

# Identificación genética de los restos de la familia Colón

José Antonio Lorente Acosta\*  
Universidad de Granada

## Resum

**L**es tècniques d'anàlisi genètiques de restes antigues s'apliquen ara per mirar de resoldre un dels més grans misteris de la història: els orígens de Cristòfol Colom.

Tot i ésser ver que cap projecte científic que inclogui la investigació i el desenvolupament de noves tècniques té l'èxit garantit a priori, també ho és que amb la tecnologia actual es poden escometre estudis que permetin aclarir l'origen de Colom o, almanco, treure del mig algunes de les nombroses hipòtesis avui plantejades. Aquest va ésser, de fet, el compromís de la Universitat de Granada, adquirit a proposta del promotor dels estudis, l'historiador Marcial Castro, de la localitat sevillana d'Estepa.

En la identificació humana l'ADN ha adquirit un paper primordial a través de l'evolució de les ciències forenses. Des d'aquesta perspectiva, classificam l'ADN en tres de diferents segons el model d'herència, el que implica els usos i limitacions en identificació humana.

El primer tipus és l'ADN autosòmic, conformat pels vint-i-dos parells de cromosomes autosòmics (és a dir, deslligats del sexe) de procedència materna i paterna, a parts iguals. Constitueix la major part de l'ADN nuclear (un 98%, aproximadament) i es fa servir en els estudis de paternitat i maternitat i també per establir altres vincles familiars (germans, oncles, cosins) sempre que la distància generacional entre les persones avaluades no sia excessiva. L'ADN autosòmic és únic per a cada individu, llevat el cas dels germans bessons univitel·lins, i té un poder d'identificació altíssim (superior al 99,9999%).

El segon tipus és l'ADN del cromosoma Y, determinant del sexe masculí i plaçat en la parella núm. 23 dels cromosomes nuclears. Aquest ADN, transmès totalment pel pare als fills mascles, serveix per determinar la paternitat i per establir vincles entre persones amb antecessors comuns per la mateixa línia. La seva capacitat d'identificació és, tanmateix, limitada perquè és compartit per diverses persones (com també el primer llinatge d'un home no és exclusiu d'ell perquè el comparteix amb tots els germans, oncles, cosins paternals, fills mascles, etc.).

El tercer tipus, denominat ADN mitocondrial, el trobam a l'interior de les mitocondries (és, per tant, extranuclear).

Molt curt (16.569 unitats o parells de bases) i de forma circular, està present amb múltiples còpies idèntiques dins d'una mateixa cèl·lula. Aquesta circumstància facilita el seu estudi en mostres molt antigues o degradades com poden ésser les restes òssies. Com que s'hereta exclusivament de la mare, és idèntic en les persones procedents d'una mateixa línia materna (germans, cosins fills de germanes de la mare, etc) i, en conseqüència -tal com succeïa amb el cromosoma Y- la seva capacitat d'identificació és limitada perquè és compartit per diferents persones. Els estudis d'identificació de Cristòfol Colom han pretès donar resposta a dues qüestions principals: una, on reposen els ossos de Colom?, l'altra, d'on era el descobridor?

La primera qüestió té ja una resposta definitiva: després de comparar l'ADN mitocondrial dels ossos de la Catedral de Sevilla amb el dels de Diego, germà de l'almirall, es conclou que tots dos són idèntics (el que és propi de germans de mare); a més, els estudis antropològics dirigits pel Prof. Miguel Botella, de la Universitat de Granada, confirmen que, ateses les característiques antropomètriques, aquelles despulles poden ésser les de Colom, tot afegint que a Sevilla no es conserva un esquelet complet sinó només del 20 al 30% de l'ossada. La resta hauria d'estar a República Dominicana, tot i que no ens ha estat permès de realitzar cap estudi que científicament avaluï aquesta hipòtesi. La segona vessant del nostre estudi, d'on era Cristòfol Colom, està en curs. Per mirar de respondre, hem engegat dues investigacions: un mira de corroborar la denominada "teoria mallorquina" perquè fa a Colom natural de Felanitx i fill de Carles, Príncep de Viana, i de Margalida Colom. En marxa està l'estudi dels ADN del cromosoma Y de Cristòfol Colom, del seu fill Hernando (inhumat a la Catedral de Sevilla, sense haver-hi dubtes d'identificació) i de Carles d'Evreux, Príncep de Viana, sepultat al Monestir tarragoní de Poblet.

En paral·lel, tot assumint de bon començament un plantejament científic obert a la veritat, està en curs l'anàlisi de l'ADN del cromosoma Y de 477 persones amb llinatge "Colom" de l'àrea de Catalunya, València, Balears i Sud de França, i amb llinatge "Colombo" de les regions de la Ligúria i la Llombardia, a Itàlia. Es pretén així establir una possible relació entre l'ADN del descobridor i el dels descendents col·laterals que puguin habitar aquelles contrades.

## Resumen

**L**as técnicas de análisis genético de restos antiguos están siendo utilizadas para tratar de resolver uno de los misterios más grandes de la historia, cual es el de desvelar los orígenes de Cristóbal Colón.

Si bien es cierto que ningún proyecto científico donde se incluya la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas

tiene, a priori, el éxito garantizado, sí que es cierto que con la tecnología actual se pueden intentar estudios que permitan aclarar el origen de Colón o, cuando menos, descartar algunas de las múltiples hipótesis existentes en la actualidad.

Este fue el compromiso con el que desde la Universidad de Granada respondimos a la propuesta del promotor de

\* Director del Laboratorio de Identificación Genética  
Dpto. de Medicina Legal  
Medicina Balear 2007; 43-65

esos estudios, el historiador Marcial Castro, de Estepa (Sevilla) España.

En identificación humana el ADN ha tomado un papel primordial a través del desarrollo de las ciencias forenses. Desde esta perspectiva, clasificamos al ADN en tres tipos diferentes, según el modo de herencia, lo que implica los usos y limitaciones en identificación humana. El primer tipo es el ADN autosómico, conformado por los 22 pares de cromosomas autosómicos (o sea, no ligados al sexo), y que toda persona lo tiene procediendo la mitad del padre y la otra mitad de la madre. Este ADN conforma la mayor parte del ADN nuclear (un 98% del total aproximadamente), y sirve para hacer estudios de paternidad y maternidad, al igual que para establecer otros vínculos familiares (hermanos, tíos, primos) siempre que no nos alejemos mucho generacionalmente de las personas a estudiar. Es único para cada persona, excepto los gemelos univitelinos, y tiene un altísimo poder de identificación (>99.9999%).

El segundo tipo es el ADN del cromosoma Y, ubicado en la pareja 23 de cromosomas nucleares, y que determina el sexo masculino. Este ADN se hereda completamente desde el padre a todos sus hijos varones, por lo que sirve para determinar la paternidad y para establecer vínculos entre personas que tengan antecesores comunes por la misma línea. Su capacidad de identificación está limitada ya que es compartido por varias personas (igual que el primer apellido no es único de una persona, sino que lo tienen todos los hermanos, tíos y primos paternos, hijos varones, etc.) El tercer tipo es el denominado ADN mitocondrial, así llamado por encontrarse dentro de las mitocondrias (es por tanto extranuclear). Con un tamaño muy pequeño (16.569 unidades o pares de bases), tiene forma circular y está presente con múltiples copias idénticas dentro de una misma célula, lo cual facilita su estudio en muestras muy antiguas o degradadas, como son los restos óseos. Se hereda exclusivamente de la madre, de modo que todas las personas procedentes de una misma línea materna (hermanos, primos hijos de hermanas de la madre, etc.) lo tienen idéntico, por lo que al igual que le pasaba al cromosoma Y, su capacidad de identificación está limitada ya que es compartido por diferentes personas. En los estudios de identificación de Cristóbal Colón desarrollados hasta la fecha, se ha tratado de responder a dos cuestiones principales: una,

dónde están los huesos de Colón, y dos, de dónde era Cristóbal Colón. La respuesta a la primera cuestión tiene ya una respuesta definitiva, porque tras la comparación del ADN mitocondrial de los huesos –presuntos- de Colón que hay en la Catedral de Sevilla con el ADN de los huesos de su hermano Diego, se ha observado que ambos son idénticos (propio de personas con la misma madre), además de que los estudios antropológicos (dirigidos por el Prof. Miguel Botella de la Universidad de Granada) confirman que por las características antropométricas esos restos pueden ser los de Colón, si bien es cierto que hay que decir que en Sevilla no está el esqueleto completo de una persona, sino el 20 ó 30% del mismo como mucho. El resto del esqueleto de Colón debería estar en República Dominicana, aunque no se nos ha permitido aún realizar ningún estudio que científicamente avale esta hipótesis.

La segunda parte de nuestra investigación, de dónde era Cristóbal Colón, está en marcha. Para ello se han desarrollado estudios de dos tipos diferentes. Uno, tratando de corroborar la denominada “teoría mallorquinista” que hace a Colón balear de Felanitx (Mallorca) e hijo de D. Carlos Príncipe de Viana y de Margalida Colom. Se está estudiando el ADN del cromosoma Y de Cristóbal Colón, de su hijo Hernando (que se enterró en la Catedral de Sevilla y sobre el que no hay dudas de su identificación) y del posible padre, según la teoría mallorquina, D. Carlos de Evreux, Príncipe de Viana, cuyo cuerpo yace en el Monasterio de Poblet (Tarragona). Aunque su identificación no está exenta de polémica, ya que en el fétetro hay restos de varias personas; todo parece indicar que la parte superior momificada corresponde al cuerpo de D. Carlos. La forman cabeza, cuello, tronco y ambas extremidades superiores; faltan el antebrazo y la mano derecha, que según referencias históricas fueron extirpados como reliquia. Paralelamente a esta investigación, y asumiendo desde el comienzo de estos estudios un planteamiento científico abierto a la verdad, sea cual sea, se está analizando el ADN del cromosoma “Y” en 477 personas de apellidos “Colom” de la zona de Cataluña, Valencia, Baleares y Sur de Francia. Así como de apellido “Colombo” de las regiones de Liguria y Lombardía en Italia. Con ello se pretende encontrar una posible relación entre el ADN del descubridor y descendientes colaterales que habiten en esas zonas.

