

Jordana, F.; Colat-Parros, J.; Bénézec, M.

- 2012 "Diagnosis of skull fractures according to postmortem interval: an experimental approach in a porcine model", *Journal of Forensic Sciences* 58(Suppl. 1), S156-162.

Kranioti, E.

- 2015 "Forensic investigation of cranial injuries due to blunt force trauma: Current best practice", *Research and Reports in Forensic Medical Science* 5, 25-37, https://www.researchgate.net/publication/282641784_Forensic_investigation_of_cranial_injuries_due_to_blunt_force_trauma_current_best_practice (consulta: 3/III/2018).

Locatelli, M.; Alimehmeti, R.; Rampini, P.; Prada, F.

- 2006 "Intradiploic frontal epidermoid cyst in a patient with repeated head injuries: is there a causative relationship?", *Acta Neurochirurgica* 148(10), 1107-1110.

Rühli, F. J.; Chhem, R. K.; Böni, T.

- 2004 "Diagnostic paleoradiology of mummified tissue: interpretation and pitfalls", *Canadian Association of Radiologists Journal* 55(4), 218-227, <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.126.5353&rep=rep1&type=pdf> (consulta: 3/III/2018).

Sánchez Sánchez, J. A.; Gómez Bellard, F.; Arroyo Pardo, E.

- 1992 "Estudio de las Líneas de Harris en los restos óseos medievales de la iglesia de San Francisco, Medina de Rioseco (Valladolid)", *Enfermedad y Muerte en el Pasado, Actas del I Congreso Nacional de Paleopatología, IV Reunión de la Asociación Española de Paleopatología*, Munibe - Suplemento 8, San Sebastián, 213-216.

KOBIE ANEJO Nº25: 315-326
Bizkaiko Foru Aldundia-Diputación Foral de Bizkaia
Bilbao - 2022
ISSN 0214-7971

ANÁLISIS DE ADN DEL SEÑOR DE VIZCAYA EN EL CONTEXTO DE LOS ESTUDIOS DE MUESTRAS DE ORIGEN MEDIEVAL

DNA Analysis of the Lord of Vizcaya in the Context of Studies on Samples of Medieval Origin

María Saiz¹
Christian Haarkötter¹
María Jesús Álvarez-Cubero²
Luis Javier Martínez-González³
Juan Carlos Álvarez¹
José Antonio Lorente¹

Palabras Clave: ADN. Degradación. Don Tello. Historia. Identificación genética. Medieval. Mitocondrial.

Key Words: DNA. Degradation. Don Tello. Genetic identification. History. Medieval. Mitochondrial DNA.

Gako-hitzak: Antzinako DNA. Don Tello. DNA. Endekapena. Erdi Arokoa. Historia. Identifikazio genetikoak. Mitokondrialak.

RESUMEN

El presente trabajo hace una revisión de la evolución de las tecnologías de análisis de identificación genética humana, con especial énfasis en los protocolos de estudio de restos humanos de épocas medievales, valorando las dificultades y retos existentes en su estudio. El trabajo finaliza con una revisión de las aplicaciones a restos históricos ya analizados por nuestro equipo de la Universidad de Granada y de modo especial lo realizado en el caso de don Tello, Señor de Vizcaya.

ABSTRACT

This paper reviews the evolution of human genetic identification analysis technologies, with special emphasis on protocols for the study of human remains from medieval times, assessing the difficulties and challenges in their study. The work ends with a review of the applications to historical remains already analyzed by our team at the University of Granada and especially what has been done in the case of Don Tello, Lord of Vizcaya.

1 Laboratorio de Identificación Genética, Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física, Facultad de Medicina, Granada.
Correo electrónico: msaiz@ugr.es, chaarkotter@ugr.es, juanca@ugr.es, jllorente@ugr.es

2 Universidad de Granada. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología.
Correo electrónico: mjesusac@ugr.es

3 GENYO - Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica PTS, Granada.
Correo electrónico: luisjavier.martinez@genyo.es

LABURPENA

Artikulu honek giza identifikazio genetikoa aztertze teknologien bilakaera berrikusten du, Erdi Aroko giza aztarnak aztertze protokoloei arreta berezia jarritz, haien azterketaren zailtasunak eta erronkak ebaluatuz. Lana amaitzen da Granadako Unibertsitateko gure lantaldeak dagoeneko aztertutako aztarna historikoei egindako aplikazioen errepasoarekin eta, batez ere, Don Tello, Bizkaiko Jaunaren kasuan, egindakoa.

1. INTRODUCCIÓN

La posibilidad de estudiar el ácido desoxirribonucleico (universalmente conocido por el acrónimo ADN) con fines de identificación humana, supuso toda una revolución en 1985, año del que data la primera descripción científica.

En ese momento se intuyeron las enormes posibilidades que esto ofrecía a las ciencias forenses en general, tanto en el área criminal como en los aspectos civiles, básicamente para la determinación de la paternidad.

El ADN permitió superar barreras entonces totalmente infranqueables, como fueron, entre otras:

1.- El estudio genético de cantidades muy pequeñas e incluso no recientes de material biológico. Por ejemplo, una gota de sangre, restos de saliva en un vaso, un pelo.

2.- Posibilidad de extraer y estudiar ADN de todo tipo de muestras biológicas, y por lo tanto posibilidad de comparar entre sí resultados de ADN independientemente de su origen corporal, como es el caso de sangre, semen, saliva, células epiteliales, orina, huesos, etc. Allá donde tengamos una célula, habrá ADN que potencialmente se podrá estudiar.

3.- Tecnologías comunes y universales. Al ser todo nuevo se generaron grupos nacionales e internacionales de trabajo (GEP-ISFG, GITAD-AICEF, ASCLD, ENFSI, IFSA, etc.) que desde un principio sentaron las bases metodológicas, interpretativas y de calidad, que fueron aceptadas progresivamente por todos los países del mundo.

4.- Aumento de la probabilidad estadística (en porcentaje o razón de verosimilitud), llegándose en términos clásicos a probabilidades superiores al 99.9999% o a identificar en términos de 1 entre 50.000 millones o a razones de verosimilitud de millones de veces.

5.- Posibilidad de analizar ADN de animales y plantas, que con alguna frecuencia pueden tener interés forense y criminalística-policial.

