, A., Giran, H. M., Azfer, M. A. & Ali, S. Genomics of the human Y chromosome and molecular diagnosis. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. - Part B Biol. Sci.* **B69**, 525–538 (2003).
63. Quincey, D., Carle, G., Alunni, V. & Quatrehomme, G. Difficulties of sex determination from forensic bone degraded DNA: A comparison of three methods. *Sci. Justice J. Forensic Sci. Soc.* **53**, 253–260 (2013).
64. Green, R. E. *et al.* A Draft Sequence of the Neandertal Genome. *Science* **328**, 710–722 (2010).
65. Skoglund, P. *et al.* Origins and genetic legacy of Neolithic farmers and hunter-gatherers in Europe. *Science* **336**, 466–469 (2012).
66. Rhino 5 para Windows. Available at: <https://www.rhino3d.com/download/rhino/5/latest>. (2015).
67. Romano, A. & Pacheco, A. R. Estudio morfológico de la deformación craneana en Tamuín, S. L. P., y en la Isla del Idolo, Ver. (Instituto Nacional de Antropología e Historia, 1965).
68. Romano-Pacheco, A. Los restos óseos humanos de la cueva de La Candelaria, Coahuila: craneología. (Instituto Nacional de Antropología e Historia, 2005).
69. Adler, C. J., Haak, W., Donlon, D. & Cooper, A. Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J. Archaeol. Sci.* **38**, 956–964 (2011).
70. Campos, P. F. *et al.* DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* **194**, 7–16 (2012).
71. Lee, E. J. *et al.* Emerging genetic patterns of the european neolithic: Perspectives from a late neolithic bell beaker burial site in Germany. *Am. J. Phys. Anthropol.* **148**, 571–579 (2012).
72. Gabriel, M. N., Huffine, E. F., Ryan, J. H., Holland, M. M. & Parsons, T. J. Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a 'mini-primer set' amplification strategy. *J. Forensic Sci.* **46**, 247–253 (2001).

73. Lee, E. J., Anderson, L. M., Dale, V. & Merriwether, D. A. MtDNA origins of an enslaved labor force from the 18th century Schuyler Flatts Burial Ground in colonial Albany, NY: Africans, Native Americans, and Malagasy? *J. Archaeol. Sci.* **36**, 2805–2810 (2009).
74. Meyer, M. & Kircher, M. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb.prot5448 (2010).
75. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. (2016).
76. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
77. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **25**, 2078–2079 (2009).
78. Cock, P. J. A., Bonfield, J. K., Chevreur, B. & Li, H. SAM/BAM format v1.5 extensions for de novo assemblies. *bioRxiv* 020024 (2015). doi:10.1101/020024
79. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14**, 178–192 (2013).
80. Integrative genomics viewer. Available at: <https://www.nature.com/articles/nbt.1754>. (2017).
81. Peltzer, A. *et al.* EAGER: efficient ancient genome reconstruction. *Genome Biol.* **17**, 60 (2016).
82. Starikovskaya, E. B. *et al.* Mitochondrial DNA Diversity in Indigenous Populations of the Southern Extent of Siberia, and the Origins of Native American Haplogroups. *Ann. Hum. Genet.* **69**, 67–89 (2005).
83. Achilli, A. *et al.* The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. *PLoS ONE* **3**, (2008).
84. Derenko, M. *et al.* Origin and Post-Glacial Dispersal of Mitochondrial DNA Haplogroups C and D in Northern Asia. *PLoS ONE* **5**, (2010).
85. Gómez-Carballa, A. *et al.* The complete mitogenome of a 500-year-old Inca child mummy. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
86. Rieux, A. *et al.* Improved Calibration of the Human Mitochondrial Clock Using Ancient Genomes. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 2780–2792 (2014).
87. BioEdit 7.2.1 sequence alignment editor-Sequence Analysis & Alignment. Available at: <http://en.bio-soft.net/format/BioEdit.html>. (2015).

88. Mitomaster. Available at: <https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>. (2017).
89. Lott, M. T. *et al.* mtDNA Variation and Analysis Using MITOMAP and MITOMASTER. *Curr. Protoc. Bioinforma. Ed. Board Andreas Baxevanis AI* **1**, 1.23.1-1.23.26 (2013).
90. HaploGrep 2.0. Available at: <https://haplogrep.uibk.ac.at/>. (2017).
91. Weissensteiner, H. *et al.* HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res.* **44**, W58-63 (2016).
92. Free Phylogenetic Network Software. Available at: <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>. (2016).
93. Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **16**, 37–48 (1999).
94. Polzin, T. & Daneshmand, S. V. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper. Res. Lett.* **31**, 12–20 (2003).
95. Cheng, Z. & Almeida, F. A. Mitochondrial alteration in type 2 diabetes and obesity: an epigenetic link. *Cell Cycle Georget. Tex* **13**, 890–897 (2014).
96. Ali, O. Genetics of type 2 diabetes. *World J. Diabetes* **4**, 114–123 (2013).
97. GRCh38-hg38-Genome-Assembly-NCBI. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.26/. (2015).
98. Navaglia, F. *et al.* Mitochondrial DNA D-loop in pancreatic cancer: somatic mutations are epiphenomena while the germline 16519 T variant worsens metabolism and outcome. *Am. J. Clin. Pathol.* **126**, 593–601 (2006).
99. Wang, L. *et al.* Mitochondrial genetic polymorphisms and pancreatic cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **16**, 1455–1459 (2007).
100. Lin, Z. *et al.* Sex determination by polymerase chain reaction on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912. *Forensic Sci. Int.* **75**, 197–205 (1995).
101. Homo sapiens chromosome Y, GRCh38.p12 Primary Assembly. (2018).
102. GeneCards-Human Genes. Available at: <https://www.genecards.org/>. (2018).
103. Rappaport, N. *et al.* MalaCards: an amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search. *Nucleic Acids Res.* **45**, D877–D887 (2017).

104. Tamm, E. *et al.* Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLOS ONE* **2**, e829 (2007).
105. Pierre, M. de S. *et al.* Arrival of Paleo-Indians to the Southern Cone of South America: New Clues from Mitogenomes. *PLOS ONE* **7**, e51311 (2012).
106. Tiesler, V. Transformarse en maya: el modelado cefálico entre los mayas prehispánicos y coloniales. (Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Antropológicas, 2012).
107. Alfonso-Durruty Marta P., Giles Bretton T., Misarti Nicole, San Roman Manuel & Morello Flavia. Antiquity and geographic distribution of cranial modification among the prehistoric groups of Fuego-Patagonia, Chile. *Am. J. Phys. Anthropol.* **158**, 607–623 (2015).
108. Strauss, A. *et al.* Early Holocene ritual complexity in South America: the archaeological record of Lapa do Santo (east-central Brazil). *Antiquity* **90**, 1454–1473 (2016).
109. Seuring, T., Goryakin, Y. & Suhrcke, M. The impact of diabetes on employment in Mexico. *Econ. Hum. Biol.* **18**, 85–100 (2015).
110. Soto-Estrada, G., Moreno Altamirano, L., García-García, J. J., Ochoa Moreno, I. & Silberman, M. Trends in frequency of type 2 diabetes in Mexico and its relationship to dietary patterns and contextual factors. *Gac. Sanit.* (2017). doi:10.1016/j.gaceta.2017.08.001
111. Kobayashi, Y. *et al.* A point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene in melas (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 816–822 (1990).
112. Manouvrier, S. *et al.* Point mutation of the mitochondrial tRNA(Leu) gene (A 3243 G) in maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy, diabetes mellitus, renal failure, and sensorineural deafness. *J. Med. Genet.* **32**, 654–656 (1995).
113. Park, K. S. *et al.* A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. *Diabetologia* **51**, 602–608 (2008).
114. Tang, D.-L., Zhou, X., Li, X., Zhao, L. & Liu, F. Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **73**, 77–82 (2006).
115. Basso, D. *et al.* DNA repair pathways and mitochondrial DNA mutations in gastrointestinal carcinogenesis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **381**, 50–55 (2007).
116. Van Den Ouweland, J. M. W. *et al.* Molecular Characterization of WFS1 in Patients with Wolfram Syndrome. *J. Mol. Diagn. JMD* **5**, 88–95 (2003).

117. Choi, H. J. *et al.* Whole-exome sequencing identified a missense mutation in WFS1 causing low-frequency hearing loss: a case report. *BMC Med. Genet.* **18**, (2017).
118. Navarro-Romero, M. T. *et al.* A novel method of male sex identification of human ancient skeletal remains. *Chromosome Res.* (2020)
119. Halder, A., Kumar, P., Jain, M. & Iyer, V. K. Copy number variations in testicular maturation arrest. *Andrology* **5**, 460–472 (2017).
120. Quintana-Murci, L. & Fellous, M. The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland”. *J. Biomed. Biotechnol.* **1**, 18–24 (2001).

10. APÉNDICE

I. NOMBRES DE LOS SITIOS ARQUEOLÓGICOS DE LA CULTURA PREHISPÁNICA MAYA

- | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------|
| 1. Comalcalco | 29. Guaytán | 57. Caracol |
| 2. Tortuguero | 30. Ixtepeque | 58. Tzimin Kax |
| 3. Jonuta | 31. Tazumal | 59. Nimli Punit |
| 4. Tila | 32. Joya de Cerén | 60. Lubaantún |
| 5. Chiapa de Corzo | 33. El Nito | 61. Pusilhá |
| 6. Palenque | 34. Quiriguá | 62. Ixkún |
| 7. Pomoná | 35. Copán | 63. Machaquilá |
| 8 Tiradero (Moral Reforma) | 36. Los Higos | 64. Chiquilá |
| 9. El Tiigre | 37. Naco | 65. Kantunilkín |
| 10. Piedras Negras | 38. Salitrón | 66. Cobá |
| 11. Yaxchilán | 39. Yarumela | 67. Xel há |
| 12. Toniná | 40. Quelepa | 68. Muyil |
| 13. Bonampak | 41. Calakmul | 69. Emal |
| 14. Comitán | 42. Balakbal | 70. Panabá |
| 15. Tenam Puente | 43. Nohmul | 71- Dzilam |
| 16. Tenam Rosario | 44. Colhá | 72. Cansahcab |
| 17. Lagartero | 45. Atún Há | 73. Uci |
| 18. Izapa | 46. Naachtún | 74. Dzibilchaltún |
| 19. Zaculeu | 47. Xultún | 75. Tho |
| 20. Nebaj | 48. Uaxactún | 76. Yazcopoil |
| 21. Chamá | 49. Nakbé | 77. Aké |
| 22. Zacualpa | 50. Holmul | 78. Izamal |
| 23. Iximché | 51. Naranja | 79. Kantunil |
| 24. Chuitinamit-Atitlán | 52. Barton Ramire | 80. Culubá |
| 25. Abaj Takalik | 53. Tikal | 81. Ekbalam |
| 26. Bilbao | 54. Nakum | 82. Chichén Itzá |
| 27. Kaminaljuyú | 55. Yaxhá | 83. Chunchucmil |
| 28. El Chayal | 56. Xunantunich | 84. Oxintok |