## Summary

Genetic analysis techniques of ancient remains are being used to try and solve one of the greatest mysteries in history, that of the discovery of the origins of Christopher Columbus. Although it is true that no scientific project which includes the investigation and development of new techniques has, a priori, guaranteed success, it is also true that with current technology it is possible to carry out studies which enable us to clarify the origin of Columbus or, at least, rule out some of the many currently existing hypotheses. This was the commitment with which the University of Granada responded to the proposal from the sponsor of these studies, the historian Marcial Castro of Estepa, Sevilla. DNA has played a fundamental role throughout the development of forensic science. From this perspective we

have classified the DNA into three different types, according to the manner of inheritance, which has implications for the usage and limitations in human identification.

The first type is autosomal DNA, made up of the 22 autosomal chromosome pairs (not linked to sex) and of which everybody has half derived from the father and the other half from the mother. This DNA forms the majority of the DNA nucleus (approximately 98% of the total) and is used for carrying out paternity and maternity studies and equally establishing other family links (brothers, uncles, male cousins) providing that we don't digress too far in terms of generations from the people to be studied. It is unique to each individual, except for monozygotic twins and is highly effective for identification (>99.9999%).

The second type is Y chromosome DNA, located in pair 23 of the chromosome nuclear and which determines the masculine sex.

This DNA is inherited completely from the father by all his sons; this is used in order to determine paternity and to establish links between people with common ancestors of the same line. Its identification capability is limited since it is shared by several people (in the same way that in some European countries the first surname is not unique to any one individual but is held by all brothers, uncles and paternal male cousins, sons, etc.)

The third type is named mitochondrial DNA, so-called because it is found inside the mitochondria (and is therefore extranuclear). Extremely small in size (16.569 units or base pairs), it is circular in shape and has multiple identical copies within one same cell, enabling it to be studied in particularly old or deteriorated samples, as is the case with bone remains. It is exclusively inherited from the mother and is identical in all females from one same maternal line (siblings, cousins, children of sisters of the mother, etc.) As with the Y chromosome, its identification capability is limited since it is shared by different people. In the studies to identify Christopher Columbus developed to date, attempts have been made to answer two main questions: one, where are Columbus's bones, and two, where did Christopher Columbus originate from.

The answer to the first question already has a definite answer, as the mitochondrial DNA comparison of the "alleged" bones of Columbus which are in Seville cathedral with the DNA of the bones of his brother Diego, has shown that they are both identical (typical of people with the same mother). Furthermore, the anthropological studies (conducted by Prof. Miguel Botella of the University of Granada) confirm that judging from the anthropometric characteristics these remains could be those of Columbus, although it should be mentioned there is no complete ske-

leton in Seville but only 20 or 30% of it at most.

The rest of Columbus's skeleton is said to be in the Dominican Republic, although we have not been allowed to carry out any studies to scientifically confirm this hypothesis.

The second part of our investigation, where did Christopher Columbus originate from, is currently underway. For this, two different types of studies have been developed. One, trying to corroborate the so-called "Majorcan theory" which postulates that Columbus was from the Balearic Islands, Felanitx (Mallorca) and was son of D. Carlos Prince of Viana and Margalida Colom. Studies are being carried out on the Y chromosome DNA of 3 individuals: Christopher Columbus, his son Hernando (who was buried in Seville's cathedral and whose identity presents no doubts) and the possible father D. Carlos of Evreux, Principe de Viana, whose body lies in the Monastery in Poblet (Tarragona). However the identification of this last individual is not without controversy since his coffin contains remains of different people. But it all seems to indicate that the upper mummified section corresponds to the body of D. Carlos. This section forms the head, neck, trunk and both upper extremities. The forearm and the right hand are missing, according to historical references, were removed as relics.

Parallel to this investigation on the possible Majorcan origin of Columbus, another investigation is being carried out on the "Y" chromosome DNA of 477 people with the surname "Colom" in the regions of Catalonia, Valencia, the Balearics and South of France. This study is also being carried out on the surname "Colombo" from the Liguria and Lombardy regions in Italy. With this it is hoped to find a possible relationship between the DNA of the explorer and collateral descendants who live in these areas. In this way, from the very beginning of these studies, a scientific approach to the truth is guaranteed whatever the outcome.

## Résumé

Les techniques d'analyse génétique de restes humains sont actuellement utilisées pour essayer de résoudre l'un des plus grands mystères de l'histoire, les origines de Christophe Colomb.

S'il est vrai que le succès d'un projet scientifique comportant de la recherche et le développement de nouvelles techniques n'est pas, a priori, garanti, il est vrai aussi que grâce à la technologie actuelle, nous pouvons tenter des études pour éclaircir l'origine de Colomb ou, du moins, écarter un certain nombre des multiples hypothèses que nous avons aujourd'hui. C'est dans ce propos que nous répondons, depuis l'Université de Granada, à la proposition du promoteur de ces études, l'historien Marcial Castro, d'Estepa, Séville.

L'ADN a acquis un rôle primordial en identification humaine, grâce au développement des sciences légistes. Dans cette perspective, nous classerons l'ADN en trois types différents, selon la forme d'hérédité, ce qui implique

les usages et les limites en identification humaine. Le premier type est l'ADN autosomique, formé des 22 paires de chromosomes autosomiques (c'est à dire non rattaché au sexe), que toute personne possède, la moitié provenant du père, l'autre moitié de la mère. Cet ADN forme la plus grande partie de l'ADN nucléaire (environ 98% du total) et sert à faire des études de paternité et de maternité ou à établir d'autres liens familiaux (frères et sœurs, oncles et tantes, cousins et cousines) si nous ne nous éloignons pas trop, en termes de générations, des personnes à étudier. Il est unique pour chaque personne, sauf pour les jumeaux univitellins, et a un très haut pouvoir d'identification (>99.9999%). Le second type est l'ADN du chromosome Y. Situé dans la paire 23 des chromosomes nucléaires, il détermine le sexe masculin. Cet ADN est transmis intégralement du père au fils, et sert donc à déterminer la paternité et à établir les liens entre des personnes qui ont des ancêtres communs sur la même lignée.

Sa capacité d'identification est limitée car il est commun à plusieurs personnes (comme le nom qui n'est pas unique à une personne, mais aussi utilisé par les frères, oncles et cousins paternels, fils, etc.)

Le troisième type est l'ADN mitochondrial, appelé ainsi car il se trouve dans les mitochondries (il est donc extra-nucléaire). D'une très petite taille (16.569 unités ou paires de base), il a une forme circulaire et est présent avec de multiples copies identiques dans une même cellule, ce qui facilite son étude dans des restes très anciens ou dégradés, comme les restes osseux. Il s'hérite exclusivement de la mère, et toutes les personnes provenant d'une même lignée maternelle (frères et soeurs, cousins cousines enfants des soeurs de la mère, etc.) ont le même. Tout comme pour le chromosome Y, son identification est limitée car il est commun à plusieurs personnes.

Les études d'identification de Christophe Colomb menées jusqu'à maintenant essayait de répondre à deux principales questions : où sont les restes de Christophe Colomb et d'où vient Christophe Colomb.

La première question a déjà une réponse définitive, car en comparant l'ADN mitochondrial des os présumés de Christophe Colomb qui se trouvent dans la cathédrale de Séville, avec l'ADN des os de son frère Diego, on a découvert qu'ils étaient identiques (comme chez les personnes qui ont la même mère) et en plus les recherches anthropologiques (dirigées par le Prof. Miguel Botella de l'Université de Grenade) confirment que, par les caractéristiques anthropologiques, ces restes pourraient bien être ceux de Christophe Colomb. Mais il faut aussi dire qu'il n'y a pas le squelette complet à Séville mais seulement 20 ou 30 % tout au plus de ce dernier.

Le reste du squelette de Christophe Colomb devrait être en République Dominicaine, mais on n'a pas encore autorisé la réalisation d'une étude qui avalerait scientifiquement cette hypothèse. La seconde partie de notre recherche, d'où vient Christophe Colomb, est en route. Pour cela, on a mis en marche deux types d'études différentes. L'une essaie de corroborer ce qu'on appelle la "théorie majorquiniste" qui prétend que Christophe Colomb provient des îles Baléares, de Felanitx (Majorque) et est le fils de D. Carlos Prince de Viana et de Margalida Colom. On étudie actuellement l'ADN du chromosome Y de Christophe Colomb, de son fils Hernando (qui est enterré dans la cathédrale de Séville et dont il n'y a pas de doutes sur l'identification) et du possible père, selon la théorie majorquiniste, D. Carlos de Evreux, Prince de Viana, dont le corps se trouve au monastère de Poblet (Tarragone). Bien que son identification n'est pas exempte de polémique, puisque le cercueil renferme des restes de plusieurs personnes, tout semble indiquer que la partie supérieure momifiée corresponde au corps de D. Carlos. Soit la tête, le cou, le tronc et les deux extrémités supérieures, l'avant-bras et la main droite ayant été extirpés comme relique, selon des références historiques.