6.- Creación de bases de datos de interés criminal y civil, entre las que la Universidad de Granada y el Ministerio del Interior fueron pioneros en el mundo con la creación del Programa FÉNIX de identificación genética de personas desaparecidas en 1999, o el programa DNA-PROKIDS (www.dna-prokids.org) para la identificación y lucha contra la trata de niños en 2004.

Todo lo anterior, hoy no sólo es rutinario, sino que desde inicios de los años noventa ha sido superado tecnológicamente con la introducción masiva de las técnicas de análisis basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y lo será con las técnicas de nueva generación (NGS).

Pero hace escasamente 40 años esto no existía, y era algo no impensable, pero sí más cercano al mundo de lo filosófico y onírico que a una realidad científica y metodológicamente aceptable.

Sin embargo, lo que muy pocos pudieron o supieron prever al inicio de la era de la identificación genética humana es la posibilidad que el estudio de ADN de restos óseos de cientos y hasta miles de años de antigüedad. Con esta posibilidad han sido diferentes las áreas:

1.- Genética forense, o sea, identificación humana en el contexto judicial y criminalístico. Esto permite la posibilidad de identificaciones en casos de grandes catástrofes, fosas comunes tras guerras o en conflictos, personas desaparecidas, etc.

2.- Antropología molecular, referida de modo genérico al estudio de ADN de restos de diversa antigüedad (desde cientos a miles de años), permitiendo reconstruir las migraciones poblacionales, el origen

de las mismas en las diversas regiones del planeta, el origen y la evolución del ser humano hasta llegar al *Homo sapiens sapiens* actual, etc.

3.- Estudio genético de casos históricos: la historia es una ciencia, con su metodología, sus fuentes, sus medios de estudio y análisis, hipótesis y conclusiones, de eso no cabe duda. Y justo por ser una ciencia, por tener campos de conocimiento variados y amplios, tiene -como todas las ciencias- sus limitaciones, sobre las cuáles reflexionamos con posterioridad.

En todo caso, no es posible avanzar en el conocimiento pasado ni en el desarrollo del futuro si no hay una colaboración fluida entre las diferentes ciencias y áreas de conocimiento, y la relación ADN e historia puede ser un ejemplo paradigmático del siglo XXI, igual que a lo largo del siglo XX lo fue de modo muy significativo la introducción de las técnicas de datación con el radiocarbono o carbono catorce (^{14}C).

2. EL ADN EN EL ESTUDIO DE MUESTRAS CRÍTICAS

Fue en el año 1953 cuando (Watson y Crick 1953: 737-738) describieron por primera vez la estructura del ADN. El ADN nuclear está formado por una hélice de doble cadena, donde éstas permanecen unidas mediante un proceso de hibridación. Estas dos hebras son antiparalelas y complementarias, por lo que conociendo la secuencia de una hebra podemos determinar la secuencia de la otra hebra.

El estudio del aADN (la "a" minúscula que precede al acrónimo en español o inglés significa "antiguo" o "ancient") es un campo apasionante, lleno de grandes retos y de esperanzas de poder obtener información objetiva sobre el ser humano en sí mismo y sobre personajes de la historia de la humanidad en aquellos casos en los que hay dudas de sus orígenes o lugar de enterramiento.

Estos estudios presentan cuatro grandes dificultades; la escasez, la fragmentación de las cadenas, las modificaciones moleculares y la presencia de inhibidores de la PCR en los extractos.

Además de éstos, la contaminación del material genético antiguo con ADN exógeno moderno (normalmente de las personas que han manejado las muestras), han puesto en duda la autenticidad de muchas investigaciones, por lo que hay que ser especialmente precavido y prudente.

La "historia" del ADN antiguo (aDNA) comienza en la década de los ochenta, cuando Higuchi publicó, en la revista *Nature*, la secuencia de un fragmento de 229 pb de ADN mitocondrial (ADNmt) a partir de piel momificada de un *Equus quagga*; un animal extinguido relacionado con las cebras, de aproximadamente 140 años de antigüedad (Higuchi *et al.* 1984: 282-284). Desde de este momento las investigaciones con ADN recuperado de restos antiguos comenzaron a hacerse cada vez más numerosas.

A finales de los 80, Hagelberg y posteriormente Hänni describieron la extracción de ADN humano y su posterior caracterización, el primero en tejido óseo y el segundo en dientes, de ADN procedente de muestras con diferentes datas, desde 150 a 5500 años de antigüedad (Hagelberg y Clegg 1991: 45-50). Estos trabajos demostraban que el ADN podía ser recuperado utilizando procedimientos de biología molecular en muestras de distinta índole y con distintas datas.

De forma simultánea a los estudios de Hagelberg y Hänni, Pääbo presentó sus resultados al obtener secuencias de ADN a partir de restos humanos antiguos mediante la clonación de secuencias repe-

titivas Alu (elementos móviles del ADN), a partir de piel de momias egipcias de 2500 años de antigüedad (Pääbo 1985: 411-417 y 644-645). Los avances en la recuperación de ADN a partir de restos arqueológicos suscitaron grandes expectativas en la comunidad científica, pero rápidamente fueron disuadidas debido a las dificultades en su reproducibilidad.

Posteriormente y gracias a la aparición de una nueva técnica molecular basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se proporcionaron nuevas perspectivas en este campo.

Según Su modo de herencia, distinguimos 3 tipos de ADN: nuclear autosómico, mitocondrial y cromosoma Y.

2.1. ADN nuclear

Se encuentra en el núcleo de la célula mide aproximadamente dos metros de longitud, pero se encuentra dividido y muy compactado en 23 parejas de cromosomas, ya que cada persona hereda 23 de su madre y 23 del padre.

De los 23 pares, 22 son llamados autosómicos, mientras que la pareja 23 la componen los llamados cromosomas sexuales, el X y el Y. Como se sabe, la combinación de ambos determina el sexo biológico o genético de la persona, siendo la combinación XX propia de la mujer, y la XY del varón.

Por ello, al hablar de herencia se debe considerar que el cromosoma Y es especial, porque al tenerlo sólo los varones, los hijos varones sólo lo pueden recibir de su padre.

El resto de cromosomas autosómicos es una mezcla (mitad y mitad) del padre y de la madre, y a través de su estudio se puede identificar perfectamente a una persona. Ahora bien, en el contexto histórico en el que nos encontramos hemos de considerar lo siguiente, explicado de modo general. Un hijo tiene la mitad de sus padres, que a su vez es la cuarta parte de cada uno de sus abuelos, la octava parte de sus bisabuelos, y así sucesivamente.