- | | |
|-------------------|------------------------|
| 85. Uxmal | 103. Tabasqueña |
| 86. Calkiní | 104. Hochob |
| 87. Kabah | 105. Tampak |
| 88. San Francisco | 106. Chichmuul |
| 89. Sayil | 107. Uomuul |
| 90. Xcalumkín | 108. Lagartera |
| 91. Halal | 109. M. Maza de Juárez |
| 92. Itzimté | 110. Chacchobén |
| 93. Chacmultún | 111. Reforma |
| 94. Xkichmook | 112. Dzibanché |
| 95. Ixil | 113. Kohunlich |
| 96. Yaxuná | 114. Becán |
| 97. Okop | 115. Río Bec |
| 98. Campeche | 116. Yohaltún |
| 99. Edzná | 117. Xkanacol |
| 100. Champotón | 118. Mocu |
| 101. Xtampak | 119. Carrizal |
| 102. Dzilbilnocac | |

II. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN

ID	Dataset	# reads raw	# reads mrgd	raw read length	mergd QC	proportion merged	proportion
PXTABMEX001	KH150731.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04359	17,409,920	8,978,732	66 (45-77)	89.63%	84.92%	84.92%
PXTABMEX001	KH150731.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02836	12,069,682	5,327,514	90 (52-145)	67.03%	68.31%	68.31%
PXTABMEX002	KH150729.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04361	39,768,960	21,873,309	63 (44-77)	97.03%	86.63%	86.63%
PXTABMEX002	KH150729.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02834	20,845,538	10,530,266	61 (46-88)	95.49%	94.20%	94.20%
PXTABMEX003	KH150728.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04362	38,212,810	20,799,669	61 (43-77)	96.96%	87.72%	87.72%
PXTABMEX003	KH150728.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02833	22,748,428	11,679,787	60 (47-82)	98.83%	96.09%	96.09%
PXTABMEX004	KH150730.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04360	65,450,908	36,379,168	67 (45-77)	96.82%	85.18%	85.18%
PXTABMEX004	KH150730.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02835	25,324,828	12,902,382	58 (44-81)	99.01%	97.08%	97.08%
PXTABMEX005	KH150732.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04358	49,357,426	27,252,415	63 (43-77)	96.73%	85.84%	85.84%
PXTABMEX005	KH150732.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02837	25,832,084	13,199,419	58 (45-81)	99.10%	96.87%	96.87%
PXTABMEX006	KH150737.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04353	52,299,520	28,234,698	55 (40-77)	97.16%	88.88%	88.88%
PXTABMEX006	KH150737.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02854	27,736,544	14,053,917	52 (41-71)	99.06%	97.70%	97.70%
PXTABMEX007	KH150734.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04356	50,294,842	26,700,468	56 (40-77)	96.29%	89.73%	89.73%
PXTABMEX007	KH150734.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02851	25,191,508	12,882,019	57 (44-77)	99.18%	96.88%	96.88%
PXTABMEX008	KH150733.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04357	23,257,148	12,469,522	63 (42-77)	94.46%	86.48%	86.48%
PXTABMEX008	KH150733.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02850	24,837,600	12,592,883	54 (42-74)	98.83%	97.40%	97.40%
PXTABMEX009	KH150736.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04354	51,540,030	28,505,671	66 (46-77)	97.43%	86.46%	86.46%
PXTABMEX009	KH150736.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02853	25,701,090	13,085,702	58 (44-80)	99.26%	97.41%	97.41%
PXTABMEX010	KH150735.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBXX.F04355	23,651,806	12,453,004	56 (39-77)	94.59%	88.67%	88.67%
PXTABMEX010	KH150735.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02852	22,404,382	11,412,201	58 (45-80)	99.06%	97.16%	97.16%

ID	Dataset	Alignment: <i>H. sapiens</i>		Coverage: <i>H. sapiens</i>				
		# reads	alnread length	bp ref	bp covered	cov>= 1x	cov>= 2x	mean(DP)_cov
PXTABMEX001	KH150731.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04359	101393	52 (40-72)	3,209,285,650	2,632,519	0.082%	0.042%	2.17
PXTABMEX001	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02836	39871	64 (47-98)	3,209,285,650	1,483,326	0.748%	0.046%	2.09
PXTABMEX002	KH150729.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04361	181469	71 (47-76)	3,209,285,650	10,127,600	0.830%	0.316%	1.20
PXTABMEX002	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02834	64061	59 (45-83)	3,209,285,650	3,691,033	0.608%	0.115%	1.20
PXTABMEX003	KH150728.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04362	140015	56 (42-76)	3,209,285,650	7,324,646	0.673%	0.228%	1.16
PXTABMEX003	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02833	96267	57 (45-77)	3,209,285,650	5,900,133	0.824%	0.184%	1.07
PXTABMEX004	KH150730.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04360	41155	52 (40-71)	3,209,285,650	1,997,179	0.113%	0.062%	1.17
PXTABMEX004	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02835	12881	51 (41-67)	3,209,285,650	678,403	0.100%	0.021%	1.10
PXTABMEX005	KH150732.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04358	17198	54 (40-76)	3,209,285,650	854,590	0.063%	0.027%	1.17
PXTABMEX005	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02837	8863	54 (42-72)	3,209,285,650	482,880	0.067%	0.015%	1.15
PXTABMEX006	KH150737.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04353	27052	47 (36-64)	3,209,285,650	1,265,079	0.096%	0.039%	1.12
PXTABMEX006	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02854	8311	50 (40-66)	3,209,285,650	427,531	0.059%	0.013%	1.12
PXTABMEX007	KH150734.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04356	23844	76 (48-76)	3,209,285,650	1,429,861	0.089%	0.045%	1.14
PXTABMEX007	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02851	9206	64 (48-91)	3,209,285,650	626,503	0.071%	0.020%	1.10
PXTABMEX008	KH150733.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04357	27283	48 (36-68)	3,209,285,650	1,043,321	0.219%	0.033%	1.40
PXTABMEX008	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02850	23059	48 (39-62)	3,209,285,650	1,173,071	0.183%	0.037%	1.08
PXTABMEX009	KH150736.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04354	79638	54 (41-76)	3,209,285,650	4,192,855	0.279%	0.131%	1.12
PXTABMEX009	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02853	15876	51 (40-68)	3,209,285,650	871,664	0.121%	0.027%	1.07
PXTABMEX010	KH150735.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTB8XX.F04355	124863	42 (34-56)	3,209,285,650	3,575,252	1.003%	0.111%	1.65
PXTABMEX010	nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02852	81806	49 (40-63)	3,209,285,650	4,239,869	0.717%	0.132%	1.05

ID	Dataset	Damage Patterns									
		JMG 2nd Base	JMG 3rd Base	JMG 4th Base	JMG 5th Base	5JMG 1st Base	3JMG 2nd Base	3JMG 3rd Base	3JMG 4th Base	3JMG 5th Base	3JMG 5th Base 3
PXTABMEX001	KH150731.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04359	0.455%	0.301%	0.220%	0.281%	1.021%	0.635%	0.344%	0.294%	0.184%	
PXTABMEX001	KH150731.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02836	2.828%	1.370%	1.314%	1.438%	3.819%	1.833%	1.791%	1.446%	1.186%	
PXTABMEX002	KH150729.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04361	0.812%	0.581%	0.482%	0.373%	1.628%	0.875%	0.554%	0.443%	0.371%	
PXTABMEX002	KH150729.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02834	10.047%	7.998%	6.067%	4.637%	19.325%	10.937%	7.461%	5.791%	4.647%	
PXTABMEX003	KH150728.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04362	0.952%	0.732%	0.608%	0.390%	1.913%	0.985%	0.592%	0.428%	0.346%	
PXTABMEX003	KH150728.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02833	12.501%	8.440%	6.167%	4.516%	21.066%	12.597%	8.246%	6.255%	4.745%	
PXTABMEX004	KH150730.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04360	1.200%	0.905%	0.811%	0.398%	2.173%	0.946%	0.802%	0.526%	0.334%	
PXTABMEX004	KH150730.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02835	18.248%	12.806%	10.389%	7.325%	29.076%	18.285%	13.274%	10.605%	8.580%	
PXTABMEX005	KH150732.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04358	0.784%	0.794%	0.438%	0.403%	1.584%	1.260%	0.675%	0.333%	0.373%	
PXTABMEX005	KH150732.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02837	10.958%	7.769%	6.287%	4.446%	19.156%	11.265%	10.214%	5.344%	4.754%	
PXTABMEX006	KH150737.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04353	1.696%	0.875%	0.382%	0.392%	2.581%	1.729%	0.711%	0.665%	0.506%	
PXTABMEX006	KH150737.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02854	17.024%	14.708%	10.538%	7.537%	25.873%	18.766%	12.957%	9.881%	8.298%	
PXTABMEX007	KH150734.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04356	0.878%	0.425%	0.315%	0.233%	2.119%	0.652%	0.583%	0.254%	0.235%	
PXTABMEX007	KH150734.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02851	11.335%	6.294%	4.082%	3.163%	18.729%	9.989%	6.647%	4.259%	3.243%	
PXTABMEX008	KH150733.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04357	1.165%	0.842%	0.580%	0.522%	2.248%	1.025%	1.049%	0.655%	0.720%	
PXTABMEX008	KH150733.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02850	14.458%	11.861%	8.954%	6.793%	22.793%	14.194%	10.866%	9.287%	6.489%	
PXTABMEX009	KH150736.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04354	1.249%	0.635%	0.504%	0.385%	1.983%	1.129%	0.668%	0.344%	0.409%	
PXTABMEX009	KH150736.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02853	13.411%	8.840%	7.532%	5.108%	24.057%	13.201%	9.411%	7.534%	5.358%	
PXTABMEX010	KH150735.UDG.shotgun.160610_00124_0015_AHCZNTBBXX.F04355	1.463%	0.693%	0.600%	0.404%	2.611%	1.370%	0.848%	0.536%	0.449%	
PXTABMEX010	KH150735.nonUDG.shotgun.160318_00124_0013.F02852	17.594%	13.603%	10.573%	8.547%	26.440%	16.958%	13.631%	10.555%	7.991%	