Parallèlement à cette recherche, comme notre étude scientifique, dès le départ, est à la recherche de la vérité quelle qu'elle soit, on est aussi en train d'analyser l'ADN du chromosome "Y" de 477 personnes portant le nom "Colom" dans la zone de la Catalogne, de Valence, des Baléares et du Sud de la France. Et portant le nom "Colombo" dans les régions de Ligurie et de Lombardie en Italie. Nous prétendons ainsi trouver une possible relation entre l'ADN du découvreur et ses descendants collatéraux qui habitent ces régions.

## Introducción al enigma histórico

**C**ristóbal Colón, uno de los personajes más universales de la historia de la humanidad ha conseguido, quinientos años después de su muerte, lo que con especial ahínco persiguió en vida: el ocultar sus verdaderos orígenes o, cuando menos, el crear confusión sobre los mismos. Sobre esta, se añadió la derivada de los diversos traslados que sus restos mortales sufrieron, todos ellos justificados históricamente, pero complejos y no exentos de polémica.

Es obvio que la duda de mayor trascendencia histórica es aquella que se centra en los orígenes de Cristóbal Colón, mayoritariamente aceptado como de origen genovés, pero que muchos historiadores, apoyados en datos objetivos relacionados –por ejemplo con sus escritos y la lengua en ellos plasmada, lo sitúan como originario de zonas catalano-parlantes.

Existe también, dentro de este contexto de catalanidad, una teoría que afirma que el más grande de los

navegantes y descubridores es hijo del Príncipe de Viana y de la mallorquina Margalida Colom, y que nació en Felanitx (Mallorca), en 1460 ó 1461, fruto de las relaciones entre el Príncipe Carlos de Evreux y la mencionada Margalida Colom en la estancia –a lo largo de su destierro– del Príncipe en Mallorca. Pese a la complejidad del tema, sin duda paralela a la trascendencia del mismo, las ciencias aplicadas, en este caso la genética forense, pueden tratar de aportar un poco de luz sobre el caso, consiguiendo datos objetivos que, adecuadamente interpretados, sean capaces de confirmar o descartar algunas de las múltiples teorías existentes. En este contexto, en el Laboratorio de Identificación Genética del Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Granada –que me honro en dirigir– se están llevando a cabo una serie amplia de estudios genéticos, donde se incluye el análisis del ADN de los restos de Hernando Colón para compararlo con el que sería su abuelo, el Príncipe de Viana. Hemos de conocer que hay al menos dos lugares (Sevilla y Santo Domingo) que reclaman contener los restos de Colón.

Por otra parte, hay restos de su hermano Diego en Sevilla (en la fábrica de cerámicas de La Cartuja – Pickmann, y de su hijo Hernando (a veces escrito como Fernando) en la Catedral de Sevilla. Los restos de Hernando Colón son de gran importancia porque son los más indubitados, o sea, no hay dudas en absoluto de ellos, ya que cuando murió se le enterró en la Catedral de Sevilla y nunca jamás fueron trasladados de la misma.

Las páginas siguientes están destinadas a explicar los mecanismos de identificación genética existentes de aplicación en la identificación de Cristóbal Colón, y que se basan en el estudio de lo que –en la práctica forense– son tres tipos de ADN diferentes, según su herencia: el mitocondrial, el del cromosoma “Y”, y el nuclear autosómico.

## Introducción al análisis genético de los restos de Cristóbal Colón y sus familiares

El intento de identificación de los orígenes del Almirante nos obliga a desarrollar un amplio estudio genético tendente, en primer lugar, a comprobar la autenticidad de los restos que hay en la Catedral de Sevilla (lamentablemente, las autoridades dominicanas aún no nos han dado permiso para estudiar los presuntos huesos de Colón que ellos preservan), y posteriormente, en segundo lugar, a poder conocer algo de los orígenes.

Todo ello hace que sea estrictamente necesario estudiar toda la amplia gama de marcadores que existen, o sea, hacer todo tipo de análisis genéticos de identificación. Esto queda resumido del siguiente modo:

**1. ADN Mitocondrial:** se hereda por todas las personas procedentes de su madre. Permite ver relaciones hermano-hermano de madre, y puede corroborar o descartar hipótesis históricas.

Su análisis se realiza por medio de secuenciación tras PCR. Se analizarán regiones tipo SNP ahora en desarrollo. También se puede considerar la clonación.

**2. ADN del cromosoma “Y”:** se hereda sólo por los varones procedentes del padre. Se estudiarán STRs y SNPs, con técnicas similares a las descritas para el ADN autosómico. Este es un ADN necesario para establecer las relaciones padre-hijo (Cristóbal-Hernando), así como hermano-hermano de padre (Cristóbal-Diego). Es el de principal interés para

poder relacionar a Hernando Colón con el Príncipe de Viana.

**3. ADN Autosómico:** se hereda mitad de la madre y mitad del padre. Su estudio se basa en el análisis de STR (short tandem repeats) tras extracción del ADN y amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Paralelamente trataremos de analizar SNPs (single nucleotide polymorphisms) por medio de la técnica del SnaPshot, actualmente muy desarrollada por parte de Applied.

Este ADN es imprescindible para identificar a Cristóbal porque su hijo tiene la mitad del ADN idéntica y también para ver si los huesos de la Catedral de Sevilla y los de Rep. Dominicana son de la misma persona.

## Análisis de ADN Mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos con forma ovalada que están presentes en el interior de las células humanas, en un número variable. La mitocondria tiene una membrana externa y una interna muy plegada, que engloban una matriz fluida. En el orgánulo se desarrolla la fosforilación oxidativa, proceso productor de la energía celular. En la matriz, las moléculas orgánicas procedentes de la degradación de las materias alimenticias se oxidan en una serie de reacciones químicas llamadas ciclo del ácido cítrico. Los electrones obtenidos en dicho ciclo atraviesan una cadena de complejos enzimáticos respiratorios situados en la membrana interna, que dirigen la fosforilación del ADP en ATP que es la molécula portadora de la energía en la célula.

Las mitocondrias, por ser probablemente descendientes de una bacteria “independiente”, poseen su propio material genético, el ADN mitocondrial (ADNmt) y la maquinaria para expresarlo, pero todo parece apuntar a que el ADNmt es, simplemente, un callejón evolutivo sin salida, una reliquia de la supuesta bacteria simbiótica. Habría que remontarse a unos 1500 millones de años para pensar en un acontecimiento crucial en la evolución orgánica, esto es, la absorción y posterior simbiosis (protección por oxígeno) entre una célula huésped (preucariótica) y una célula menor que había adquirido la capacidad de respirar. La respiración libera mucha más energía que la fermentación anaeróbica y fue la creciente abundancia de oxígeno en la atmósfera la que acabó por consolidar una relación y posterior evolución que ha perdurado hasta nuestros días.

Aunque las mitocondrias poseen su propio material genético, no son genéticamente autosuficientes ya que gran parte de sus proteínas funcionales y estructurales están codificadas por genes presentes en el núcleo celular. El ADN nuclear está estrechamente asociado con proteínas y repartido en cromosomas, en cambio, el ADNmt se asemeja al ADN bacteriano en su forma de doble hélice circular.

El ADNmt es un modelo de economía ya que sus genes están tan empaquetados que la mayor parte de los aproximadamente 16569 pares de bases (pb) que lo componen parecen tener alguna utilidad. La región codificante contiene 37 genes, de los cuales 22 son para ARN de transferencia, 2 para ARN ribosómicos y 13 para proteínas envueltas en la fosforilación oxidativa y en la producción de ATP.

El ADNmt humano fue completamente secuenciado en 1981 por Anderson y colaboradores y hoy se utiliza esa primera secuencia como referencia. Las dos hebras complementarias o cadenas del ADNmt tienen diferencias significativas en la composición de las bases que conforman sus nucleótidos de manera que se denomina **cadena pesada o H (Heavy)** a aquella que es rica en bases púricas y **cadena ligera o L (Light)** a la que por el contrario posee un número mayor de bases pirimidínicas.

Además de la región codificante, hay una región no codificante denominada **región control** y debido a las estructuras visibles bajo microscopía electrónica durante la replicación también es llamada **asa de desdoblamiento**. La nomenclatura que se utiliza para nombrar la posición que ocupa cada nucleótido fue elegir arbitrariamente una posición intermedia en la

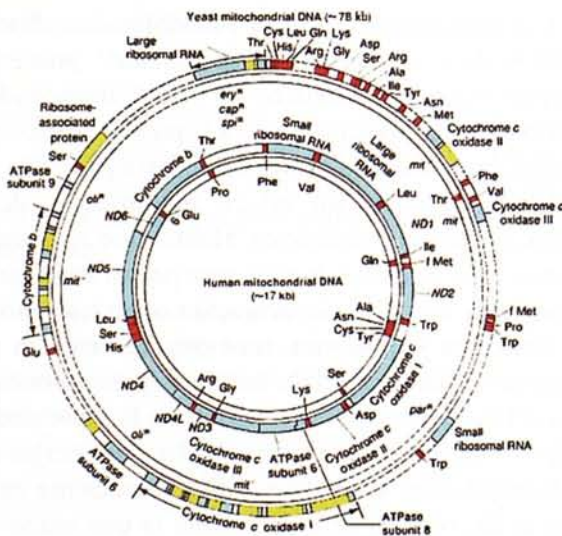
región control y denominar a esta posición 1 y continuar en sentido 5' a 3' alrededor del círculo hasta la posición 16569 pares de bases. La región control es responsable de la regulación de la molécula de ADNmt, tiene aproximadamente 1122 pares de bases de longitud y contiene los promotores de transcripción de ambas cadenas y el origen de replicación de la cadena pesada. La región control abarca desde la posición 16024 hasta la 16569 continuando desde la posición 1 hasta la 576. A diferencia de lo que ocurre en las regiones codificantes del ADNmt, la región control tiene una alta variabilidad entre individuos, razón por la cual se ha convertido en objeto de análisis en estudios antropológicos e investigación en genética forense.