En la práctica, esto implica que una vez que hayan transcurrido más de 3 generaciones, identificar a una persona con base en su ADN autosómico va a ser más difícil que una comparación de familiares directos.

2.2. Cromosoma Y

El cromosoma Y se encuentra en el núcleo de la célula, es parte de la pareja 23 de cromosomas, pero al determinar el sexo masculino sigue una herencia en bloque exclusivamente paterna por lo que el estudio de este tipo de marcadores genéticos nos permite establecer el linaje paterno de las muestras, y normalmente tiene un fácil seguimiento o trazabilidad a través de documentos, porque se hereda junto con el apellido paterno, que suele predominar como "nombre familiar" en la mayoría de las culturas.

2.3. ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) es el genoma eucariótico mejor estudiado, se conoce su estructura y secuencia completa en casi todos los organismos. En el caso de la especie humana es doble, circular cerrado y con una longitud de 16.569 pares de bases (pb). Sus dos cadenas son complementarias y antiparalelas, asemejándose más a un ADN bacteriano que al ADN nuclear que está estrechamente asociado con proteínas y repartido en cromosomas.

La región control tiene una alta variabilidad entre individuos por lo que se ha convertido en objeto de análisis en estudios antropológicos e investigación en genética forense. Se divide en otras regiones en función de su grado de variabilidad. Las más estudiadas y conocidas por su alto grado de variabilidad son la región hipervariable 1, HV1, (16.024-16 365), la región hipervariable 2, HV2, (73 a la 340), y una tercera región hipervariable, menos utilizada, HV3, (440-560) (Lutz *et al.* 2000: 155-161). Existe una mayor variabilidad en la HV1 que en la HV2, por lo tanto, ha sido el más usado en estudios de poblaciones humanas y del que se tiene una mayor información.

Este tipo de ADN presenta ciertas características que lo hacen especialmente útil para estudios de identificación y evolución molecular:

- Alto número de copias en cada individuo: Hay entre 10 y 100 mitocondrias por célula y dentro de cada mitocondria entre 10 y 100 copias de ADNmt. El resultado de este alto número de copias es que al intentar obtener ADNmt de una muestra siempre es mucho más sencillo que obtener ADN nuclear, lo que le confiere una gran utilidad en muestras de restos mínimos y/o antiguos.

- Transmisión exclusiva por vía materna: el ADNmt de hermanos, de hijos y madre y en general de aquellos individuos relacionados por vía materna es idéntico siempre y cuando no se den mutaciones (Parsons *et al.* 1997: 362-367; Wallace 1992: 628-632; Wallace y Torroni 1992 :403-416).

- Caracterización completa de su genoma en 1980 por el grupo de Frederick Sanger en Cambridge (Anderson *et al.*, 1981: 457-465).

- Presencia de numerosos polimorfismos.

- Rápida tasa de evolución ADNmt tiene una alta tasa de mutación, de 5-10 veces mayor que el ADN nuclear. Esta característica hace del ADNmt una herramienta muy útil para el análisis con fines de identificación y también para el estudio del proceso evolutivo. La fácil aparición de mutaciones y la fijación de éstas produce una alta hipervariabilidad entre la población humana.

3. METODOLOGÍA DE ESTUDIO DEL ADN DE MUESTRAS CRÍTICAS

El éxito en la obtención de información genética a partir de material antiguo está condicionado por factores como el tipo de material de estudio, las condiciones del enterramiento y las condiciones de la manipulación arqueológica.

La toma de la muestra cuando se trata de muestras antiguas es muy importante. A continuación, se detallan unos pasos a seguir cuando se manipulan este tipo de materiales.

3.1. Elección de las muestras

La muestra puede tener una cantidad limitada, estar degradada y/o puede haber estado expuesta a agentes ambientales. Por ese motivo, las técnicas empleadas en el laboratorio son críticas para la máxima obtención de ADN en muestras degradadas y limitadas. Debido a ello, es de vital importancia el tipo de muestra disponible para los análisis de ADN (Collins *et al.* 2002: 383-394).

Los tejidos de elección para la determinación de aDNA son huesos y dientes. Ambos tejidos protegen el ADN de la degradación y de ataques biológicos debido a su robustez física y química; en la mayoría de los casos éstos son los únicos tejidos que pueden ser

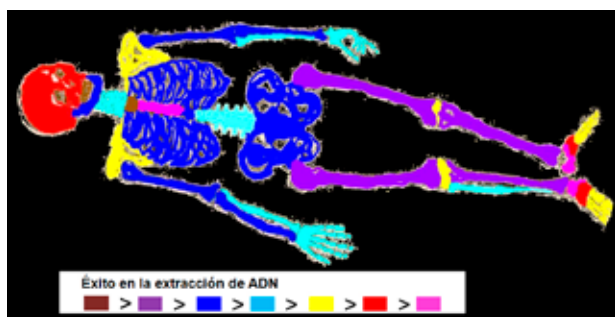


Figura 1. Porcentaje de éxito, dependiendo del hueso de partida. Esquematiza la información de los distintos estudios realizados sobre extracción de ADN en huesos. Imagen tomada de Martínez-González *et al.* (2010).

analizados. Sin embargo, los mecanismos por los que el ADN es preservado en el hueso no están bien caracterizados.

Los dientes son el tejido más duro del cuerpo humano debido al esmalte dental y son una buena elección ya que el material genético está protegido por tejidos calcificados.

El tejido óseo se compone principalmente de proteínas y minerales. Las dos proteínas más abundantes en este tejido son el colágeno y la osteocalcina. Aproximadamente el 70% de la parte mineral del hueso se compone de hidroxapatita, que incluye fosfato cálcico, carbonato cálcico, fluoruro cálcico, hidróxido cálcico y citrato. Además, existen diferencias de densidad ósea en diferentes partes del esqueleto, teniendo la región media de los huesos niveles más altos (Collins *et al.* 2002: 383-394).

Los estudios más recientes apuntan a que el hueso *pars petrosa*, localizado en la región temporal del cráneo, tiene un rendimiento en términos de cantidad de ADN mucho mayor que otros restos óseos, debido a que el tejido es mucho más compacto y a una mayor presencia de células.