ID	Dataset	reads	target	length	target	bp	ref	bp	covered	target	cov>=1	target	cov>=2	mean(DP)	covmean(DP)	al
PUXTABMEX001	KH150731.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04359	49	47	(38-66)	16,568	2463	14.87%	0.79%	1.05	0.16						
PUXTABMEX001	KH150731.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02836	29	59	(49-77)	16,568	1877	11.33%	0.82%	1.07	0.12						
PUXTABMEX002	KH150729.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04361	151	76	(53.5-83.5)	16,568	7917	47.78%	15.66%	1.44	0.69						
PUXTABMEX002	KH150729.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02834	46	64.5	(49.5-87)	16,568	2936	17.72%	2.20%	1.13	0.20						
PUXTABMEX003	KH150728.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04362	193	66	(48-76)	16,568	8901	53.72%	17.83%	1.42	0.76						
PUXTABMEX003	KH150728.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02833	141	63	(48-84)	16,568	7371	44.49%	11.23%	1.30	0.58						
PUXTABMEX004	KH150730.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04360	46	52.5	(40.5-76)	16,568	2490	15.03%	0.87%	1.06	0.16						
PUXTABMEX004	KH150730.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02835	14	56	(48.75-65.25)	16,568	805	4.86%	0.29%	1.06	0.05						
PUXTABMEX005	KH150732.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04358	39	75	(51-83)	16,568	2600	15.69%	0.69%	1.05	0.17						
PUXTABMEX005	KH150732.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02837	11	66	(51.5-76)	16,568	755	4.56%	0.00%	1.00	0.05						
PUXTABMEX006	KH150737.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04353	148	55.5	(40-75.25)	16,568	6929	41.82%	9.45%	1.27	0.53						
PUXTABMEX006	KH150737.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02854	34	62	(48-84.5)	16,568	2085	12.58%	1.00%	1.08	0.14						
PUXTABMEX007	KH150734.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04356	4	79	(72.25-93.25)	16,568	346	2.09%	0.00%	1.00	0.02						
PUXTABMEX007	KH150734.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02851	8	52.5	(41.5-85)	16,568	505	3.05%	0.00%	1.00	0.03						
PUXTABMEX008	KH150733.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04357	5	44	(38-51)	16,568	283	1.71%	0.00%	1.00	0.02						
PUXTABMEX008	KH150733.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02850	12	42.5	(40.75-53.75)	16,568	571	3.45%	0.00%	1.00	0.03						
PUXTABMEX009	KH150736.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04354	45	62	(46-76)	16,568	2651	16.00%	2.30%	1.15	0.18						
PUXTABMEX009	KH150736.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02853	10	63	(43.75-74)	16,568	618	3.73%	0.27%	1.07	0.04						
PUXTABMEX010	KH150735.UDG.shotgun.160610_J00124_0015_AHC2NTBBXX.F04355	39	45	(37-72.5)	16,568	2087	12.60%	0.48%	1.04	0.13						
PUXTABMEX010	KH150735.nonUDG.shotgun.160318_J00124_0013.F02852	45	58	(45-71)	16,568	2685	16.21%	0.86%	1.05	0.17						

11. ANEXO

I. PRIMERA PUBLICACIÓN

Chromosome Res
<https://doi.org/10.1007/s10577-020-09634-1>

ORIGINAL ARTICLE



A novel method of male sex identification of human ancient skeletal remains

María Teresa Navarro-Romero · María de Lourdes Muñoz · Enrique Alcalá-Castañeda · Eladio Terreros-Espinosa · Eduardo Domínguez-de-la-Cruz · Normand García-Hernández · Miguel Ángel Moreno-Galeana

Received: 27 March 2020 / Revised: 19 June 2020 / Accepted: 23 June 2020
 © Springer Nature B.V. 2020

Abstract Sex identification of ancient individuals is important to understand aspects of the culture, demographic structure, religious practices, disease association, and the history of the ancient civilizations. Sex identification is performed using anthropometric measurements and molecular genetics techniques, including quantification of the X and Y chromosomes. These

approaches are not always reliable in subadult, or fragmented, incomplete skeletons or when the DNA is highly degraded. Most of the methods include the identification of the male and female sexes, but the absence of a specific marker for the males does not mean that the sample obtained was from a female. This study aims (1) to identify new male-specific regions that allow male identification; (2) to contrast the effectiveness of these markers against AMELX/AMELY and anthropometric measurement procedures; and (3) to test the efficacy of these markers in archaeological samples. For the first two aims, we used known sex samples, and for the third aim, we used samples from different archaeological sites. A novel molecular technique to identify male-specific regions by amplification of *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, and *TTY22* genes of the human Y chromosome was developed. The results showed amplification of the specific DNA regions of Y chromosome in male individuals, with no amplification being observed in any of the female samples, confirming their specificity for male individuals. This approach complements the current procedures, such as the AMELX/AMELY test and anthropometric principle.

Responsible Editor: Irina Solovei

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10577-020-09634-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. T. Navarro-Romero · M. d. L. Muñoz · E. Domínguez-de-la-Cruz · M. Á. Moreno-Galeana
 Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, C.P. 7360, Mexico City, Mexico
 e-mail: lmunoz@cinvestav.mx

E. Alcalá-Castañeda
 Department of Archaeological Studies, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Lic. Verdad 3, Centro Histórico, 06000 Mexico City, Mexico

E. Terreros-Espinosa
 Templo Mayor Museum, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Seminario 8, Centro Histórico, 06060 Mexico City, Mexico

N. García-Hernández
 Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freud”, Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, Doctores, 06720 Mexico City, Mexico

Keywords Y chromosome; · Ancient DNA; · AMEL test; · Male sex identification; · Pre-Hispanic bone remains

Abbreviations

Chr-X X chromosome
 Chr-Y Y chromosome

Published online: 03 July 2020

Springer

Introduction

The current method used to sex determine ancient human remains is anthropometric measurements of the bones, such as skull, pelvis, vertebrae, teeth, long bones, and the pars petrosa ossis temporalis (Ovchinnikov et al. 1998; Graw et al. 2005; Veroni et al. 2010; Harris and Case 2012; Krishan et al. 2016; Ubelaker and DeGaglia 2017; Hora and Sládek 2018; García-Campos et al. 2018a, b). Sex determination using this method is more accurate in adult whole-body skeletons, than in the subadult skeletons, and very old or fragmented bone remains (Álvarez-Sandoval et al. 2014) because the anatomical differences between men and women are more clearly distinguished after the onset of puberty due to adolescent hormonal changes. These female characteristics begin to develop at different ages and ageing process can be affected by nutritional status and related socioeconomic factors. In many cases, these anthropometric methodologies do not yield conclusive results in subadult individuals. On the other hand, in modern humans, secondary sexual traits usually emerge in the skull or postcranial skeleton during adolescence. Female characteristics begin to develop at different ages with the ageing process also being affected by nutritional status and related socioeconomic factors (Moore 2013; Candelas-González et al. 2017).

Similar procedures are used in the sex identification of newborns, and subadults, although the accuracy of sex estimation is lower in subadult than adult skeletons (Fazekas and Kósa 1978; Schutkowski 1987; Luna et al. 2017). Sexing can be also performed in 66% of the specimens with skulls that have been largely destroyed, using the usually well-preserved pars petrosa ossis temporalis of skulls (Graw et al. 2005). Furthermore, sex was correctly assigned in male maxillary canines of subadults that contained greater amounts of dentine (García-Campos et al. 2018a, b). Still, these methods are useless in very fragmented adult, and subadult bones, or when the adequate bone remains are not available (Álvarez-Sandoval et al. 2014).

There are several molecular methods to determine sex, such as the amelogenin test based on the amplification of the *AMEL* gene in the X and Y chromosomes (*AMELX/AMELY*) (Stone et al. 1996; Tschentscher et al. 2008; Gibbon et al. 2009; Álvarez-Sandoval et al. 2014). The *AMEL* locus has 2 homologous genes: *AMELX*, which is located on the distal short arm of X chromosome (Chr-X) (p22.1-p22.3), and *AMELY*,

which is located near the centromere of the Y chromosome (Chr-Y) (p11.2). These genes have 89% homology, with there being a 6-bp deletion in the third intron of *AMELX* which is absent in *AMELY* (Stone et al. 1996; Butler and Li 2014; Álvarez-Sandoval et al. 2014; Dutta et al. 2017). The amplification of other genes, such as *DXYS156*, *SOX3*, *STS*, and *TSPYL2* (Bashamboo et al. 2003; Butler and Li 2014), are also used for the sex determination of ancient remains. However, the limitation of this and other molecular methods is DNA degradation, which depends on the archaeological context and bone sample (Quincey et al. 2013; Álvarez-Sandoval et al. 2014; Gaudio et al. 2019). Sex identification of ancient human remains was recently performed using the quantification of sequences that are aligned with Chr-Y and Chr-X by considering that males have half of the amount of DNA that corresponds to Chr-X compared to females (Green et al. 2010; Skoglund et al. 2012, 2013). Sex determination with this methodology was obtained by massive sequencing and the exclusion of the homologous regions in both chromosomes (Green et al. 2010; Skoglund et al. 2013). However, the read depth must be reasonably high to avoid any confounding effects due to sequencing errors.

Chr-Y typically determines male sex in humans. It is the third smallest chromosome comprising ~2–3% of the haploid genome (Quintana-Murci and Fellous 2001; Halder et al. 2017). It is composed of a pseudoautosomal portion (PAR) that is divided into the two regions: PAR1, located in the terminal region of the short arm (Yp11.32), and PAR2, located in the long arm (Yq12). The pseudoautosomal regions can recombine with the pseudoautosomal region of Chr-X (Xp22.3 and Xq28) during meiosis (Quintana-Murci and Fellous 2001; Bashamboo et al. 2003; Halder et al. 2017). PAR1 and PAR2 represent ~5% of the whole chromosome, with the remaining ~95% corresponding to the non-recombinant region of human Chr-Y (NRY). Genes in the NRY region are classified into two categories. The first region is comprised of genes that are ubiquitously expressed, show homology with Chr-X, and exhibit housekeeping cellular functions. The second region includes genes with specialized functions that are expressed in the testes (Halder et al. 2017).

The development of new and improved methodologies for sex estimation and the reevaluation of existing methods is very important for both ancient and forensic researchers to achieve more accurate results. The objective of this study was to develop an alternative

technique. For this, we selected four genes from fifteen Chr-Y-specific genes in contemporary male samples in silico. These male-specific DNA markers were experimentally tested in contemporary and ancient samples from individuals found in Tacotalpa, Tabasco, Mexico. The results confirmed that these regions were specific to the male sex.

Materials and methods

Contemporary samples

The present study contained ten contemporary samples (five males and five females) from peripheral blood obtained from the “Servicio de Medicina Interna” of the Regional Hospital by Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). The samples were registered to project number 2017-785-071, and the National Ethics Commission (IMSS) ethics committee approved the study with the number and R-2017-785-071. The tests were performed by following the rules established in the Helsinki Declaration. All data were kept strictly confidential, as indicated by national and international regulations. The participants were informed about the procedure prior to providing their written consent.