Podemos dividir la región control en otras regiones en función de su grado de variabilidad. Por un lado las más ampliamente estudiadas y conocidas por su alto grado de variabilidad; son la **región hipervariable 1 (HV1)** que abarca las posiciones 16024-16365 y la **región hipervariable 2 (HV2)** que va desde la posición 73 a la 340 (a veces se habla de una tercera región hipervariable: la HV3 entre las posiciones 440-560). Pero además existen otras regiones con un menor grado de variabilidad conocidas como **región variable 1 (VR1)** localizadas desde la posición 16366 hasta la 72 y **región variable 2 (VR2)** que esta comprendida entre las posiciones 341-576.

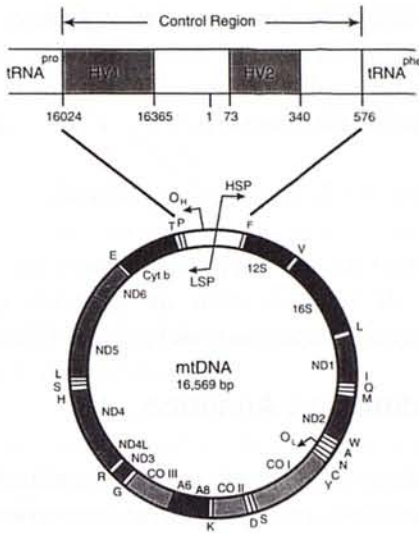
### Características del ADNmt

El ADNmt tiene una serie de características que suponen una gran ventaja y que hacen de él una fuente de información importante en multitud de áreas de estudio. Estas características son las siguientes:  
Herencia materna:

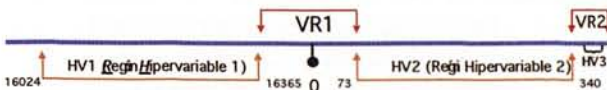
La secuencia de una determinada molécula de ADNmt es llamada haplotipo, ya que el genoma mitocondrial es haploide, esto es debido a que en humanos, la herencia es estrictamente uniparental materna. Esto quiere decir, que salvo mutación, el ADNmt de hermanos, de hijos y madre y en general de aquellos individuos relacionados por vía materna es idéntico. La explicación a la herencia materna es que las mitocondrias de los espermatozoides no contribuyen en la fertilización debido en primer lugar a que en sus cabezas hay solo unas pocas copias de ADNmt en comparación con los varios miles de copias de ADNmt del óvulo, pero además parece haber un mecanismo de reconocimiento específico que elimina las pocas mitocondrias paternas que pudieran introducirse en el óvulo.



Esquema del ADNmt humano



Mapa del genoma mitocondrial humano y ampliación de la región control  
(Holland et al. Forensic Science Review. Vol 11 N. 1)



REGIONES VARIABLES	Nº de Pares de Bases
Región Control (16024-576)	□ 1122 pb
HV1 (16024-16365)	□ 342 pb
HV2 (73-340)	□ 267 pb
HV3 (44860)	□ 121 pb
VR1 (16365-73)	□ 267 pb
VR2 (34576)	□ 236 pb

Localización de regiones hipervariables, variables y número de pares de bases que las forman.

Por lo tanto y como consecuencia de lo anterior el ADNmt no está sometido a procesos de recombinación.

**Alto número de copias:**

Aunque el ADNmt contiene mucha menos información que el ADN nuclear, en cambio, tiene muchas más copias por célula. Por término medio se estima que hay de 10-100 mitocondrias por célula y de 10-100 copias de ADNmt por mitocondria, lo que supone de 100-10000 copias de ADNmt por célula.

**Alta tasa de Mutación y Heteroplasmia:**

El ADNmt tiene una tasa de mutación de 5-10 veces

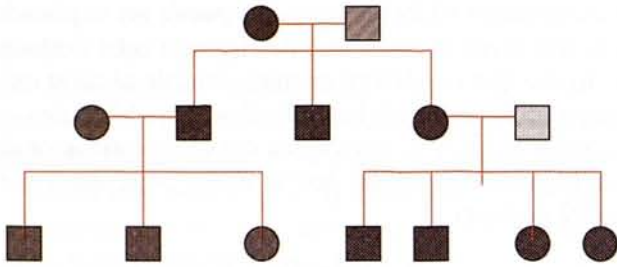
mayor que el ADN nuclear, esto puede ser explicado por una serie de factores entre los que cabe destacar el hecho que el ADNmt es muy sensible al daño oxidativo producido por los radicales libres liberados en la zona, además de que carece del efecto protector de las histonas (proteínas que si están presentes en el ADN nuclear).

Por último, la baja fidelidad de la polimerasa del ADNmt y la aparente carencia de mecanismos de reparación colaboran con la alta tasa mutacional implicando una alta hipervariabilidad entre la población humana.

Se ha estimado que entre 2 individuos caucásicos no relacionados por vía materna, hay una media de 8 diferencias en la secuencia de su ADNmt. Aún no está clara cuál es la tasa de mutación en el ADNmt (algunos autores hablan de 1/33 generaciones) pero a pesar de la herencia materna y de la ausencia de recombinación, lo cierto es que las mutaciones posibilitan que podamos encontrar una o más diferencias en la secuencia de ADNmt en la rama materna de una familia. Pero además si tenemos en cuenta que un individuo está formado por millones de células y que cada una de ellas puede contener miles de copias de ADNmt, en algunas ocasiones, un determinado individuo y por efecto de las mutaciones, puede presentar más de un tipo de ADNmt. Este fenómeno es conocido como **Heteroplasmia** (para diferenciarlo del estado normal de Homoplasmia o de misma secuencia de ADNmt), esta coexistencia de dos o más poblaciones de ADNmt pueden ocurrir en una sola mitocondria, célula o individuo.

La heteroplasmia se puede dividir en **heteroplasmia de secuencia**: ocurre cuando en una posición determinada de la secuencia del ADNmt hay más de una base, por ejemplo la existencia de C/T y **heteroplasmia de longitud** que se manifiesta como la variación en el número de bases existentes en un fragmento homopolimérico, por ejemplo es característica la variación en el número de C's en el fragmento de poliC en HV2. Así, en un mismo individuo, pueden coexistir poblaciones de ADNmt las cuales difieren en el número de citosinas dentro de esos fragmentos.

Cuando una célula heteroplasmica se divide, la transmisión de las mitocondrias a las células hijas se realiza al azar, resultando que la proporción de ADNmt mutante y normal, tras varios ciclos de división, puede derivar hacia el mutante o el normal en un proceso conocido como Segregación Replicativa. Esto hace que los niveles de heteroplasmia no siempre sean los mismos en los diferentes tejidos de un individuo.



Representa la herencia materna del ADNmt. Considerando la figura cuadrada como un varón y la redonda como una mujer, se observa como una abuela trasmite su ADNmt a sus hijos (hermanos que tendrán idéntico ADNmt) y la hija de esta a su vez a sus hijos

### Aplicaciones del ADNmt

#### Identificación humana:

A pesar de la mayor información que puede aportar el estudio del ADN nuclear, en ocasiones su estudio es imposible cuando la muestra de la que se dispone es insuficiente o tiene excesiva degradación. Es en estos casos cuando el ADNmt puede desplegar todo su potencial. Por tanto las muestras más idóneas para aplicar el análisis por ADNmt son aquellas que están en cantidad mínima y/o degradadas, destacando:

- Pelos sin bulbo: un vestigio bastante común en pericia forense y que de hecho es posible obtener resultados a partir de una muestra tan pequeña como 1-2 cm de pelo carente de raíz.
- Muestras muy degradadas como por ejemplo restos óseos antiguos. La estructura circular de la molécula de ADNmt hace que sea menos susceptible a la degradación por exonucleasas.
- Análisis de restos de personas desaparecidas. Donde familiares relacionados por vía materna (incluso ascendientes o descendientes separados por alguna generación) pueden suministrar muestras de referencia que puedan compararse y verificar la identidad de los restos analizados.

En este sentido el Programa FÉNIX de identificación de personas desaparecidas viene desarrollando esta labor desde 1998 y ha sido fruto de la colaboración entre el Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Granada (España) y el Departamento de Análisis de la Dirección General de la Guardia Civil (España).

#### Estudios poblacionales y de diversidad humana:

Muchas de las características que sirven de base en

identificación humana, pueden aplicarse aquí también. La región control del ADNmt es usada para estudios de evolución humana, origen de poblaciones, estudios filogenéticos.

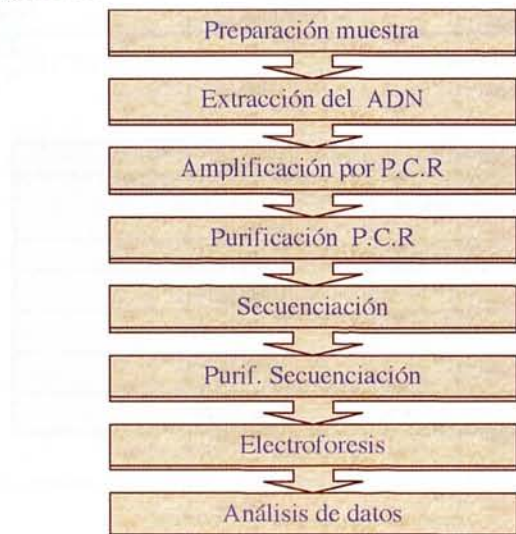
#### Identificación de especies no humanas:

El análisis de ADNmt puede también ser usado para análisis de identificación de especies estudiando zonas como el extremo 5' del gen del Citocromo b.