Es muy complicado estimar el estado de conservación del ADN a través de una simple inspección macroscópica. Sin embargo, hay varios rasgos característicos de una buena muestra. Los huesos han de ser duros, pesados y con una estructura compacta. Especialmente para identificación humana, los dientes con una raíz bien preservada son de gran utilidad. Cuando se trabaja con un gran número de individuos se recomienda tomar el mismo elemento anatómico para evitar el doble tipado de los individuos.

3.2. Procedencia de las muestras

Se ha demostrado que las muestras extraídas en zonas cálidas están peor preservadas y son más vulnerables al estrés termal y a la contaminación durante la excavación. Por ello, las muestras se han de mantener de forma constante a temperaturas relativamente bajas. Se han de excavar rápidamente, puestas directamente en bolsas estériles y almacenadas en cajas frías o un sitio sombrío. Los restos humanos se contaminan fácilmente por lo que se recomienda reducir el riesgo de contaminación al máximo llevando al menos guantes, bata, y mascarilla.

Las herramientas se han de limpiar con lejía diluida y los guantes se han de cambiar tras la manipulación de cada muestra para evitar contaminación entre ellas. Se han realizado estudios donde relacionan el tipo de muestra tomada con el riesgo de contaminación de la misma, así como con el procesado de la muestra por parte de los investigadores en el momento de lo toma para análisis genéticos, cada muestra se ha de extraer por duplicado para su autenticación.

3.3. Tratamiento y almacenamiento de las muestras

Siempre que sea posible se han de usar guantes para la manipulación de la muestra. Cada espécimen se ha de depositar en una bolsa independiente para evitar contaminaciones entre muestras. En caso de que las muestras se encuentren húmedas y no se puedan transportar refrigeradas, se han de preservar en bolsas de papel, para evitar el deterioro de las mismas. Se recomienda no lavar las muestras, ya que es una fuente de contaminación.

3.4. Manejo de las muestras en el laboratorio

Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, se han de identificar y anonimizar. Se recomienda tomar fotografías de todos los restos recibidos, ya que en muchas ocasiones se ha de destruir por completo la muestra para poder realizar los análisis de ADN. Para poder extraer ADN de restos óseos o dientes, primero se ha de limpiar y pulverizar la muestra. Los huesos se cortan en fragmentos de aproximadamente 1 cm² con un disco de corte y se limpia la superficie externa e interna con intensidad.

A continuación, se procede al pulverizado de las muestras para un mejor rendimiento de la extracción, utilizándose para ello viales con esferas de acero en su interior, bien refrigerados con nitrógeno líquido o bien en pulsaciones cortas, evitando en todo caso un calentamiento de la muestra.



Figura 2. Limpieza y corte de las muestras en el laboratorio.



Figura 3. Condiciones de trabajo con muestras de aDNA.

3.5. Criterios de autenticidad al trabajar con aDNA

Hay establecidos una serie de criterios para autenticar que el ADN obtenido es endógeno (el propio de la muestra) y no endógeno (contaminación externa), como son:

1. Toma de las muestras. Como ya se ha explicado anteriormente, se ha de tener mucho cuidado en la toma de muestras e intentar evitar todo tipo de contaminaciones. Una vez en el laboratorio, las muestras se han de dividir y -de ser posible- realizar réplicas del análisis en laboratorios independientes.

2.- Preservación bioquímica. El principal componente molecular del diente y el hueso es colágeno. Las proteínas y el ADN sufren procesos similares de oxidación e hidrólisis. Por ello, el análisis de las alteraciones en las proteínas del hueso o diente permitirá a los investigadores escoger aquellas muestras que presentan características favorables a la preservación del ADN.

3.- Controles de extracción y amplificación. El análisis del aDNA se ha de llevar a cabo en laboratorios empleados exclusivamente para la extracción de muestras con bajo número de copias de ADN. Se han de realizar extracciones en blanco y controles de PCR exhaustivos para monitorizar los niveles de contaminación.

4.- Comportamiento molecular. El ADN de restos fósiles está degradado en pequeños fragmentos (150 pares de bases). Una manera de comprobar la autenticidad del extracto de aDNA es observar la presencia de fragmentos mayores de 300 pares de bases.

5.- Cuantificación. Conocer la cantidad de ADN presente en el extracto ofrece gran información sobre el estado de preservación de la muestra.

6.- Amplificación: Se han de amplificar fragmentos solapantes pequeños (<150 pares de bases). De esta manera se asegura una mayor amplificación del ADN degradado frente a moléculas de ADN contaminantes de mayor tamaño. Las amplificaciones se han de realizar por duplicado y cada amplificación se ha de secuenciar en varias ocasiones.

7.- Reproducibilidad. Se han de reproducir los resultados de la misma muestra en el laboratorio y de otras submuestras en otros laboratorios.

8.- Análisis de fauna. En caso de restos de homínidos, donde puede ser complicado determinar la secuencia endógena, es conveniente tener muestras de la fauna del mismo sitio que puedan dar información indirecta sobre la preservación del ADN.

9.- Confirmación filogenética. Se han de analizar las secuencias de ADN filogenéticamente. La presencia de nuevas secuencias que no se encuentran en la base de datos, sobre todo de ADN mitocondrial, no aseguran su autenticidad (Jobling *et al.* 2003).

6. INCONVENIENTES DE LOS ESTUDIOS CON aDNA

El aDNA presenta un conjunto de características fisicoquímicas que lo diferencian del organismo vivo: escasez, fragmentación de las cadenas, modificaciones moleculares y presencia de inhibidores de la PCR. La suma de estas características impone ciertas limitaciones técnicas a la hora de recuperar ADN de restos antiguos (Haarkötter *et al.* 2022).

6.1. Degradación del ADN

El grado de degradación de la muestra varía en función de la exposición a la luz, humedad y temperatura. La contaminación bacteriana y fúngica y la rápida colonización de los mismos, derivarán en la degradación física, química y bioquímica del ADN genómico del espécimen de interés.

En las células vivas, la integridad del ADN se mantiene mediante procesos de reparación enzimáticos. Tras la muerte de un organismo, los compartimentos celulares que contienen enzimas catalíticas se rompen. Como consecuencia, el ADN se degrada rápidamente por estas enzimas. Además, el ADN se ve sometido a procesos de degradación causados por bacterias, hongos e insectos.