Archaeological material

The study contained nineteen samples discovered in three different archaeological sites in the municipality of Tacotalpa in Southern Tabasco (Supplementary Table 1). Ten of these samples were found at the Puyil cave located at San Felipe Mountain in Puxcatán town at the coordinates 17° 27' 38.04" N and 92° 39' 28.5" W; seven samples were located at the Abrigo Rocosó Fidencio López, Ejido Lázaro Cárdenas, at the coordinates 17° 31' 21.35" N and 92° 47' 54.21" W; and two samples were located at the Sima Cuesta Chica, Ejido la Pila, at the coordinates 17° 26' 33.59" N and 92° 44' 31.53" W. Figure 1 shows the geographic locations of all ancient samples. The archaeological samples recovered from the Puyil cave were found by Luis Alberto Martos-López in 2007 and Abrigo Rocosó Fidencio López and Sima Cuesta Chica by Eladio Terreros-Espinosa in 2016.

The sex was determined in fifteen of the samples using anthropometric measurements as described previously and according to conservation of the bone (Bass 1987; White and Folkens 2005; Blau and Ubelaker 2009; Ubelaker 2014).

Pretreatment of ancient samples

To eliminate exogenous DNA and surface contaminants, each sample was washed by rinsing in water, and the samples then incubated for 5 min with 10% full-strength Clorox bleach. The supernatant was discarded, the sample was incubated in distilled water for 5 min, and the water was then discarded. After the 3rd rinse with distilled water, the sample was dried by incubation at 37 °C overnight.

All experiments were performed in a clean room, according to the guidelines of working with ancient remains (Adler et al. 2011; Campos et al. 2012). The clean room was routinely cleaned with bleach and equipped with a UV light. All containers were wiped with bleach before and after being placed in the laboratory.

DNA extraction

Contemporary DNA extraction was performed in duplicate using magnetic beads (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) with the Prepito DNA Blood250 Kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and the Prepito-D instrument (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. The extracted DNA was maintained at -70 °C. One negative control without DNA was used during the entire process.

Ancient DNA (Supplementary Table 1) was extracted from 20 mg of bone powder by incubation in 200 µl of lysis buffer and 6 µl proteinase K under gentle rotation at 56 °C until lysis was completed, following the manufacturer's instructions (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Aliquots of the extracted DNA were maintained at -70 °C until use. Ancient DNA was also extracted in duplicate from 50 mg of bone powder via incubation in 500 µl ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; pH 8, 0.5 M) and 20 µl proteinase K (0.25 mg/ml) under gentle rotation at 37 °C overnight. The supernatant obtained following centrifugation was used for DNA extraction with silica (silicon dioxide; Sigma) as previously described by Rohland and



Fig. 1 Location of pre-Hispanic samples from Tacotalpa, Tabasco, that belonged to individuals from the Mesoamerican region. The samples were found in the ARFL (Abrigo Rocosó Fidencia López), SCC (Sima Cuesta Chica), and the PC (Puyil

cave) at the coordinates 17° 31' 21.35" N and 92° 47' 54.21" W; 17° 26' 33.59" N and 92° 44' 31.53" W; and 17° 27' 38.04" N and 92° 39' 28.5" W, respectively

Hofreiter (2007). Purified DNA was eluted in 50 μ l TE buffer, and 20 μ l aliquots were stored at -70°C until use. This method was also performed in the Insectary at CINVESTAV-IPN, where human DNA is not handled. One negative control without DNA was used during the entire procedure. The ancient DNA extracted, amplified, and then sequenced were used for haplogroup identification and replication in four samples from Puyil cave in the Department of Anthropology, University of Kansas, Lawrence, KS. This laboratory is specific to work with ancient DNA. Results were the same from both laboratories.

Analysis of the Y chromosome in silico

The non-homologous regions of the X and Y chromosomes of the reference sequence CRs_human_hg38/Chr Y (NC_000024.10) were analysed using IGV software (Thorvaldsdóttir et al. 2013; Integrative Genomics Viewer 2018) to identify the regions specific to Chr-Y. Table 1 shows the sequences identified in the following fifteen genes: *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, *TTY22*, *USP9Y*, *UTY*, *NLGN4Y*, *TTY14*, *FAM41A1*, *AC007359.1*, *TTY4*, *PBY2B*, *DAZ1*, *DAZ3*, and *DAZ4*. The sequences were classified into the following 3 groups:

(1) the sequence was present only in Chr-Y; (2) the sequence showed similarity with Chr-X; and (3) the sequence was also identified in autosomal chromosomes (Fig. 2).

Male identification using specific Chr-Y sequences

To demonstrate that the region identified in this study was specific to male individuals, a pair of primers (F_TTTY7-R_TTTY7) specific for the *TTY7* gene were designed to amplify a 140-bp fragment from nucleotides 6453443–6453582. A specific pair of primers (F_TSPY3-R_TSPY3) for *TSPY3* amplified a fragment of 121 bp from nucleotides 9400901–9401021. A specific pair of primers (F_TTTY22-R_TTTY22) for *TTY22* amplified a fragment of 124 bp from nucleotides 9811189–9811312, and a specific pair of primers (F_TTTY2-R_TTTY2) for *TTY2* amplified a fragment of 133 bp from nucleotides 9738313–9738445 (Table 2). All primer sets were designed using the program PrimerX-Bioinformatics.org. The contemporary DNA samples were tested with the primer set designed to target the Chr-Y-specific regions to confirm the effectiveness of male sex identification. The following PCR conditions using the enzyme Phusion Hot Start II Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used: 98 °C for 30 s; 35 cycles at 98 °C for 10 s, 60.5 °C or 61.5 °C (according to the primer pair used; Table 2) for 30 s, and 72 °C for 20 s; and 72 °C for 10 min. After optimization and confirmation of this procedure in the contemporary samples, this assay was tested on the DNA of ancient bone samples at least in triplicate.

Sanger sequencing was performed using the forward and reverse primers (Table 2) following the manufacturer's instructions for the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Female and male sex identification using the *AMEL* gene (*AMELX/AMELY*)

Sex was determined via amplification of the *AMEL* gene (*AMELX/AMELY*) in contemporary human samples using the specific pairs of primers shown in Table 2. Amplicons of 130 bp and 170 bp indicated female and male sex, respectively. After sex identification of the

contemporary samples, the test was performed on the ancient bone samples. PCR amplification was performed using the enzyme Phusion Hot Start II Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with the following conditions: 98 °C for 30 s; 35 cycles at 98 °C for 10 s, 52 °C for 30 s (Table 2), and 72 °C for 20 s; and 72 °C for 10 min (Lin et al. 1995).

Results

Analyses of X and Y chromosomes for male sex identification

The *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, *TTY22*, *USP9Y*, *UTY*, *NLGN4Y*, *TTY14*, *FAM41AY1*, *AC007359.1*, *TTY4*, *PBY2B*, *DAZ1*, *DAZ3*, and *DAZ4* genes specific for Chr-Y (Stelzer et al. 2016; GeneCards-Human Genes n.d.) were analysed using IGV software (Thorvaldsdóttir et al. 2013; Integrative Genomics Viewer 2018) to identify the regions not homologous with Chr-X and autosomal chromosomes (Table 1). The regions specific to Chr-Y, selected to identify the male sex, were in the following genes: *TTY7* from nucleotide sites 6453472–6453552 and 6457811–6457861; *TSPY3* from nucleotide sites 9712721–9712755, 9340012–9340052, and 9338261–9338286; *TTY2* from nucleotide sites 9738350–9738414 and 9740557–9740591; and *TTY22* from nucleotide sites 9811090–9811129 and 9811192–9811267 (Table 1).

Amplification of *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, and *TTY22* gene-specific regions for Chr-Y in contemporary human samples using PCR

To verify the specificity of the sequences selected for each gene in identifying males, amplicons of 140, 121, 124, and 133 bp were obtained for *TTY7* (from nucleotides 6453443–6453582), *TSPY3* (from nucleotides 9400901–9401021), *TTY22* (from nucleotides 9811189–9811312), and *TTY2* (from nucleotides 9738313–9738445), respectively. Female and male contemporary samples were used to optimize the test. The expected molecular band size for each gene in the male samples and the absence of the band in the female samples were observed, as shown in Fig. 3. This test was also repeated in ten contemporary DNA samples from

Table 1 Description of 15 genes of Chr-Y analysed to select specific sequences that allow the identification of the male sex

^a Chr-Y Gen	Sequence	Sequence length (bp)	^b Function of gene	Query cover with Chr-X (bp)	^c Autosomal Chr's
TTY7	6453472–6453552	81	◆Testis-specific transcript Y-linked 7	0	0
6449468–6457906 8439 bp	6457811–6457861	51		0	0
TSPY3	9712721–9712755	35	Testis-specific Y-encoded protein 3	0	0
9398421–9401223 2803 bp	9340012–9340052	41		0	0
	9338261–9338286	26		0	0
TTY2	9738350–9738414	65	◆Testis-specific transcript Y-linked 2	0	0
9736286–9758476 22,191 bp	9740557–9740591	35		0	0
TTY22	9811090–9811129	40	◆Testis-specific transcript Y-linked 22	0	0
9801153–9813245 12,093 bp	9811192–9811267	76		0	0
USP9Y	12761218–12761250	33	Ubiquitin-specific peptidase 9 Y-linked	100.0% (33)	0
12701231–12860844 159,614 bp	12852196–12852244	49		95.91% (47)	0
	12783154–12783189	36		51.28% (20)	0
UTY	13283351–13283407	57	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat Y-linked	85.96% (49)	0
13233920–13480673 246,754 bp	13356296–13356423	128		89.06% (114)	0
	13479887–13479942	56		42.86% (24)	0
	13378902–13378976	75		76.00% (57)	0
NLGN4Y	14564733–14564782	50	Neuroigin 4 Y-linked	90.00% (45)	0
14522573–14845650 323,043 bp	14641102–14641191	90		92.22% (83)	0
	14530587–14530660	74		85.14% (63)	0
	14602714–14602806	93		43.01% (40)	0
TTY14	18993204–18993243	40	◆Testis-specific transcript Y-linked 14	82.50% (33)	0
18872501–19077547 205,047 bp	19040591–19040663	73		89.04% (65)	0
	19051191–19051266	76		71.05% (54)	0
	19076468–19076542	75		28.00% (21)	0
FAM41AY1	18390242–18390268	27	◆Family with sequence similarity 41 member A, Y-linked 1	0	5 and 16
17500958–17516742 15,785 bp	17514463–17514535	73		0	1, 3, 4, 9, and 18
	18391477–18391549	73		0	1, 3, 4, 9, and 18
AC007359.1	22122477–22122552	76	◆Uncharacterized LOC101929148	0	7, 9, 16, and 17
22100814–22147484 46,671 bp	22108467–22108519	53		0	7, 11, and 17
	22477887–22477939	53		0	7, 11, and 17
	22102367–22102415	49		0	7, 12, and 17
TTY4	22960559–22960618	60	◆Testis-specific transcript Y-linked 4	0	2, 7, 8, and 19
22936455–22973284 36,830 bp	24586517–24586573	57		0	7 and 8
	24587660–24587731	72		0	7, 8, 16, and 19
	25070310–25070384	75		0	7–9, 14, 17, and 20