### Procedimiento Analítico

El análisis de ADNmt, es de los análisis forenses, el más costoso, no-solo a nivel económico sino de tiempo y esfuerzo, ya que por un lado se aplican multitud de técnicas de biología molecular para obtener un resultado y porque las muestras suelen ser degradadas y/o mínimas, requiriendo muchas reacciones y procedimientos de control.

El esquema básico del proceso analítico sería el siguiente:



Esquema resumen del procedimiento analítico en ADNmt

### Preparación de la muestra

En muestras como hueso y diente es necesario una etapa de limpieza previa. Este proceso se realiza lijando la superficie externa de estas muestras con objeto de eliminar los restos que están adheridos a la superficie. Esto se puede conseguir mediante un procedimiento manual con una lima o con alguna herramienta como la Dremel. Posteriormente y una vez limpiada la muestra se procede a tomar una porción para pulverizarla, este proceso puede realizarse como se ha descrito e incluso con equipos más sofisticados como el Freezer Mill (que utiliza Nitrógeno líquido).



Puede ser de utilidad una cabina de extracción de hueso que consta de los siguientes elementos:

- Urna de metacrilato con tapa extraíble y orificios laterales
- Dremel o similar para cortar, lijar e incluso pulverizar
- Aspirador conectado a urna para recoger los restos generados en la limpieza.

Esta cabina por un lado evita la obstrucción de los filtros de las cabinas de flujo laminar empleadas en la preparación de muestras como huesos, etc. con el posible peligro de contaminación, sino que además facilita la tarea de limpieza de todo el equipamiento ya que se reduce el espacio donde se manipula la muestra.

## Extracción del ADN

Hay distintos métodos de extracción en función del TIPO DE MUESTRA (sangre, pelos, saliva, semen, etc...), ESTADO DE LA MUESTRA (en buen estado ó degradada) y la CANTIDAD DE MUESTRA (indicios mínimos, o cantidad suficiente). Tiene como objetivo, liberar el ADN del interior del núcleo de la célula. Sirva como ejemplo el proceso de extracción de ADN a partir de hueso.

## Amplificación del ADNmT

Las bases teóricas de la reacción de PCR son simples. En la reacción intervienen tres segmentos de ADN: el segmento de doble cadena que queremos amplificar, y dos pequeños fragmentos de cadena sencilla, los oligonucleótidos (primers u oligos), que tienen la misma secuencia que los extremos flanqueantes del ADN molde.

Además, participan en la reacción el enzima Taq polimerasa (Taq), deoxinucleótidos-trifosfato (dNTPs), sales, y un tampón.

Los oligos se añaden a la reacción en exceso con respecto al ADN que desea amplificarse. Los oligos hibridarán con las regiones complementarias del ADN, quedando orientados con sus extremos 3' enfrentados, de modo que la síntesis mediante la ADN polimerasa (que cataliza el crecimiento de nuevas cadenas 5'® 3') se extiende a lo largo del segmento de ADN que queda entre ellas.

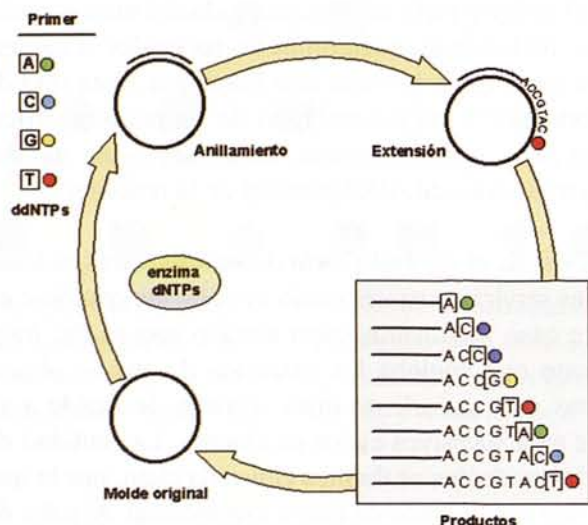
El **primer ciclo** de síntesis producirá nuevas cadenas, de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridar con los oligos. Este tipo de productos se irá acumulando de forma geométrica, con cada ciclo de síntesis, utilizando como moldes las moléculas de ADN parental de la reacción.

Durante el **segundo ciclo** de síntesis, estas cadenas hijas servirán a su vez como moldes, generándose en este caso fragmentos cuyo tamaño será el del fragmento que engloba los extremos de ambos oligos. Estas nuevas cadenas hijas servirán de molde a su vez para sucesivos ciclos de síntesis. La cantidad de estos productos se duplica con cada ciclo, por lo que se van acumulando de forma exponencial. Al cabo de 30 ciclos, habrán aparecido 270 millones de estas moléculas, por cada una de ADN original que hubiese.

El primer paso necesario en este proceso de la síntesis es la desnaturalización del ADN. Puesto que el molde es una molécula de ADN de doble cadena, será necesaria la separación de estas para que los oligos puedan acceder a sus secuencias complementarias y unirse a ellas en el siguiente paso, llamado de alineamiento ("annealing"). Una vez que los oligos se han unido a las cadenas, sirven como cebadores para la acción de la ADN polimerasa, la cual comienza a crear a partir de ellos nuevas cadenas de ADN complementarias, en el proceso de elongación. Estos tres pasos consecutivos (desnaturalización, alineamiento y elongación) constituyen un ciclo de síntesis.

Para las reacciones de PCR de secuenciación se ha diseñado una Taq polimerasa específica, Taq FS (fluorescente sequencing), a partir de la Taq polimerasa de *Thermus aquaticus* y modificada genéticamente de forma que posee muy baja actividad exonucleasa 5'→3' con lo que los resultados son más limpios con menos ruido de fondo y apenas falsas terminaciones. Además este enzima incorpora los ddNTPs marcados fluorescentemente más eficientemente, con lo cual son necesarios menos ddNTPs-fluorescentes y menos ADN molde para conseguir la misma señal. En los últimos años, también se ha avanzado notablemente en la obtención de sondas fluorescentes cuyos espectros de emisión de fluorescencia presentan un mínimo solapamiento.

Como se ha indicado anteriormente, son las regiones hipervariables (HV1 y HV2), dentro de la región control, las zonas de especial interés con fines de identificación humana.



Son varias las estrategias que se siguen para realizar la amplificación por PCR de estas zonas estando en función de dos variables:

- Tipo de muestra
- Estado de degradación

Cuando las muestras son frescas y están en buenas condiciones es posible realizar una amplificación de la región control completa (1122 pb), para ello basta con utilizar los primers adecuados. No obstante si la muestra esta degradada o se sospecha la escasa cantidad de ADN que pueda contener se van reduciendo los fragmentos a amplificar llegando, en los casos más extremos, a ir amplificando regiones de unos 100 pares de bases. Hay un hecho que llama poderosamente la atención y es la cantidad de parejas de primers que se utilizan hoy en día para la amplificar por PCR y como no hay aún unanimidad en la nomenclatura que se sigue para nombrarlos. Algunos autores los nombran como F o R (en función de que amplifiquen o secuencien en dirección Forward o Reverse) otros en cambio utilizan una nomenclatura que alude a la cadena donde hibridan, así se denominan L o H (de Light o Heavy).

Otra diferencia radica en nombrar la base (siguiendo la secuencia de Anderson) donde terminan o empiezan a hibridar los primers es decir en función de su extremo 3' o 5'. En cualquier caso de estas nomenclaturas no se puede deducir la secuencia de los primers.

### Purificación del producto de PCR

Tiene por objeto eliminar los dNTPs y primers que

no se han utilizado en la reacción de PCR y que podrían interferir en la reacción de secuenciación. Hay distintos métodos para realizar esta operación, pero uno de los más empleados es el que usa los filtros Microcon 100.

### Secuenciación del ADNmt

Tiene por objeto determinar el orden de nucleótidos que componen el fragmento de ADNmt a estudiar. Hay varios métodos para secuenciar, pero el más extendido es el método que emplea los dideoxynucleótidos como terminadores de cadena, también llamado método de Sanger, que es utilizado para la secuenciación cíclica del ADNmt.

La clave en este método esta en la utilización de nucleótidos modificados llamados dideoxynucleótidos (ddNTPs). Estos son idénticos a los nucleótidos normales o deoxynucleótidos (dNTPs) utilizados durante la síntesis del ADN, exceptuando la falta de un grupo OH en la posición 3' de la molécula de desoxirribosa.

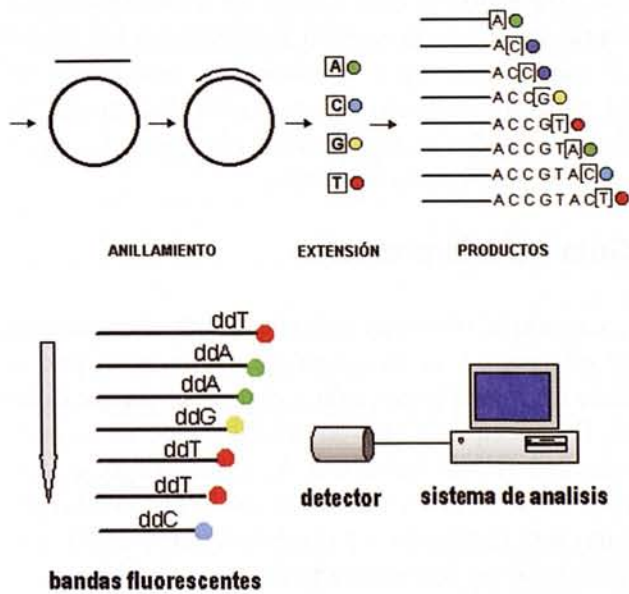
Durante la síntesis del ADN, un dideoxynucleótido puede ser añadido a la cadena de ADN en crecimiento, pero debido a la falta del grupo OH, el siguiente nucleótido no podrá incorporarse. Por esta razón a los dideoxynucleótidos se les llama también terminadores.