La exposición al agua es probablemente la mayor fuerza destructiva que actúa sobre el ADN. Se ha demostrado que el agua inicia la rotura de la cadena del ADN mediante la unión a los enlaces glucosídicos. Por ello, un paso crítico en la preservación del ADN es la rápida deshidratación de los tejidos.

El pH del ambiente también juega un papel crucial en la preservación a largo plazo del ADN. Ambientes ácidos incrementan la ratio de degradación del ADN.

La exposición a luz ultravioleta causa un gran daño y degradación del ADN. Limitar la exposición de la muestra a la luz ultravioleta, como un rápido enterramiento, es importante para minimizar las consecuencias del daño UV.

6.2. Contaminación del ADN

La contaminación con ADN de otros especímenes que no son el estudiado (ADN exógeno) es un problema complejo que aparecerá en cualquier estudio con aDNA, debido a la limitada cantidad de ADN que encontraremos en la muestra. Las fuentes de contaminación varían considerablemente dependiendo del tipo de material arqueológico y de la investigación a realizar y es probable que ambos (ADN endógeno y ADN contaminante) puedan ser coextraídos, por tanto, también es probable que ambos puedan ser coamplificados o en el peor de los casos amplificado, preferentemente, el ADN contaminante por encontrarse en una proporción mucho mayor.

6.3. Inhibición de la PCR

La presencia de inhibidores de la reacción de PCR es otro reto que se ha de afrontar en el trabajo con muestras antiguas. Los inhibidores pueden proceder de múltiples focos como la melanina, el suelo y proteínas. Los inhibidores interfieren en la lisis celular necesaria para la extracción del ADN. Además, disminuyen la actividad de la polimerasa y con ello dar lugar a resultados falsos-negativos. Este tipo de muestras producen a menudo perfiles parciales que son similares a muestras con ADN degradado. Los inhibidores de la PCR pueden ser eliminados mediante la dilución del extracto o con un paso previo a la amplificación que separe el ADN extraído del compuesto inhibitorio.

7. HISTORIA, CIENCIA Y ADN

La historia es una ciencia, englobada dentro del área humanística entre las ciencias sociales. Y como todas las ciencias, tiene sus fuentes propias y las auxiliares, sus limitaciones y sus evidencias.

No siendo historiadores los autores de este capítulo, sí queremos destacar qué es lo que nosotros entendemos que el ADN puede aportar y qué es lo que no puede aportar.

Para comenzar, cualquier estudio genético histórico debe estar asesorado y coordinado por historiadores, que son los que conocen los problemas existentes y los que han de realizar (junto con paleontólogos, geólogos, antropólogos, genealogistas, etc. según el caso) toda la información disponible, las diferentes alternativas existentes y -muy importante- quiénes son y dónde están los familiares que habrán de servir de muestras de referencia.

Toda esta información debe de estudiarse *a priori*, en equipo, porque ello ayudará a definir la estrategia del estudio. A veces puede que haya muestras de referencia que no sean adecuadas para un estudio genético. Por ejemplo, la hija de un hermano de un varón a identificar (una sobrina), es una muestra no muy alejada en el tiempo, pero que ofrece información genética muy limitada, porque no comparte cromosoma Y ni ADN mitocondrial. Todas estas circunstancias deben de ser manejadas con anticipación, antes de afrontar los estudios como tales y antes de comenzar con la fase burocrática y de autorizaciones, que suele ser lenta y que pudiese acabar con la paradoja de que la muestra de referencia obtenida no es la adecuada.

Otro aspecto de especial importancia para nuestro equipo es el respeto a los restos óseos de las personas, cuestión entendemos básica de ética y de dignidad. Entendemos por lo tanto que los estudios que impliquen el exhumar restos humanos deben de estar plenamente justificados con base en las necesidades de conocimiento para mejor conocer la verdad de la historia. Sólo donde haya grandes lagunas y donde la información aportada por los estudios de tipo antropológico, forense y genético (u otros similares) suponga o pueda suponer un cambio relevante en el conocimiento o en las teorías que se manejan puede justificar el trabajar con restos humanos. Del mismo modo, si hay información relevante que obtener, entendemos que se justifica el estudio respetuoso y proporcionado de unos restos para conseguir su mejor preservación o aprovechando su movimiento en los casos de reubicación de los mismos.

Queremos hacer esta acotación porque nuestra experiencia nos ha llevado a rechazar propuestas de estudios en los que no había

muestras de referencia adecuadas o en las que solamente se pretendía hacer estudios “por ver lo que pasaba” o “por ver si había algún tipo de infidelidad” previamente no sospechada ni documentada.

Entendemos que dentro de un código de ética y deontología profesional no tienen cabida estas propuestas de exhumaciones y estudios simplemente por curiosidad, por ver si hay algo no conocido previamente, pero sin que haya razones que lo avalen. No somos pues partidarios, sino todo lo contrario, de estudios indiscriminados y sistemáticos sin datos históricos previos que avalen su necesidad.

8. APLICACIONES EN LA IDENTIFICACIÓN DE PERSONAJES HISTÓRICOS

Como ya destacamos, es obvio que la historia es una ciencia que ha sabido aprovechar las nuevas tecnologías para aumentar el número de elementos que apoyen una teoría. El ADN no es la primera, se ha utilizado el carbono-14 desde hace años para datar piezas y así recomponer hipótesis en investigaciones de sucesos históricos.

Dentro de las metodologías de la historia, el ADN no es una herramienta para reinterpretarla, sino un instrumento más para ayudar al resto de las fuentes de trabajo (textos, grabados, materiales...). El ADN puede avalar de modo objetivo una serie de hipótesis y descartar otras, ayudará mejor a los historiadores a entender a una persona o a sus acciones y decisiones, pero pocas veces va a cambiar la historia.

Tomando como ejemplo a los estudios de Cristóbal Colón, sobre el que luego incidiremos, el que sus restos estén en un lugar o en otro, o en ambos o en ninguno, o el que su origen sea italiano, español, portugués o de otro lugar, resulte lo que resulte no va a cambiar lo que es trascendente en la historia, que es lo que hizo, cuándo y cómo lo hizo y para quién lo hizo.