A novel method of male sex identification of human ancient skeletal remains

Table 1 (continued)

^a Chr-Y Gen	Sequence	Sequence length (bp)	^b Function of gene	Query cover with Chr-X (bp)	^c Autosomal Chr's
BPY2B 24607560–24639207 31,648 bp	23005338–23005470	133	Encodes a protein that interacts with ubiquitin protein ligase E3A	0	7 and 8
	24619544–24619592	49		0	21 and 2
	24622023–24622064	42		0	8
	23000633–23000734	102		0	7, 8, and 19
DAZI 23129355–23199123 69,769 bp	23139613–23139688	76	Encodes an RNA-binding protein that is important for spermatogenesis	0	3 and 4
DAZ3 24763069–24813505 50,437 bp	23267233–23267285	53	Encodes an RNA-binding protein that is important for spermatogenesis	0	3 and 8
	24773336–24773411	76		0	3, 7, and 4
	23257864–23257932	69		0	3
	24771932–24772044	113		0	1, 7, and 10
DAZ4 24833800–24907040 73,241 bp	24835630–24835705	76	Encodes an RNA-binding protein that is important for spermatogenesis	0	2 and 3
	24896627–24896702	76		0	2, 7, 8, and 12
	24851394–24851450	57		0	3

^aThe genomic locations of GRCh38.p12

^bThe information of GeneCards (Stelzer et al. 2016)

^cThe sequence was covered in a percentage between 20 and 50% of the autosomal chromosomes

♦This region is transcribed as a non-coding RNA

five males and five females to confirm our results. The minimal amount of DNA needed to obtain a reliable determination of males with contemporary DNA was 3 ng/μl. The PCR products were sequenced by Sanger, which confirmed the specific amplification of the *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, and *TTY22* gene regions (GenBank accession numbers: MEXCHRYTTY22, MN385559; MEXCHRYTTY7, MN385560; MEXCHRYTSPY3, MN385561; MEXCHRYTTY2, MN385562).

PCR amplification of *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, and *TTY22* sequences from ancient pre-Hispanic samples

The bone remains of this study were discovered in 2007 and 2016 at the following sites: Puyil cave, Abrigo Rocosó Fidencio López, and Sima Cuesta Chica in Tacotalpa, Tabasco, Mexico. Due to the archaeological context, cave environmental conditions, and body-skeleton integrity, the sex

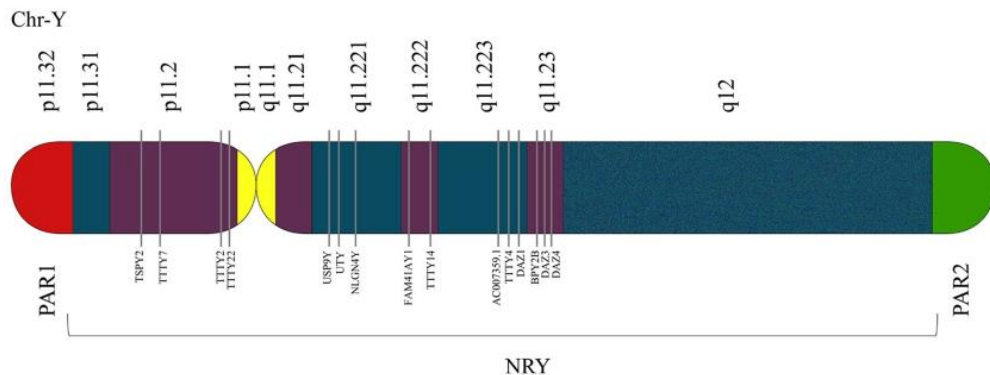


Fig. 2 Schematic representation of Chr-Y shown in the PAR1, PAR2, and NRY regions, and the location of the 15 genes used to find specific sequences to identify the male sex in ancient samples

Table 2 Primers used to identify the male sex in contemporary and ancient human samples

Primer	Sequence 5'–3'	Gene	Fragment size (bp)	Tm (°C)	Reference
F_rcaX ₁	AATCATCAAATGGAGATTG	<i>AMELX</i>	130	52	Lin et al. 1995
R_rcaX ₂	GTTTCAGCTCTGTGAGTGAAA				
F_rcaY ₁	ATGATAGAAACGGAAATATG	<i>AMELY</i>	170	52	Lin et al. 1995
R_rcaY ₂	AGTAGAATGCAAAGGGCTC				
F_TTTY7	CTGAGGCTGTGTGTTTGTGC	<i>TTY7</i>	140	60.5	Used in this study
R_TTTY7	CCTGGGAGTTGTAGGGTTGA				
F_TSPY3	CACAAATGGGGAAGGGATA	<i>TSPY3</i>	121	61.5	Used in this study
R_TSPY3	ACAACCTGGGAGTCCCCTAGA				
F_TTTY22	GGGGAGTGATGTAGCTGTGG	<i>TTY22</i>	124	61.5	Used in this study
R_TTTY22	TTTTGGTCTTTTCATAAACATCAT				
F_TTTY2	AGAACCCTCAACGACACACC	<i>TTY2</i>	133	60.5	Used in this study
R_TTTY2	AGGGAGAGGCATTTCAGAC				

Primer sequences used for *AMELX* amplification for female sex identification, and *AMELY*, *TTY7*, *TSPY3*, *TTY22*, and *TTY2* amplification for male sex identification

identification was determined in all samples using the new molecular approach developed in this study, the AMEL test, and anthropometric measurements.

The sex of the bone samples from Tabasco was determined via amplification of the *TTY7*, *TSPY3*, *TTY22*, and *TTY2* genes. The minimal amount of DNA needed to amplify the specific region in Chr-Y in human ancient samples was 15 ng/μl. None of the ancient samples showed amplification of the *TTY22* gene. From a total of nineteen ancient samples, fourteen showed amplification of *TTY2* (Fig. 4a), eleven showed amplification of *TTY7* (Fig. 4b), and eight showed amplification of *TSPY3* (Fig. 4c), as shown in Table 3. These results indicated that all samples from Puyil belonged to males (Fig. 4). The samples from Abrigo Rocoso Fidencio López showed amplification of the specific amplicon for Chr-Y in four of the samples, and one sample from Sima Cuesta Chica was a male positive (Fig. 4), which confirms that at least these

samples belonged to males. Four of the samples did not show amplification of any of these genes.

Sex identification using the AMELX/AMELY test

To determine the sex of contemporary and ancient samples using molecular techniques, specific regions of the X and Y chromosomes were amplified according to previous publications using the AMELX/AMELY test as described in the “Materials and methods” section (Lin et al. 1995; Ovchinnikov et al. 1998; Tschentscher et al. 2008; Gibbon et al. 2009; Dutta et al. 2017). This procedure produced amplicons of 130 bp for female and 130 and 170 bp for male contemporary DNA samples. The amplicons for Chr-X and Chr-Y in all contemporary samples are shown in Fig. 5a. All ancient samples from the Puyil cave were positive for Chr-X, and four of the samples were positive for Chr-Y (PUXTABMEX001–PUXTABMEX004) (Fig. 5b).

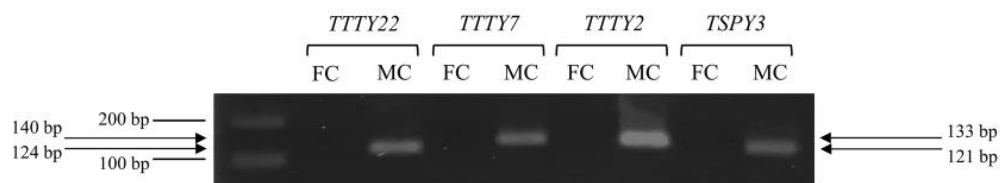


Fig. 3 Amplification of specific regions in the *TTY22*, *TTY7*, *TTY2*, and *TSPY3* genes to identify male sex in contemporary human DNA samples. The DNA was amplified using the specific primers to amplify each region of Chr-Y in contemporary human samples. The specific amplicon size is indicated by the arrows on

the right side, and the molecular marker is displayed on the left side. (FC) Female DNA sample (negative control). The specific amplifications for *TTY22*, *TTY7*, *TTY2*, and *TSPY3* genes with sizes of 124, 140, 133, and 121 bp, respectively, are shown as indicated in top of the figure