La secuenciación cíclica es el nombre dado al proceso que utiliza sucesivos ciclos de desnaturalización, hibridación de primer, y polimerización para formar grandes cantidades de producto en una única reacción de secuenciación. Este proceso de amplificación (similar a una PCR), utiliza un único primer, incrementándose linealmente el producto de ADN con el número de ciclos. (Se distingue de una reacción de PCR en que esta utiliza dos primers, de manera que la cantidad de producto se incrementa exponencialmente con el número de ciclos).

Los ddNTPs pueden ser marcados fluorescentemente y mezclarse con nucleótidos normales, un primer, y el ADN. Durante la reacción los ddNTPs compiten con los dNTPs por las posiciones en el ADN, resultando un conjunto de fragmentos que difieren en una única base en longitud. Al final de cada cadena o fragmento hay una molécula marcada fluorescentemente con un color que depende de la base que haya en esa posición terminal.



Esquema de un nucleótido normal (izda.) y de un dideoxynucleótido o terminador (dcha.)



Secuenciación cíclica. Automated DNA sequencing PE Applied Biosystems.

Los colores son utilizados en este caso como método para determinar la secuencia ya que el producto de secuenciación puede ser incorporado a equipos automatizados que por un lado separan los fragmentos por tamaño y por otro lado son capaces de detectar la fluorescencia que emiten los fluorocromos cuando son excitados por un láser.

Algo que hemos aprendido con la secuenciación del genoma humano es que el ADN está compuesto por pequeñas pero importantes variaciones genéticas. Los humanos son un 99.9% idénticos, es decir, cualquiera de los dos cromosomas diferirán en una proporción de aproximadamente una entre 1250 letras del código genético.

La mayoría de nosotros no somos gemelos idénticos y no somos clones unos de otros. Así que ¿cómo explicar las diferencias?, ¿Porqué algunos tienen cáncer o diabetes y otros no?. El ambiente y el estilo de vida ciertamente juegan un papel importante. Para contestar todas estas preguntas son de vital importan-

cia las variaciones genéticas. La mayor parte de estas variaciones son los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) y ocurre uno cada 100 ó 300 bases. Un aspecto clave de la identificación en genética es la asociación de las variaciones de las secuencias con fenotipos hereditarios. Es de esperar que los SNPs aceleran la identificación forense de personas y la identificación de enfermedades genéticas si conseguimos asociar la enfermedad con diferentes SNPs en la población. Así pues, el destacado progreso de las tecnologías de los SNPs, impactarán profundamente en la ciencia forense gracias a la gran disponibilidad de SNPs y polimorfismos de inserción/delección (DIPs).

Los SNPs son una valiosa herramienta para la localización e identificación de genes que producen enfermedades, la comprensión de mecanismos moleculares de las mutaciones y la deducción del origen de las poblaciones humanas modernas.

Los métodos para estudiar los SNPs pueden dividirse en tres clases:

- 1- Métodos tales como SSCP ó HPLC, que se basan en las propiedades físico-químicas de los alelos.
- 2- Métodos tales como TAQMAN que se basan en la hibridación, amplificación y unión a sondas específicas de un alelo.
- 3- Métodos basados en la extensión ó minisequenciación de alelos específicos desde el primer adyacente hasta el SNP, este es el llamado método del SnaPshot.

### Purificación del producto de secuenciación

Tiene como objeto, eliminar los terminadores no incorporados y que de no eliminarlos convenientemente podrían enmascarar la secuencia de ADN obtenida complicando así la interpretación de los resultados.

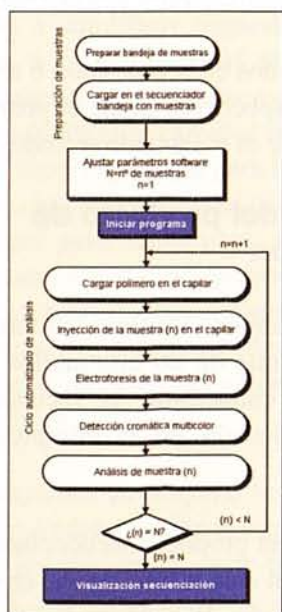
Purificación del producto secuenciado mediante la precipitación con etanol (método de elección cuando se usa el kit de Big Dye V.3.0 de Applied Biosystems).

Hay que tener en cuenta que durante la fase de precipitación los ddNTPs se encuentran en el etanol. Por lo que hay que eliminar todo el etanol sin evaporarlo. El etanol absoluto ha de ser de calidad y recién abierto.

Antes de colocar las muestras en el equipo que las analizará (como ejemplo ABI PRISM 310) hay que prepararlas convenientemente, hidratando la muestra con TSR (Template Suppression Reagent).

### Electroforesis

La electroforesis capilar es una técnica relativamente novedosa en el campo de la Genética Forense pero que está poco a poco sustituyendo a los sistemas de electroforesis vertical. En este caso el proceso electroforético es llevado a cabo en un capilar de sílica de unas 50 mm de diámetro, lo cual hace que la cantidad de calor generado sea menor y que puedan aplicarse voltajes mayores. Para que puedan ser analizados por electroforesis capilar los primers o los dideoxinucleótidos (en el caso de la secuenciación) deben ser marcados fluorescentemente con unas moléculas denominadas fluorocromos que emiten fluorescencia a una determinada longitud de onda cuando son excitados por láser. El equipo en el que se realiza el proceso lleva acoplado un ordenador encargado de traducir los datos de emisiones fluorescentes en secuencias o fragmentos con sus correspondientes alelos asignados. A continuación se muestra de modo esquemático el proceso de análisis mediante electroforesis capilar (en un equipo ABI PRISM 310) tras la reacción de secuenciación.



### Análisis de los resultados

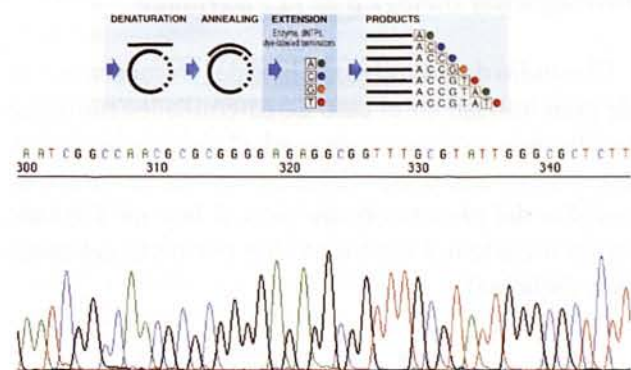
Una vez analizadas las muestras en el equipo, es necesario ver los resultados obtenidos bajo el software Séquense Navigator (p.ej.) que nos va a permitir

no solo editar la secuencia (en algunas posiciones el ordenador interpreta mal o no sabe como interpretar) sino también comparar nuestra secuencia con la secuencia de referencia (secuencia de Anderson) para mostrar las diferencias existentes.

Por tanto finalizada la fase de lectura, antes de ser analizados, a los datos se les aplica un filtro matemático que corrige cualquier solapamiento de los espectros de emisión ya que, aunque los terminadores presentan máximos de emisión a diferentes longitudes de onda, los espectros se solapan en cierta medida. El software utilizado procesa automáticamente los datos recogidos en una secuencia de bases, los analiza y los visualiza en el monitor.

### Guía de interpretación

Cuando se observan diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia de una muestra, solo se tiene en cuenta la posición y el nucleótido que difiere. Por ejemplo Anderson describió que en la posición 263 (HV2) había una A, sin embargo, es frecuente que haya un cambio de esa A por una G, por tanto será nombrada esa diferencia como 263G. Las diferencias no son solo cambios de nucleótidos, también hay inserciones (se denominan colocando la posición seguida de un punto y de un número que alude a las inserciones producidas, ejemplo 309.1C (una inserción de ese nucleótido en la posición 309), 309.2C (si son 2 las citosinas) y así sucesivamente) también hay deleciones (se denominan colocando la posición seguida de una "d", ejemplo 16240d). Cuando en una determinada posición no se sabe que nucleótido es el que la ocupa se coloca una "N", ejemplo 16345N. En otras ocasiones y debido a las heteroplasmias de secuencia se puede observar que en una determinada posición hay una mezcla de 2 nucleótidos y en estos casos se debe de seguir el código IUPAC, por ejemplo una mezcla de A/G se denomina como R, ejemplo 16110R. También podría ocurrir que no hubiese ninguna diferencia con respecto a la secuencia de referencia. Cuando se comparan dos muestras como por ejemplo una muestra de referencia y un indicio o se comparan dos individuos, se observarán los resultados finales obtenidos y si hay 2 o más nucleótidos de diferencia se concluye que la muestra de referencia y el indicio son diferentes o que no hay relación por vía materna entre dos individuos analizados. No obstante, cuando no hay diferencias en la secuencia entre muestras se puede decir que no se pueden excluir la relación existente entre ambas.