Sí puede haber datos que ayuden a reinterpretar el por qué lo hizo de un modo determinado o en un contexto determinado, el por qué tuvo una serie de ayudas o de negativas a apoyarlo, etc. Sí que ayudará a los historiadores a reinterpretar ciertos pasajes de su vida, comentarios y decisiones, pero no va a cambiar la historia.

No queremos obviamente minusvalorar de ningún modo los resultados de los estudios científicos de cualquier tipo aplicados a la historia, pero sí queremos encajarlos dentro del contexto global en el que se desarrollan, y queremos otorgar el margen de libertad que los historiadores como profesionales pueden tener a la hora de interpretar ciertos acontecimientos.

Uno de los primeros casos históricos donde la identificación genética se convirtió en una herramienta decisiva fue estudio del Zar Nicolás II de Rusia y su familia. El ADN mitocondrial y el cromosoma Y permitieron la identificación del Zar Nicolás II Rusia y de sus familiares, siendo este el fin de su dinastía, según publicaron sus autores principales, Ivanov y Gill (Gill *et al.* 1994: 130-135; Ivanov 1996: 310-316; Ivanov *et al.* 1996: 417-420).

A partir de este primer caso, serían muchos los casos donde se usaría el ADN para descifrar enigmas de la historia, como pueden ser el caso de María Antonieta de Austria, para buscar la filiación con su hijo Luis XVII (Jehaes *et al.* 1998: 383-395), o el de la Universidad de Leicester que identificó el esqueleto del Rey Ricardo III en Londres.

9. LA EXPERIENCIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

Desde 1994 hasta este momento, nuestra Universidad, a través del Laboratorio de Identificación Genética del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física, ha intervenido en la identificación de diversos personajes históricos. Algunos de estos estudios aún continúan y otros están comenzando.

Cronológicamente, el primer estudio de gran perfil y relevancia fue en 1994 el de la identificación de doña Blanca I de Navarra y del Príncipe de Viana, al que siguieron el de Cristóbal Colón, el de Simón Bolívar, Francisco de Miranda o el más recientemente comenzado sobre Leonardo da Vinci.

Hay otros muchos en marcha o ya realizados, junto a proyectos de tipo humanitario y de derechos humanos, que no vamos a abordar en este capítulo.

9.1. Estudio de los restos de doña Blanca de Navarra y del Príncipe de Viana

Por encargo del Gobierno Foral de Navarra, en 1994 iniciamos el mencionado estudio con el objeto de poder identificar unos restos óseos encontrados en Santa María de Nieva (Segovia), que tras ser analizados antropológicamente por el profesor Reverté Coma se llegó a la conclusión que podían ser los de la mencionada reina, pero que sería necesario certificarlo por medio de un análisis de ADN.

Los equipos de historiadores concluyeron que las muestras con las que se podía comparar eran las de don Carlos de Évreux, Príncipe de Viana, sepultado en el Monasterio de Poblet, en Tarragona. El príncipe, como hijo de doña Blanca, debería tener idéntico ADN mitocondrial y la mitad del ADN autosómico (así como uno de los cromosomas X, si bien en aquel momento no se podía estudiar de modo específico).

Surgió entonces un problema, esperable pero ciertamente inesperado, porque en la tumba, en el féretro del príncipe se encontraron restos óseos de hasta tres personas diferentes, como posteriormente certificaron los análisis de ADN. Es históricamente conocido que las tumbas reales de Poblet fueron violadas y saqueadas a lo largo de la historia, y que los huesos de los diferentes personajes estuvieron durante años literalmente amontonados juntos hasta que fueron redistribuidos utilizando protocolos que el tiempo ha venido a demostrar que no fueron los más exactos o adecuados.

En el féretro de Poblet llegamos a encontrar huesos que por su número, tamaño y características, podían corresponder hasta a 3 personas diferentes. Se procedió a hacer el análisis de ADN de todos ellos porque alguno podía ser el príncipe, sobre todo un conjunto de huesos parcialmente momificado.

Sin embargo, el estudio puso de manifiesto que ninguno de los ADN de tipo mitocondrial de los diferentes restos analizados coincidía con los de Blanca de Navarra, madre del príncipe. Todas las secuencias de ADN mitocondrial editadas pertenecían a tres individuos distintos. Por ello, los restos de Santa María de Nieva, quedaron sin identificar, y aunque bien pudieran ser los de doña Blanca, no hay pruebas científicas objetivas y exactas de ello.

Estudios realizados en el año 2008 por otros grupos -dentro de un contexto más amplio de análisis de muchos de los restos de Poblet- corroboran los datos que se obtuvieron en nuestro laborato-

rio a mediados de la década de los noventa, confirmando la existencia de más de un individuo en la momia del príncipe.

Surgen aquí dos reflexiones de especial importancia en este marco de ADN e Historia. Uno, la necesidad de que cuando se llegue a una conclusión, la misma esté perfectamente avalada, con una base científica sólida de varios expertos, de modo que estudios posteriores no la pongan en duda o, incluso peor, la contradigan, porque esto conllevaría discusiones que incluso afectarían a la aceptación de la tecnología en sí.

En segundo lugar, hay que ser especialmente cauto y estudiar a fondo los acontecimientos y circunstancias históricas, porque el hecho de que -como fue aquí el caso- los huesos apareciesen mezclados tiene relevancia. Los historiadores nos informaron de esta posibilidad, y lamentablemente la misma se dio.

Sin embargo, imaginemos que una falta de conocimiento o rigor histórico, unido a una circunstancia que podía haberse dado, como es el hecho de que sólo hubiese habido los huesos momificados de una persona (en vez de los tres que de modo manifiesto se podía ver que había sin ni siquiera ser un experto), podría habernos llevado a cometer un error. El error surgiría porque hubiésemos tomado esa momia como la del príncipe, el ADN no habría coincidido y, a partir de ahí, se habrían generado dos graves errores.

El primero, se habría concluido que los restos de Santa María de Nieva no son los de doña Blanca, lo cual no hubiese sido correcto.

El segundo, habría hecho pública una secuencia de ADN mitocondrial, incluso de cromosoma Y o de autosómico, que sería errónea. Se le habría dado validez como referencia del Príncipe de Viana y de toda la genealogía de los Trastámara (incluyendo su padre Juan II de Aragón y su hermanastro, el Rey Fernando el Católico), lo cual podría haber inducido a graves errores en identificaciones pasadas y futuras.