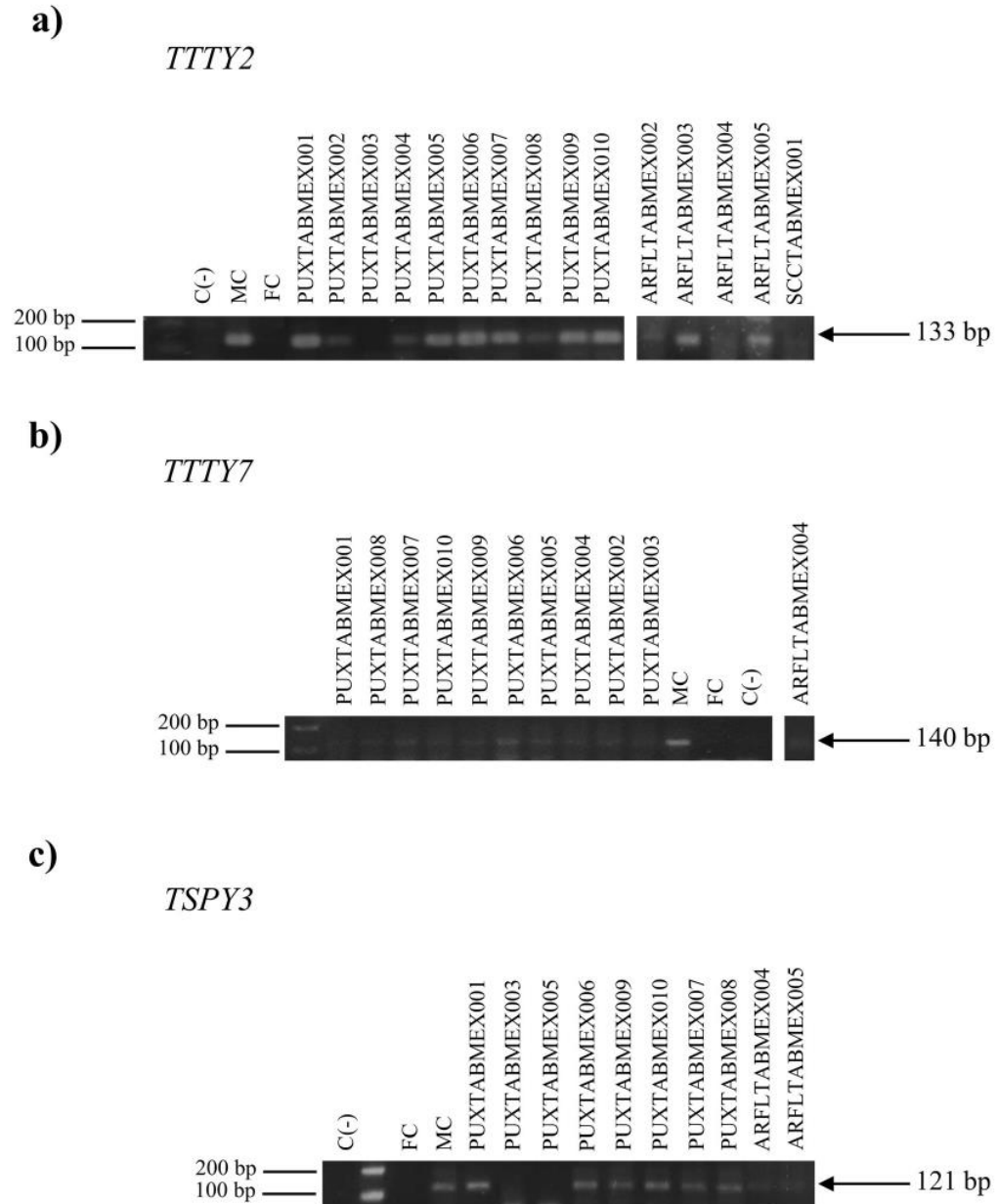


Fig. 4 Amplification of the specific regions in *TTTY2*, *TTTY7*, and *TSPY3* genes to identify male sex in ancient human DNA samples. The pre-Hispanic samples from the geographic areas Puyil cave, Abrigo Rocosó Fidencio López, and Sima Cuesta Chica were tested to determine male sex via amplification of the specific regions in *TTTY2*, *TTTY7*, and *TSPY3* genes. **a** Amplification of the specific region in *TTTY2* gene displaying the specific band of 133 bp. **b** Amplification of the specific region in *TTTY7* gene displaying the specific band of 140 bp. **c** Amplification of the

specific region in *TSPY3* gene displaying the specific band of 121 bp. Female ancient DNA was used as a negative control (FC), displayed an absence of any specific band, and male ancient DNA was used as a positive control showing the amplification of the specific band in each gene (MC), and the negative control with no DNA shows the absence of any amplification band (-). The size of the specific amplicon is indicated on the right side of each panel and the molecular weight markers on the left side. The name of each sample is indicated on the top of each line

Table 3 Sex identification using different approaches in ancient samples. Sex identification in pre-Hispanic samples from Tacotalpa, Tabasco, was performed via amplification of the specific regions in the *TTY2*, *TSPY3*, *TTY7*, and *AMELX/AMELY* genes and the anthropometric measurement method as indicated in each column

ID	TTY2	TTY7	TSPY3	AMELX/ AMELY		Sex determine by anthropometric measurement/bone sample	Assigned sex
	Male			X	Y		
PUXTABMEX001	+	+	+	+	+	Male/full skeleton*	Male
PUXTABMEX006 ^{&}	+	+	+	+	-	Male/skull**	Male
PUXTABMEX007	+	+	+	+	-	Male/skull**	Male
PUXTABMEX008	+	+	+	+	-	Male/skull**	Male
PUXTABMEX009 ^{&}	+	+	+	+	-	Male/skull**	Male
PUXTABMEX010	+	+	+	+	-	Female/skull**	Male
ARFLTABMEX004	+	+	+	+	-	Female/fragmented jaw	Male
PUXTABMEX005	+	+	-	+	-	Male/full skeleton*	Male
PUXTABMEX004 ^{&}	+	+	-	+	+	ND/ fragmented skull	Male
PUXTABMEX002	+	+	-	+	+	Male/full skeleton*	Male
SCCTABMEX001	+	-	-	+	+	Male/coxal bone femur	Male
PUXTABMEX003	-	+	-	+	+	Female/Vertebrae	Male
ARFLTABMEX005	+	-	+	-	-	Male /coxal bone femur	Male
ARFLTABMEX002	+	-	-	-	-	Male/coxal bone femur	Male
ARFLTABMEX003	+	-	-	+	-	ND/bone fragment	Male
ARFLTABMEX001	-	-	-	+	+	Male/right iliac	Male
ARFLTABMEX006	-	-	-	+	+	Male/coxal bone femur	Male
ARFLTABMEX007	-	-	-	+	+	ND/bone fragment	Male
SCCTABMEX002	-	-	-	+	+	ND/bone fragment	Male

No label indicates that remains are from the Classic period. Supplementary Table 1 shows the bone remain used to obtain the DNA used in the molecular studies

ND not determined because of bone fragmentation, poor preservation of bone fragment, or the remains were of a subadult very fragmented bone remains

*Skeletons without skulls

**Skulls without skeletons

[&] Samples from the Archaic period

Five ancient samples from Abrigo Rocosó Fidecio López were positive for Chr-X (ARFLTABMEX001, ARFLTABMEX003, ARFLTABMEX004, ARFLTABMEX006, and ARFLTABMEX007), and three of these samples were positive for Chr-Y (ARFLTABMEX001, ARFLTABMEX006, and ARFLTABMEX007) (Fig. 5c). The two ancient samples from Sima Cuesta Chica were positive for Chr-X and Chr-Y (SCCTABMEX001 and SCCTABMEX002) (Fig. 5c). These results suggest that at least nine of the nineteen samples corresponded to the males using the AMELX/AMELY test (Fig. 5). The Chr-X amplicon was observed in eight samples, but this

result does not indicate that these samples corresponded to the females because DNA that matches the Chr-Y region may be degraded.

Sex identification by anthropometric measurements

The bone remains used in this study for each sample and the results of the sex identification of fifteen of the samples that were subjected to anthropometric measurements are displayed in Table 3 and Supplementary Table 1. The sex was determined in fifteen of the samples using anthropometric measurements as described in the “Materials and methods” section and according to conservation of the bone remains. Twelve of the fifteen

A novel method of male sex identification of human ancient skeletal remains

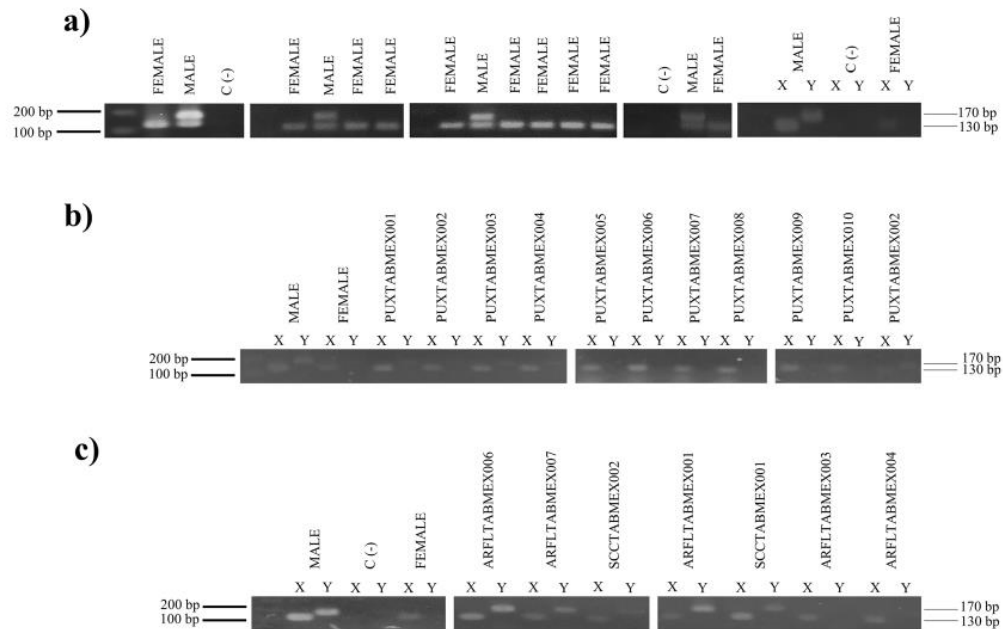


Fig. 5 Sex identification using the AMELX/AMELY test. To determine the sex of contemporary and ancient samples, specific regions of the X and Y chromosomes of female and male genomes were amplified according to previous publications using the AMELX/AMELY test described in the “Materials and methods” section. This procedure showed amplicons of 130 bp for females and 130 and 170 bp for males in contemporary DNA samples. **a** The amplicons for X and Y chromosomes in contemporary

samples using the AMELX/AMELY test are shown; the arrows show amplicons of 130 bp for females (Chr-X) or 130 (Chr-X) and 170 bp (Chr-Y) for males. The amplicons in ancient samples from the archaeological sites are shown in **b** the Puyil cave, **c** Abrigo Rocoso Fidencio López, and Sima Cuesta Chica. The amplicon sizes are shown by the arrows on the right side, and the molecular weights are shown on the left side

bone samples characterized using this approach were found to be from males. The sex identification of five of these ancient samples was confirmed using the amelogenin test, and ten of the samples were confirmed using the anthropometric procedure.

Discussion

To correctly identify males in ancient samples, we developed a new approach to identify males in ancient samples using the amplification of four specific regions in the *TTY7*, *SPY3*, *TTY2*, or *TTY22* genes of Chr-Y that are absent in the Chr-X and autosomes. The analysis of these four genes using IGV software (Thorvaldsdóttir et al. 2013; Integrative Genomics Viewer 2018) indicated that they are exclusively found in males. The results of this study confirmed the specificity of this region for the male sex in samples of contemporary human DNA (Fig. 3). Confirmation of the specificity for male was demonstrated as well as the

absence of the amplification of these genes in contemporary DNA samples from females.

The *TTY7* gene region encodes a non-coding RNA (Y-linked 7) (Stelzer et al. 2016; GeneCards-Human Genes n.d.) and was amplified from contemporary and ancient human DNA samples from Mexico (Fig. 4b), confirming the male sex in eleven of the ancient samples, nine from the Puyil cave, and two from Abrigo Rocoso Fidencio López.

The *SPY3* gene, which encodes the male-specific protein Y-linked 3 gene (Stelzer et al. 2016; GeneCards-Human Genes n.d.) showed amplification of the specific region in eight of the ancient samples, six from the Puyil cave, and two from Abrigo Rocoso Fidencio López (Fig. 4c), indicating that they were males.

The *TTY2* gene, which is transcribed into a non-coding RNA (Y-linked 2) (Stelzer et al. 2016; GeneCards-Human Genes n.d.), was amplified in nine samples from the Puyil cave, four samples from Abrigo Rocoso Fidencio López, and one sample from Sima Cuesta Chica (Fig. 4a).