Hoy en día se están generando bases de datos de ADNmt que poseen datos relativos a las secuencias analizadas (concretamente a las diferencias encontradas entre cada muestra con la secuencia de referencia), y se están haciendo grandes esfuerzos para que engloben el mayor número posible de secuencias y así poder realizar un abordaje estadístico que permitan establecer el cálculo de las frecuencias que unas determinadas secuencias tienen en la población.

## Cromosoma Y

De los 23 pares de cromosomas que componen el genoma humano, 22 son los denominados autosomas y el par 23 constituye los que se denominan cromosomas sexuales. En la especie humana los cromosomas responsables del sexo son 2: el cromosoma X y el cromosoma Y (ver fotografía), de manera que el sexo femenino viene representado por dos cromosomas X (XX) y el masculino por un cromosoma X y otro Y (XY).

Esto se debe a que tras la fecundación la mitad del ADN del cigoto procede del óvulo materno (que porta un cromosoma X) y la otra mitad del procede del ADN del espermatozoide (que puede portar un cromosoma X o un cromosoma Y), por lo tanto, es el espermatozoide el que determina el sexo del futuro individuo.

El cromosoma Y representa solamente el 2% del genoma humano, es uno de los cromosomas más pequeños, con un tamaño aproximado de 60 Mb.

El 95% del cromosoma Y no recombina (no intercambia material genético) con el cromosoma X, por lo que se transmite de manera intacta de padre a hijo. Esta característica hace que a través del cromosoma Y puedan estudiarse linajes paternos.

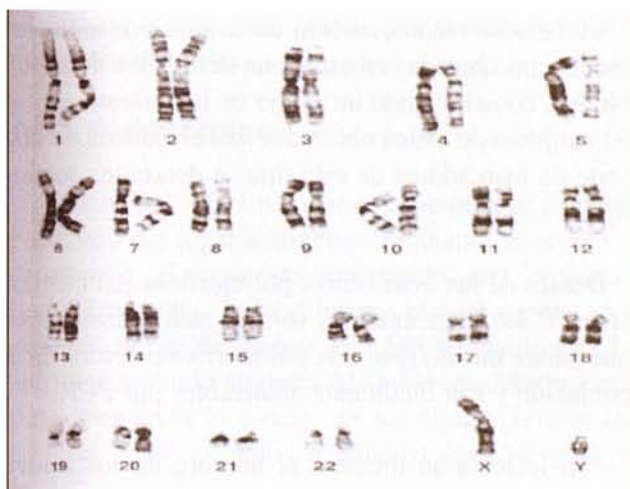


Foto 1. Cariotipo humano normal de varón

El cromosoma Y posee funciones biológicas importantes relacionadas básicamente con la determinación testicular y la fertilidad masculina.

Aunque la mayor parte de este cromosoma está constituido por ADN que no se expresa (ADN no codificante), existen unos cuantos genes de importancia funcional.

Dentro del cromosoma Y podemos diferenciar tres regiones:

- Dos regiones pseudoautosómicas, que se denominan así porque en estas regiones del cromosoma Y se produce durante la meiosis un intercambio de material genético con el cromosoma X, por lo que la herencia de estas regiones es idéntica a la del resto de cromosomas denominados autosomas.
- Una región específica del cromosoma Y y que se denomina región no recombinante. Esta región no intercambia material genético con el cromosoma Y, por lo tanto se transmite íntegra de padre a hijo.

### Polimorfismos del Cromosoma Y: Microsatélites

Al igual que en los autosomas, los microsatélites del cromosoma Y son secuencias constituidas por la repetición en tándem un determinado número de veces de una secuencia consenso o unidad.

Por tanto, el polimorfismo o variación entre individuos depende del número de repeticiones. La única diferencia es que en este caso sólo tendríamos una copia o alelo de cada marcador ya que, como hemos dicho antes son marcadores que se encuentran en la región no recombinante que es específica del cromosoma Y, del cual sólo hay una copia por individuo.

La falta de recombinación determina que todas las secuencias ubicadas en esta zona se hereden como un bloque, constituyendo un grupo de ligamiento. Al conjunto de alelos obtenidos tras el análisis de una serie de marcadores de este tipo se denomina haplotipo.

Dentro de los marcadores polimorficos del cromosoma Y, los microsatélites son los más utilizados ya que tienen un alto grado de polimorfismo dentro de la población y son fácilmente analizables por PCR.

En la tabla se muestra el nombre de los nueve microsatélites más utilizados en Genética Forense y sus secuencias consenso o unidad.

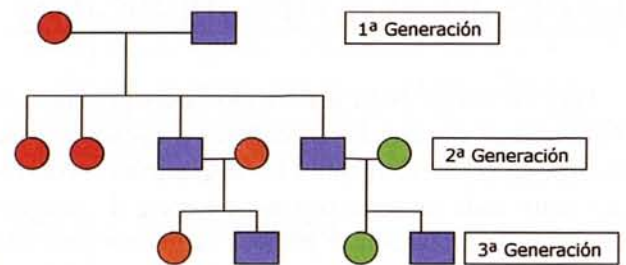
Gracias al gran avance sufrido en las técnicas de análisis genético en los últimos años, el estudio del cromosoma Y ha revelado una gran cantidad de polimorfismos de gran utilidad en:

Marcadores	Secuencia unidad
<u>DYS385</u>	GAAA
DYS388	ATT
DYS389 I	(TCTG) (TCTA)
DYS389 II	(TCTG) (TCTA)
DYS390	(TCTA) (TCTG)
DYS391	TCTA
DYS392	TAT
DYS393	AGAT
<u>YCAIII</u>	CA

- El estudio del origen y evolución de las poblaciones
- Estudios de paternidad
- Aplicaciones forenses, tanto en la resolución de casos de criminalística como en casos de identificaciones humanas.

### Investigación Biológica de la Paternidad

El estudio de los microsatélites del cromosoma Y es de gran utilidad en el caso de paternidades rutinarias (en las que se dispone de madre, padre e hijo) pero más aún en casos especiales en los que se carece de muestra del presunto padre pero si hay un hermano varón o cualquier familiar varón por parte del padre (ver esquema).



Explicación esquema: Se representa el tipo de herencia que siguen los marcadores microsatélites utilizados en los estudios de paternidad. Como en todo pedigrí un círculo es representativo de una hembra y un cuadrado de un varón.

Como los marcadores que utilizamos en los estudios de paternidad están en la zona no recombinante del cromosoma Y, éstos se heredan intactos (salvo mutaciones) por vía paterna. Así, según el esquema los hijos varones de la 2ª generación (hermanos entre si) serán idénticos en cuanto a los marcadores analizados, pasará lo mismo con los hijos varones de la 3ª generación (que son primos hermanos de padre) y así sucesivamente. Por lo tanto podremos comparar ADN de cromosoma Y en los siguientes casos:

- Padre-hijo
- Hermano-hermano
- Tío paterno-sobrino
- Primos hermanos paternos
- Abuelo Paterno-nieto

Como vemos, los polimorfismos del cromosoma Y pueden proporcionar información adicional en casos de investigación biológica de paternidad en hijos varones cuando, por fallecimiento del progenitor u otras causas, no estén disponibles datos genéticos relativos al presunto padre, ya que dicha falta puede

suplirse con los datos de familiares varones por línea paterna.

Es muy importante señalar que el estudio de estos polimorfismos debe ser complementario al de marcadores autosómicos, ya que una inclusión de paternidad basada sólo en cromosoma Y no tendría validez, puesto que tampoco de excluirían como presuntos padres a todos los familiares por vía paterna del supuesto padre (un hermano, sobrino, primo, etc.).

Si tienen un mayor grado de validez y fiabilidad estos marcadores en las confirmaciones de exclusión, siempre y cuando se analicen un número suficiente de los mismos.

Otra limitación que plantea al análisis de polimorfismos del cromosoma Y es que su utilidad queda reducida a aquellos casos en los que el hijo sea un varón.

### ***Casos de Identificación Genética***

Otra de las grandes aplicaciones de los STRs del cromosoma Y es la identificación de restos óseos, sobre todo si se trata de restos antiguos de los que no se tienen familiares de generaciones cercanas para comparar (un hijo, hermano, etc.). En estos casos el uso de STRs autosómicos queda muy limitado ya que, conforme aumenta el número de generaciones las posibilidades de establecer relaciones de parentesco entre el ancestro y los descendientes actuales cada vez se complican más, llegando un momento en el que esto se hace imposible. En los casos de Identificación genética de restos óseos podemos encontrarnos una gran variedad de situaciones que deben ser resueltas de maneras diferentes.

La resolución del caso va a depender fundamentalmente de dos parámetros que son la data y el estado de conservación de los restos. Ambos parámetros van estrechamente ligados ya que, si bien es importante la edad o data del resto óseo aún lo son más las condiciones de conservación a las que se haya encontrado sometido. Normalmente las posibilidades de conseguir un ADN de buena calidad y en suficiente cantidad son mayores en restos óseos recientes que en restos antiguos, pero si un resto óseo reciente ha estado sometido a un calor o humedad excesivos puede ser que el ADN esté seriamente dañado y que el análisis del mismo se complique enormemente.

En este sentido, uno de los desafíos actuales de la

Genética Forense, es la identificación de restos óseos de interés histórico.

### **ADN Autosómico**

Dentro del ADN nuclear solamente una pequeña parte va a dar lugar a proteínas fundamentales para el organismo, el resto está constituido por lo que se denomina ADN no codificante el cual supone más del 90% del ADN nuclear. El ADN no codificante ha sido denominado también ADN basura debido a que por ahora no se le asocia función alguna, no obstante, este ADN es una herramienta esencial para la investigación forense.