9.2. Estudio de los restos del Almirante don Cristóbal Colón

Uno de los proyectos más importantes y de mayor repercusión es el de la identificación genética de Cristóbal Colón y sus familiares, un proyecto internacional y multidisciplinar con el objetivo de descifrar algunos de los enigmas del famoso almirante. Promovido en 2002 por el historiador D. Marcial Castro, el objetivo principal de este proyecto era en sí doble.

En primer lugar, tratar de determinar el lugar donde se encontraban sus restos, si República Dominicana y/o Sevilla. El segundo objetivo, con el que aún estamos trabajando, es el de tratar de saber algo sobre los orígenes del mismo, ya que existen diferentes teorías (evidentemente que unas son más sólidas y aceptadas que otras), pero algunas de ellas podrían, cuando menos, descartarse con el estudio genético, y al menos una de ellas podría darse como correcta o muy aproximada.

En la primera fase de este proyecto (2003-2005), además de la Universidad de Granada, participaron los laboratorios de la Universidad de Barcelona (profesor Daniel Turbón), Santiago de Compostela (profesor Ángel Carracedo) en España, así como los laboratorios de la profesora Olga Rickards de la Universidad "Tor Vergata" de Roma (Italia), el laboratorio del profesor Mark Stoneking del Instituto Max Planck de Leipzig (Alemania) y el Laboratorio de la empresa Orchid-Cellmark de Dallas, Texas (EE.UU.). Para esta última fase en la que nos encontramos estudiando los orígenes del almiran-



Figura 4. Restos de don Hernando Colón.



Figura 5. Restos de don Cristóbal Colón.

te (comenzada en 2021), se han incluido los equipos de los laboratorios de la Universidad de Florencia (Prof. David Caramelli), Universidad del Norte de Texas (Prof. Bruce Budowle y Magdalena Bus), Innogenomics (Dr. Sudhir Sinha), D.C. ZOGBI - LORGEN de México (Ing. Jorge Zogbi y Mtra. Erika Ramírez), y la Universidad de Coimbra (profesor Francisco Corte-Real).

En una primera fase (2003-2005) se estudiaron los restos de Cristóbal Colón, los de su hermano Diego y los de su hijo Hernando (Fig. 4), este último enterrado en la Catedral sevillana tras su muerte acaecida en 1539, y a pocas decenas de metros del lugar donde los restos de su padre reposan desde 1898 cuando fueron trasladados desde Cuba.

El estado de conservación de los huesos de don Cristóbal Colón, como puede verse en la figura 5 es bastante deficiente, si bien es en parte bastante lógico teniendo en cuenta no sólo el tiempo transcurrido, sino el número de veces que sus restos fueron trasladados (4 en total: de Valladolid a Sevilla; de Sevilla a Santo Domingo; de Santo Domingo a La Habana, y de La Habana a Sevilla), y las malas condiciones de conservación en sus tumbas (por la humedad y exceso de agua en algunas de ellas).

Igualmente, los restos de Diego Colón, debido a las filtraciones de agua, se encontraban en un estado muy deteriorado. De todos los laboratorios participantes en el proyecto, solo en algunos se obtuvieron resultados. Se encontraron coincidencias en los resultados, pero los fragmentos de ADN mitocondrial obtenidos fueron muy pequeños y la información limitada, pero los datos genéticos sumados a los obtenidos por todos los participantes antropólogos, entomólogos e historiadores permitieron concluir que los restos encontrados en la catedral de Sevilla pertenecían al almirante.

Es muy importante destacar que si bien los restos que hay en la Catedral de Sevilla son de Cristóbal Colón, es obvio y evidente (obsérvese la fotografía) que en dicha urna no se encuentran todos los huesos que corresponden al esqueleto completo de una persona, sino que hay un número significativamente menor.

Es bien sabido, desde que en 1959 el Dr. Charles W. Goff, de la Universidad de Yale, estudió los huesos de Colón que hay en la República Dominicana, que en este lugar tampoco se encuentra el esqueleto completo de una persona, por lo que la ausencia de huesos en la tumba de Sevilla podría ser debida a una división de los

restos en el momento de su traslado a La Habana. Sería necesario estudiar con ADN los restos que hay en Santo Domingo para poder tener más información objetiva.

La última fase del proyecto de identificación de los restos de Cristóbal Colón, su hermano Diego y su hijo Hernando se está realizando, desde mayo de 2021, con las últimas técnicas y avances en genética forense. Se refiere a tratar de arrojar información objetiva sobre los orígenes de tan egregio personaje, que si bien es universal y mayoritariamente aceptado que es de origen italiano (genovés), también es cierto que existen diferentes teorías sobre su origen español (en diversas ubicaciones) o portugués que podrían confirmarse o descartarse en el caso de poder hacer estudios comparativos directos con ADN.

10. EL ESTUDIO GENÉTICO DE LOS RESTOS DE DON TELLO, SEÑOR DE VIZCAYA

El estudio de los restos óseos de don Tello, Señor de Vizcaya, se enmarca pues en el contexto del análisis de personajes históricos de la Edad Media española, concretamente en la baja Edad Media, al ser este el caso de un personaje fallecido en 1370.

Tras su exhumación en julio de 2012 y el estudio antropológico por parte del Dr. D. Juan Manuel Guijo Mauri, un hueso (fémur) (Fig. 7) y restos de piel momificada (Fig. 6) fueron trasladados al Laboratorio de Identificación Genética de la Universidad de Granada para su estudio.

El interés del estudio genético de los restos de don Tello no era inicialmente a efectos de su identificación, en tanto en cuanto no había familiares cercanos o lejanos con los que comparar su ADN, pero sí el de poder tener datos genéticos que en un momento determinado pudiesen servir de referencia para la identificación de personajes contemporáneos suyos ligados a la Casa de los Trastámara, tan amplia y de tan gran importancia en la historia española.

En paralelo, el estudio de algunas regiones del cromosoma Y así como del ADN mitocondrial podría ofrecernos información interesante sobre los orígenes de la familia al poder compararlo con las grandes bases de datos de ambos tipos de ADN mencionados que existen en la actualidad.



Figura 6. Restos parcialmente momificados de don Tello.



Figura 7. Fragmento óseo de don Tello.