The *TTY22* gene, which is transcribed into a testis-specific non-coding RNA (Y-linked 22) (Stelzer et al. 2016; GeneCards-Human Genes n.d.), did not amplify in any of the ancient samples, which may be related to allelic dropout (Takayama et al. 2009; Kim et al. 2013; Stevens et al. 2017) or DNA degradation in ancient DNA samples. Ancient DNA degradation depends on the environmental conditions and the microbial activity in the decaying tissues (Lindahl 1993). Environmental conditions that favour ancient DNA survival from tissues are low temperatures and dryness, which would limit hydrolytic and oxidative processes (Lindahl 1993; Dabney et al. 2013). Overrepresented purines (depurination) at positions adjacent to the breaks in the ancient DNA may also contribute to its degradation (Willerslev and Cooper 2005; Briggs et al. 2007). Consequently, this DNA region is not a good candidate to determine the male sex in ancient samples.

AMELX/AMELY was also tested to specifically identify sex (Stone et al. 1996; Esteve-Codina et al. 2008; Butler and Li 2014; Dutta et al. 2017). The results from using the AMELX/AMELY method indicated that nine of the samples were males, and eight samples may be females.

Anthropometric measurements of bones (Stone et al. 1996; Veroni et al. 2010; Harris and Case 2012; Krishan et al. 2016; Ubelaker and DeGaglia 2017; Hora and Sládek 2018; García-Campos et al. 2018a, b) have been largely used to identify sex. Fifteen of the nineteen samples were tested for sex determination using the anthropometric measurements and results showed twelve males and three females. It is worth emphasizing that the method of sex identification using anthropometric measurements of full adult skeletons, a coxal femur bone, a right iliac bone, and three out of four skulls correctly identified males. These results are in agreement with previous studies that successfully identified the sex of adult full skeletons and coxal femur bones (Ovchinnikov et al. 1998; Veroni et al. 2010; Harris and Case 2012; Krishan et al. 2016; Ubelaker and DeGaglia 2017; Hora and Sládek 2018; García-Campos et al. 2018a, b). Similar approaches have been also used in the sex determination of newborns and subadults. However, they are more laborious than the sex identification of adult skeletons and their accuracy of sex identification estimation is lower in subadult than in adult skeletons (Fazekas and Kósa 1978; Schutkowski 1987; Luna et al.

2017). Therefore, the molecular procedures should be preferred when skeletons or useful bone remains are not available for sex determination.

Amplification of the specific regions in the *TTY7*, *TSPY3*, or *TTY2* genes from ancient bone samples was positive in fifteen of the nineteen samples (Table 3). Four of these fifteen samples were also positive using the AMELX/AMELY procedure, and nine samples were positive using the anthropometric measurement method. Four samples that were negative for all the male-specific DNA markers proposed to identify males in the ancient samples were positive for the AMELX/AMELY test, and two of these samples were also positive using the anthropometric measurement method.

The molecular procedures developed in this study used along with the AMELX/AMELY and anthropometric measurements are very useful in confirming the male sex from the samples. From a total of nineteen samples in the present study that were identified as males, seven samples showed the specific amplicons for the three genes of this study; four samples showed two of the specific gene regions; and four samples showed one of the specific gene regions, which gives a total of fifteen samples positive for male identification. Four samples of a total of nineteen which were not amplified any of the three new gene regions proposed in this study tested positive for Chr-Y using the AMELX/AMELY method. Although seventeen samples showed the amplicon for Chr-X, only nine of these samples were identified as males using the AMELX/AMELY method (Table 3). Therefore, the method developed here is complementary and accurate in identifying males from ancient samples and/or useful for forensic analysis. These results also indicate that the AMELX/AMELY method is not always accurate in identifying males. This may be due to deletion of a large fragment and mutations of the amelogenin gene in the Y-homologue, which results in the process known as allelic dropout that leads to gender typing errors (Esteve-Codina et al. 2008; Takayama et al. 2009; Kim et al. 2013; Stevens et al. 2017). This depends on the type of population, possibly specific to the lineage, and inherited deletions (Kashyap et al. 2006). Similarly, failure of the amplification of the *TTY22* gene may be due to allelic dropout or DNA degradation of ancient DNA samples.

Molecular procedures are very important to identify sex in ancient and forensic samples using the specific *TTY7*, *TSPY3*, or *TTY2* genes and the

AMELX/AMELY test (Table 3) in addition to anthropometric measurements when a correct bone sample is available. Therefore, we recommend sex identification by the simultaneous use of molecular procedures for the *TTY7*, *TSPY3*, or *TTY2* gene male-specific DNA markers identified in this study and the AMELX/AMELY test.

The molecular identification method has certain advantages over morphometric methods, because it is not affected by individual variation in the size and the morphology of skeletal materials. It can be used to identify sex from foetal and subadult remains and is not restricted by physical fragmentation, requiring only one complete bone or tooth for sex determination. However, molecular methods have several constraints: (a) molecular contamination, which can usually be avoided by using strict laboratory conditions (Llamas et al. 2017); (b) molecular preservation of the specimen, which is the greatest challenge for molecular methods, because of the difficulty in predicting the level of preservation (Lindahl 1993); (c) environmental factors, which can induce molecular degradation that severely impairs the process of obtaining DNA for forensic analysis (Dabney et al. 2013); (d) molecular methods can be costly and thus their use is often restricted to forensic material where other methods are not useful; and (e) molecular methods are destructive in obtaining DNA from an ancient bone remain. However, it is possible to extract DNA from bones with minimal damage to the ancient bone because ancient DNA extraction needs minimal quantities (25–700 mg). Of importance is that bone destruction is justifiable in cases when the results are likely to inform on debates to test hypotheses, and/or when their destruction is not detrimental to other research areas (Kaestle and Horsburgh 2002).

The anthropometric methods are usually based on the assessment of more than one anatomical feature from the skeleton, and their effectiveness depends, to a great extent, on the state of conservation of the anatomical structures, which in many cases are of poor quality, with these methods not yielding conclusive results from subadult skeletons.

Conclusions

The new approach developed to identify male sex in ancient samples via amplification of the male-specific regions of the *TTY7*, *TSPY3*, or *TTY2* genes is a

useful tool to confirm male sex in ancient human remains and/or forensic studies when sex cannot be determined using anthropometric measurements or the AMELX/AMELY test. This approach is especially important in ancient samples and forensic research when the age of the individual is unknown, the availability of the bone under study is limited, or the DNA is highly damaged. Furthermore, these genes may also be searched in silico to identify sex if massive sequencing is developed. Since male sex identification was not assessed in all used samples, we would like to stress the value of using complementary approaches in sex identification of human remains, especially when methods applied in one study may not be applicable to others with the same level of confidence.

Acknowledgements We thank the Architect Engineer Verónica Alejandra Roman-Navarro for the advice provided to develop Figs. 1 and 3. In addition, we specially acknowledge the Puxcatán, Abrigo Rocoso Fidencio López, and Sima Cuesta Chica native communities (Tacotalpa, Tabasco) for their collaboration in this project. We sincerely thank reviewers for their careful reading of our manuscript and their many insightful comments and suggestions.

Code availability Not applicable.

Author contribution MTN-R and M-d-LM conceived and designed the research; MTN_R performed the research; EA- and ET-E contributed with the data of the ancient bones; ED-de-la-Cruz and MAM-G performed amplification experiments; NG-H obtained the contemporary DNA and contributed with data analysis; MTN-R and M-d-LM wrote the paper; all authors read and approved the manuscript.

Funding information We thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the financial support of the scholarship awards to M.T.N.-R (Becas Nacionales 2014_Primer Periodo-380118 and Becas Mixtas_2015-Marzo 2016-290936) and E.D.-de-la-C. (CVU 485179, CB 2015/258103, and AYTE. 177559; and COMECYT 18BTD0020). We also thank the FIS IMSS for financial support (FIS/IMSS/PROT/PRI0/17/063, 2017-785-071) and the research scholarship of IMSS Foundation A. C. given to Dr. Normand García Hernández.

Data availability All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval The samples were registered to project number 2017-785-071, and the National Ethics Commission (IMSS) ethics committee approved the study.

Consent to participate The participants provided their written consent to participate.

Consent for publication The participants provided their written consent for publication.

References

- Adler CJ, Haak W, Donlon D, Cooper A (2011) Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *J Archaeol Sci* 38(5):956–964. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.11.010>
- Álvarez-Sandoval BA, Manzanilla LR, Montiel R (2014) Sex determination in highly fragmented human DNA by high-resolution melting (HRM) analysis. *PLoS One* 9:e104629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104629>
- Bashamboo A, Giran HM, Azfer MA et al (2003) Genomics of the human Y chromosome and molecular diagnosis. *Proc Indian Natl Sci Acad B Biol Sci*, B69:525–538
- Bass WM (1987). *Human osteology: a laboratory and field manual*. Missouri Archaeological Society
- Blau S, Ubelaker DH (2009) *Handbook of forensic anthropology and archaeology*. Left Coast Press
- Briggs AW, Stenzel U, Johnson PLF, Green RE, Kelso J, Prufer K, Meyer M, Krause J, Ronan MT, Lachmann M, Paabo S (2007) Patterns of damage in genomic DNA sequences from a Neandertal. *Proc Natl Acad Sci* 104:14616–14621. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704665104>
- Butler EK, Li R (2014) Genetic markers for sex identification in forensic DNA analysis. *J Forensic Investig* 2(3)
- Campos PF, Craig OE, Tumer-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MTP (2012) DNA in ancient bone—where is it located and how should we extract it? *Ann Anat* 194(1):7–16. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.07.003>
- Candelas-González N, Rascón Pérez J, Chamero B et al (2017) Geometric morphometrics reveals restrictions on the shape of the female os coxae. *J Anat* 230:66–74. <https://doi.org/10.1111/joa.12528>
- Dabney J, Meyer M, Pääbo S (2013) Ancient DNA Damage. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012567>
- Dutta P, Bhosale S, Singh R et al (2017) Amelogenin gene—the pioneer in gender determination from forensic dental samples. *J Clin Diagn Res* 11(2):ZC56–ZC59. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22183.9407>
- Esteve-Codina A, Niederstätter H, Parson W (2008) “GenderPlex” a PCR multiplex for reliable gender determination of degraded human DNA samples and complex gender constellations. *Int J Legal Med* 123:459–464. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0301-z>
- Fazekas IG, Kósa F (1978) *Forensic fetal osteology*. Akadémiai Kiadó, Budapest
- García-Campos C, Martínón-Torres M, Martín-Francés L, Martínez de Pinillos M, Modesto-Mata M, Perea-Pérez B, Zanolli C, Labajo González E, Sánchez Sánchez JA, Ruiz Mediavilla E, Tuniz C, Bermúdez de Castro JM (2018a) Contribution of dental tissues to sex determination in modern human populations. *Am J Phys Anthropol* 166:459–472. <https://doi.org/10.1002/ajpa.23447>
- García-Campos C, Martínón-Torres M, de Pinillos MM et al (2018b) Modern humans sex estimation through dental tissue patterns of maxillary canines. *Am J Phys Anthropol* 167: 914–923. <https://doi.org/10.1002/ajpa.2371>
- Gaudio D, Fernandes DM, Schmidt R, Cheronet O, Mazzarelli D, Mattia M, O’Keeffe T, Feeney RNM, Cattaneo C, Pinhasi R (2019) Genome-wide DNA from degraded petrous bones and the assessment of sex and probable geographic origins of forensic cases. *Sci Rep* 9:8226. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44638-w>
- GeneCards-Human Genes (n.d.) | Gene Database | URL <https://www.genecards.org/>
- Gibbon V, Paximadis M, Strkalj G et al (2009) Novel methods of molecular sex identification from skeletal tissue using the amelogenin gene. *Forensic Sci Int Genet* 3(2):74–79. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.10.007>
- Graw M, Wahl J, Ahlbrecht M (2005) Course of the meatus acusticus internus as criterion for sex differentiation. *Forensic Sci Int* 147:113–117. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.08.006>
- Green RE, Krause J, Briggs AW, Maricic T, Stenzel U, Kircher M, Patterson N, Li H, Zhai W, Fritz MHY, Hansen NF, Durand EY, Malaspina AS, Jensen JD, Marques-Bonet T, Alkan C, Prufer K, Meyer M, Burbano HA, Good JM, Schultz R, Aximu-Petri A, Butthof A, Hober B, Hoffner B, Siegemund M, Weihmann A, Nusbaum C, Lander ES, Russ C, Novod N, Affourtit J, Egholm M, Verna C, Rudan P, Brajkovic D, Kucan Z, Gusic I, Doronichev VB, Golovanova LV, Lalueza-Fox C, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Schmitz RW, Johnson PLF, Eichler EE, Falush D, Birney E, Mullikin JC, Slatkin M, Nielsen R, Kelso J, Lachmann M, Reich D, Paabo S (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328(5979):710–722. <https://doi.org/10.1126/science.1188021>
- Halder A, Kumar P, Jain M, Iyer VK (2017) Copy number variations in testicular maturation arrest. *Andrology* 5(3): 460–472. <https://doi.org/10.1111/andr.12330>
- Harris SM, Case DT (2012) Sexual dimorphism in the tarsal bones: implications for sex determination. *J Forensic Sci* 57: 295–305. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.02004.x>
- Hora M, Sládek V (2018) Population specificity of sex estimation from vertebrae. *Forensic Sci Int* 291:279.e1–279.e12. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.08.015>
- Integrative Genomics Viewer (2018) | Nature Biotechnology | URL <https://www.nature.com/articles/nbt.1754>
- Kaestle FA, Horsburgh KA (2002) Ancient DNA in anthropology: methods, applications, and ethics. *Am J Phys Anthropol Suppl* 35:92–130. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10179>
- Kashyap V, Sahoo S, Sitalaximi T, Trivedi R (2006) Deletions in the Y-derived amelogenin gene fragment in the Indian population. *BMC Med Genet* 7:37. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-7-37>