El estudio genético de los restos del Señor de Vizcaya, con los que estamos trabajando en este momento, se ve muy limitado por la antigüedad de los mismos. Pese al aparente buen estado de los restos óseos, los análisis preliminares que se han realizado se encontraron con que la calidad y cantidad del ADN eran muy limitadas, como se puede observar en la figura 7, el material estaba deteriorado por el paso de los casi 700 años.

Sobre la calidad del ADN, o sea, sobre la preservación del mismo, influyen factores a veces desconocidos tras tanto tiempo, como son las infecciones en el momento de la muerte, infecciones que no tienen por qué ser la causa, pero sí que suponen la presencia de mayor cantidad sobre todo de bacterias que degradan con avidez el ADN; sin duda alguna, el extremo de mayor degradación del material genético se produce en los casos de muerte por una causa infecciosa aguda o un shock séptico, que influyen acelerando e incrementando los procesos de putrefacción, o sea, de degradación del material biológico.

En la época medieval la infección como causa o concausa de muerte era ciertamente frecuente, teniendo en cuenta las numerosas heridas que se producían en labores de todo tipo -no necesariamente en casos de heridas de guerra- y la ausencia casi total de sustancias con efecto bactericida (recordemos que los antibióticos se usaron a partir de los hallazgos de la penicilina por Fleming, pero ya casi a mediados del siglo XX).

Cada vez más laboratorios forenses están implementando lo que se ha denominado secuenciación de nueva generación (NGS, *next generation sequencing*), sofisticados equipos que permiten la secuenciación de varios marcadores al mismo tiempo, no sólo de tipo STR, sino también variaciones en un solo nucleótido (SNPs, *single nucleotide polymorphism*), que permiten no solamente identificar a un individuo, sino incluso analizar su linaje paterno o materno, su ancestralidad u origen geográfico, o incluso características fenotípicas como el color de los ojos, el tono de la piel o la forma del pelo, señalándose la utilidad de esta tecnología para el análisis de muestras mínimas o muy degradadas.

Entendemos que la prudencia debe ser la máxima en este caso -como en todos los estudios de tipo histórico- para evitar generar datos que pueden ser extrapolados a la identificación de otros personajes conduciendo a errores, como explicamos anteriormente que podía haber pasado en el caso del Príncipe de Viana.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.

1981 "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", *Nature* 290, 457-465.

Caramelli, D.; Lalueza-Fox, C.; Vernesi, C.; Lari, M.; Casoli, A.; Mallegni, F.; Chiarelli, B.; Dupanloup, I.; Bertranpetit, J.; Barbujani, G.; Bertorelle, G.

2003 "Evidence for a genetic discontinuity between neandertals and 24,000-year-old anatomically modern europeans", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(1), 6593-6597.

Collins, M.; Nielsen-Marsh, C.; Hiller, J.; Smith, C.; Roberts, J.; Prigodich, R.; Wess, T.; Csapo, J.; Millard, A.; Turner-Walker, G.

2002 "The survival of organic matter in bone: a review", *Archaeometry* 44, 383-394.

Gill, P.; Ivanov, P. L.; Kimpton, C.; Piercy, R.; Benson, N.; Tully, G.; Evett, I.; Hagelberg, E.; Sullivan, K.

1994 "Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis", *Nature Genetics* 6(2), 130-135.

Haarkötter, C.; Saiz, M.; Alvarez-Cubero, M.; Álvarez, J. C.; Lorente, J.

2022 "Challenges in the DNA Analysis of Compromised Samples", Dash H. R. *et al. Handbook of DNA Profiling*. Springer.

Hagelberg, E.; Clegg, J. B.

1991 "Isolation and characterization of DNA from archaeological bone", *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 244(1309), 45-50.

Hagelberg, E.; Quevedo, S.; Turbon, D.; Clegg, J. B.

1994 "DNA from ancient Easter Islanders [5]", *Nature* 369, 25-26.

Ivanov, P. L.

1996 "Identification of the remains of the Romanov family: contribution of molecular genetics", *Vestnik Rossijskoj Akademii Nauk* 66, 310-316.

Ivanov, P. L.; Wadhams, M. J.; Roby, R. K.; Holland, M. M.; Weedn, V. W.; Parsons, T. J.

1996 "Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II", *Nature Genetics* 12(4), 417-420.

Jehaes, E.; Decorte, R.; Peneau, A.; Petrie, J. H.; Boiry, P. A.; Gilissen, A.; Moisan, J. P.; Van den Berghe, H.; Pascal, O.; Cassiman, J. J.

1998 "Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette", *European Journal of Human Genetics* 6(4), 383-395.

Jobling, M.; Hurles, M.; Tyler-Smith, C.

2003 *Human Evolutionary Genetics: Origins, People and Disease*, Garland Science/Taylor & Francis Group, New York.

Lutz, S.; Weisser, H.; Heizmann, J.; Pollak, S.

2000 "Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals", *International Journal of Legal Medicine* 113(3), 155-161.

Pääbo, S.

1989 "Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(6), 1939-1943.

1985 "Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA", *Nature* 314, 644-645.

1985 "Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies", *Journal of Archaeological Science* 12, 411-417.

Pääbo, S.; Poinar, H.; Serre, D.; Jaenicke-Despres, V.; Hebler, J.; Rohland, N.; Kuch, M.; Krause, J.; Vigilant, L.; Hofreiter, M.

2004 "Genetic analyses from ancient DNA", *Annual Review of Genetics* 38, 645-679.

Parsons, T. J.; Muniec, D. S.; Sullivan, K.; Woodyatt, N.; Alliston-Greiner, R.; Wilson, M. R.; Brery, D. L.; Holland, K. H.; Weedn, V. W.; Gill, P.; Holland, M. M.

1997 "A high observed substitutional rate in the human mitochondrial DNA control region", *Nature Genetics* 15, 362-367.

Reyment, R. A.

1983 "Moors and Christians: an example of multivariate analysis applied to human blood-groups", *Annals of Human Biology* 10(6), 505-521.

Wallace, D. C.

1992 "Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases?", *Science* 256, 628-632.

Wallace, D. C.; Torroni, A.

1992 "American Indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: a review", *Human Biology* 64(3), 403-416.

Watson, J. D.; Crick, F. H. C.

1953 "Molecular Structure of Nucleic Acids - A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid", *Nature* 171, 737-738.

Las figuras que se incluyen en este trabajo, salvo que figure en ellas otra indicación, han sido elaboradas por los autores del mismo.