- Kim K-Y, Kwon Y, Bazarragcha M, Park AJ, Bang H, Lee WB, Lee J, Lee KH, Kim BJ, Kim K (2013) A real-time PCR-based amelogenin Y allele dropout assessment model in gender typing of degraded DNA samples. *Int J Legal Med* 127:55–61. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0663-5>
- Krishan K, Chatterjee PM, Kanchan T et al (2016) A review of sex estimation techniques during examination of skeletal remains in forensic anthropology casework. *Forensic Sci Int* 261: 165.e1–165.e8. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.02.007>
- Lin Z, Kondo T, Minamino T, Ohtsuji M, Nishigami J, Takayasu T, Sun R, Ohshima T (1995) Sex determination by polymerase chain reaction on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912. *Forensic Sci Int* 75:197–205. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01789-5](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01789-5)
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Llamas B, Valverde G, Fehren-Schmitz L, Weyrich LS, Cooper A, Haak W (2017) From the field to the laboratory: controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era. *STAR* 3:1–14. <https://doi.org/10.1080/20548923.2016.1258824>
- Luna LH, Aranda CM, Santos AL (2017) New method for sex prediction using the human non-adult auricular surface of the ilium in the collection of identified skeletons of the University of Coimbra. *Int J Osteoarchaeol* 27:898–911. <https://doi.org/10.1002/oa.2604>
- Moore M (2013) Sex estimation and assessment. Research methods in human skeletal biology. In, pp 91–116
- Ovchinnikov IV, Ovtchinnikova OI, Druzina EB et al (1998) Molecular genetic sex determination of Medieval human remains from North Russia: comparison with archaeological and anthropological criteria. *Anthropol Anz* 56(1):7–15
- Quincey D, Carle G, Alunni V, Quatrehomme G (2013) Difficulties of sex determination from forensic bone degraded DNA: a comparison of three methods. *Sci Justice J Forensic Sci Soc* 53:253–260. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.04.003>
- Quintana-Murci L, Fellous M (2001). The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland.” *J Biomed Biotechnol* 1:18–24. <https://doi.org/10.1155/S1110724301000080>
- Rohland N, Hofreiter M (2007) Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* 2:1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Schutkowski H (1987) Sex determination of fetal and neonate skeletons by means of discriminant analysis. *Int J Anthropol* 2:347–352. <https://doi.org/10.1007/BF02443994>
- Skoglund P, Malmström H, Raghavan M et al (2012) Origins and genetic legacy of Neolithic farmers and hunter-gatherers in Europe. *Science* (New York, N.Y.) 336(6080):466–469. <https://doi.org/10.1126/science.1216304>
- Skoglund P, Storå J, Götherström A, et al. Accurate sex identification of ancient human remains using DNA shotgun sequencing, vol. 40; 2013.
- Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D (2016) The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr Protoc Bioinformatics* 54:1.30.1–1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
- Stevens AJ, Taylor MG, Pearce FG, Kennedy MA (2017) Allelic dropout during polymerase chain reaction due to G-quadruplex structures and DNA methylation is widespread at imprinted human loci. *G3* (Bethesda) 7:1019–1025. <https://doi.org/10.1534/g3.116.03868>
- Stone AC, Milner GR, Pääbo S, Stoneking M (1996) Sex determination of ancient human skeletons using DNA. *Am J Phys Anthropol* 99:231–238. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8644\(199602\)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8644(199602)99:2<231::AID-AJPA1>3.0.CO;2-1)
- Takayama T, Takada N, Suzuki R, Nagaoka S, Watanabe Y, Kumagai R, Aoki Y, Butler JM (2009) Determination of deleted regions from Yp11.2 of an amelogenin negative male. *Legal Med* 11:S578–S580. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2009.01.049>
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP (2013) Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14:178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Tschentscher F, Frey UH, Bajanowski T (2008) Amelogenin sex determination by pyrosequencing of short PCR products. *Int J Legal Med* 122:333–335. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0228-4>
- Ubelaker DH (2014) Osteology reference collections. In: Smith C (ed) *Encyclopedia of global archaeology*. Springer New York, New York, pp 5632–5641
- Ubelaker DH, DeGaglia CM (2017) Population variation in skeletal sexual dimorphism. *Forensic Sci Int* 278:407.e1–407.e7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.06.012>
- Veroni A, Nikitovic D, Schillaci MA (2010) Brief communication: sexual dimorphism of the juvenile basicranium. *Am J Phys Anthropol* 141:147–151. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21156>
- White TD, Folkens PA (2005) *The human bone manual*. Elsevier Academic Press, San Diego
- Willerslev E, Cooper A (2005) Ancient DNA. *Proc Biol Sci* 272: 3–16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2813>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

II. SEGUNDA PUBLICACIÓN

Submitted Journal: **Human Biology**

The maternal lineage of pre-Hispanic Archaic and Classic Period human remains from Puyil cave, Mexico: A synthesis of archaeological, genetic, and biodemographic methodologies.

María Teresa Navarro-Romero¹, María de Lourdes Muñoz^{1,*}, Ben Krause-Kyora^{2,*}, Enrique Alcalá-Castañeda³, Lisa Bohme², Randy E. David⁴, Javiera Cervini-Silva⁵.

¹Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Mexico City, Mexico.

²Institute of Clinical Molecular Biology, Kiel University, Rosalind-Franklin-Straße 12, 24105, Kiel, Germany.

³Department of Archaeological Studies, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Lic. Verdad 3, Centro Histórico, 06000, Mexico City, Mexico.

⁴Department of Population Health and Disease Prevention, University of California, Irvine, 653 East Peltason Drive, Irvine, CA, USA 92697

⁵Department of Process and Technology, Universidad Autónoma Metropolitana-Cuajimalpa, Vasco de Quiroga 4871, Contadero, 05370, Mexico City, Mexico.

*To whom correspondence should be addressed:

* Dr. María de Lourdes Muñoz

Department of Genetics and Molecular Biology

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508,

San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, Ciudad de México, C.P. 7360, México.

E-mail: lmunoz@cinvestav.mx

* Dr. Ben Krause-Kyora

Institute of Clinical Molecular Biology

Christian-Albrechts-University Kiel

Rosalind-Franklin-Straße 12, 24105 Kiel, Germany

E-mail: b.krause-kyora@ikmb.uni-kiel.de

III. TERCERA PUBLICACIÓN

American Journal of Physical Anthropology

Genetic variants m.16519T>C of mtDNA and *WFS1* rs6446482 associated with Diabetes were identified in two pre-Hispanic Mexicans from the Archaic and Classic period

María Teresa Navarro-Romero¹, María de Lourdes Muñoz*¹, Ben Krause-Kyora*², Angelica Saldaña-Martínez¹, Enrique Alcalá-Castañeda³ and Lisa Bohme².

1. Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Mexico City, Mexico.
2. Institute of Clinical Molecular Biology, Kiel University, Kiel, Rosalind-Franklin-Straße 12, 24105, Kiel, Germany.
3. Department of Archaeological Studies, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Lic. Verdad 3, Centro Histórico, 06000, Mexico City, Mexico.

*To whom correspondence should be addressed:

* Dr. María de Lourdes Muñoz

Department of Genetics and Molecular Biology
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
Av. Instituto Politécnico Nacional 2508,
San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, Ciudad de México, C.P. 7360, México.
E-mail: lmunoz@cinvestav.mx

* Dr. Ben Krause-Kyora

Institute of Clinical Molecular Biology
Christian-Albrechts-University Kiel
Rosalind-Franklin-Straße 12 · 24105 Kiel, Germany
E-mail: b.krause-kyora@ikmb.uni-kiel.de

IV. CAPITULO DE LIBRO**Capitulo del Libro****Mitochondrial DNA haplotype identification of pre-Hispanic human remains discovered in the Puyil cave, Tabasco-Mexico from the Archaic and Classical Periods**

María Teresa Navarro-Romero¹, María de Lourdes Muñoz¹, Ben Krause-Kyora² and Enrique Alcalá-Castañeda³.

¹Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico. ²Institute of Clinical Molecular Biology, Kiel University, Kiel, Germany. ³Department of Archaeologic Studies, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Mexico City, Mexico.