De los diferentes tipos de secuencias de ADN no codificante que existen son las secuencias repetidas en tándem las más usadas para la identificación genética. Estas secuencias suponen el 5 - 10 % del genoma de los mamíferos y, generalmente, se caracterizan por la presencia de una secuencia común repetida en tándem de manera continua en un fragmento de ADN. Son características de los centrómeros y de los telómeros y parece que son importantes para determinar la estabilidad y la posición correcta de los cromosomas. A continuación se muestra un esquema con los tres principales tipos de secuencias repetidas en tándem:

De los tres tipos de secuencias repetidas en tándem son los minisatélites y, sobre todo, los microsátélites, los que se utilizan en la identificación genética. Esto se debe a que al ser la longitud de la secuencia consenso menor (ver tabla) el análisis es mucho más simple y, además, la probabilidad de que estos fragmentos se encuentren en buenas condiciones es mayor. Esto último es de gran importancia en Genética Forense, sobre todo en el análisis de restos óseos antiguos ya que en la mayoría de los casos han estado sometido a condiciones de humedad y calor, lo cual favorece el crecimiento de bacterias que tienen la facultad de degradar ("romper") el ADN en fragmentos pequeños. Por lo tanto, cuanto menores sean los fragmentos que vamos a analizar menor será la probabilidad de que éstos se encuentren degradados y mayor la probabilidad de poder obtener un resultado positivo.

### **Minisatélites**

Son secuencias de ADN constituidas por una secuencia consenso de 9 a 100 pb repetida en tándem.

Los minisatélites suelen encontrarse cerca de los telómeros, aunque también se han encontrado intercalados en otras posiciones cromosómicas. Estas secuencias de ADN son altamente polimórficas o variables entre los distintos individuos.

La variabilidad entre individuos se basa en el número de veces que se repite una determinada secuencia consenso.

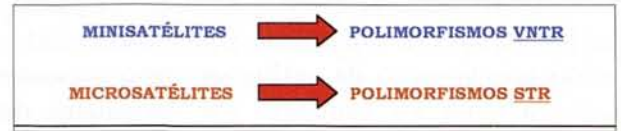
En el caso de las secuencias tipo minisatélite, en las que la longitud de la secuencia consenso puede variar entre 9 y 100 pares de bases, a las variaciones en el número de repeticiones (o polimorfismo) se les denomina abreviadamente VNTR (Variable Number of Tandem Repeat o Número Variable de Repeticiones en Tándem).

### Microsatélites

Los loci microsatélites son los de mayor utilidad hoy en día en el campo de la identificación genética. Son bastante abundantes, cada 6-10 Kb del genoma humano puede encontrarse una secuencia de este tipo. Los STR se distribuyen ampliamente por todo el genoma encontrándose tanto en regiones génicas (codificantes) como extragénicas (no codificantes). Los STR situados en regiones extragénicas o no codificantes son los responsables del gran avance de la Genética Forense

Contienen una secuencia consenso de 1 a 6 pb repetida en tándem. Al igual que los minisatélites son secuencias altamente polimórficas y en este caso a los polimorfismos de estas secuencias se les llama STR (Short Tandem Repeat o repeticiones cortas en tándem).

Las repeticiones de trinucleótidos o tetranucleótidos (3 y 4 pb) poseen un alto grado de polimorfismo, lo cual, junto a su pequeño tamaño, hace que sean muy utilizados como marcadores de identificación genética.



Actualmente los polimorfismos tipo STR son fácilmente analizables gracias a la técnica denominada PCR (Polymerase Chain Reaction o reacción en cadena de la polimerasa). Las ventajas básicas que ofrece la PCR frente a otras técnicas utilizadas con anterioridad son las siguientes:

1. Su capacidad para obtener resultados en casos de muestras mínimas y/o degradadas
2. Genera en poco tiempo un elevado número de copias del fragmento de ADN objeto de estudio. Los marcadores más utilizados actualmente en identificación genética son los microsatélites debido principalmente a su pequeño tamaño y a su elevado grado de polimorfismo.

El análisis de un determinado número de estos marcadores permite obtener un perfil genético prácticamente único para cada individuo y además, establecer relaciones de parentesco ya que los microsatélites siguen un patrón de herencia mendeliano. La complejidad del análisis como la calidad de los resultados en estos casos va a depender de varios factores:

REPETICIONES EN TANDEM			
	Grado de repetición (por locus)	Numero de loci	Longitud de la secuencia consenso
<b>SATELITES</b>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	1-2 por cromosoma	1-varios miles de pares de bases
<b>MINISATELITES</b>	10-10 <sup>3</sup>	Varios miles por cromosoma	9-100 pb
<b>MICROSATELITES</b>	10-10 <sup>2</sup>	>10 <sup>5</sup> por genoma	1-6 pb



- Cantidad de ADN: esto dependerá del número de células nucleadas que contenga la muestra biológica analizada. En el caso de restos óseos, sobre todo si las condiciones de conservación no han sido las adecuadas, la probabilidad de encontrar células con núcleo es bastante pequeña.

- Calidad del ADN: Si el ADN está altamente degradado o contaminado puede llegar a no ser útil para el estudio de identificación o presentar serias dificultades para la obtención de resultados. Esto va a depender, como se apuntó anteriormente, al estado de conservación de los restos.

- Las técnicas utilizadas: en la mayoría de los casos de identificación a partir de restos óseos antiguos el ADN es escaso y se encuentra parcial o totalmente degradado. Por ello es importante disponer de la mejor y más moderna tecnología. Los sistemas actuales de amplificación y posterior detección en equipos de electroforesis capilar, permiten la obtención de resultados a partir de cantidades mínimas de ADN (entre 0.5 y 1 ng) y fragmentos de tamaños entorno a los 200 pares de bases.

El análisis de los loci STR para su aplicación en identificación genética humana se ha simplificado enormemente gracias a la posibilidad de amplificar conjuntamente dos o más loci en una única reacción (multiplex-PCR). Los sistemas de amplificación multiplex ofrecen una serie de ventajas sobre los sistemas individuales:

1. Disminuyen el tiempo de análisis
2. Aumentan el poder de discriminación del sistema
3. La cantidad de ADN que se requiere es menor
4. Disminuyen la cantidad de reactivos con lo que se abarata el coste total del análisis.

Los productos de amplificación pueden ser separados en función de su tamaño mediante una técnica rutinaria en los laboratorios de Genética Forense, la electroforesis. Mediante esta técnica los fragmentos de ADN amplificado migran a través de un soporte, que suele ser de agarosa o de acrilamida, cuando son sometidos a la acción de un campo eléctrico.

Los sistemas convencionales de electroforesis utilizan como soporte geles desnaturalizantes de poliacrilamida y la detección de los fragmentos separados se hace de manera manual mediante tinción de los geles

con nitrato de plata. La electroforesis capilar (normalmente representada por su acrónimo en inglés, CE) es un método alternativo para la separación de fragmentos y obtención de secuencias de ADN que suple, en parte, los inconvenientes de los sistemas convencionales. En este caso el soporte o medio de separación es un polímero incluido en un capilar de sílica de unos 50mm y de longitud variable lo cual hace que la cantidad de calor generado sea menor y que puedan aplicarse voltajes mayores. La gran ventaja en cuanto a rapidez de la técnica se debe a que la preparación del gel y la carga de muestras se hacen de manera automática. Por otro lado se consigue una mayor sensibilidad, al poderse obtener resultados interpretables en los casos en los que el número de copias obtenidas por PCR es bastante bajo, y aumenta la capacidad para diferenciar alelos que se distinguen en un par de bases.

Además, los resultados obtenidos son analizados por un software evitándose así problemas de interpretación y permitiendo que éstos queden almacenados para posibles futuros análisis.

## Los restos de la catedral de Sevilla son de Cristobal Colón

Los estudios desarrollados por el equipo de antropólogos dirigido por el Prof. Miguel Botella de la Universidad de Granada, y los estudios genéticos - que quien escribe tiene el honor de coordinar- y en los que han intervenido profesionales de la Universidad de Santiago de Compostela (Prof. Angel Cariacedo), Universidad de Barcelona (Prof. Daniel Turbón), Universidad Tor Vergara de Roma (Prof. Olga Rickards) y de Instituto Max Planck de Antropología Biológica de Leipzig, Alemania (Prof. Mark Stoneking) han concluido que los huesos que hay en Sevilla son de Cristóbal Colón.

Para ello se ha comparado el ADN mitocondrial de los huesos de Colón que hay en la Catedral de Sevilla con el ADN de los huesos de su hermano Diego, se ha observado que ambos son idénticos (propio de personas con la misma madre).

Teniendo en cuenta que en Sevilla no está el esqueleto completo de una persona, sino el 20 ó el 30% del mismo como mucho, es obvio pensar que el resto tiene que estar en otro lugar.

Por el manejo de los huesos y por nuestra experiencia con los mismos, pensamos que hay un porcentaje que puede haberse "pulverizado" literalmente, debido a la gran degradación de los mismos.

Sin embargo, se sabe que en la República Dominicana tampoco está el esqueleto completo de una persona (estudios del Dr. Goff, de la Universidad de Yale, a mediados de los años cincuenta del siglo pasado), por lo que en mi modesta opinión, es hipótesis más que razonable y probable pensar que aquellos también puedan serlo. Hasta el momento, pese a haberlo intentado por todos los medios desde mayo de 2003, nuestro equipo investigador no ha podido estudiar los restos dominicanos, pese a haber sido autorizado formalmente en dos ocasiones, las mismas que en fechas inmediatamente cercanas a nuestro desplazamiento el mismo fue pospuesto.

Personalmente me gusta decir que “Los huesos de Sevilla son los de Colón”, mejor que decir que “Los huesos de Colón están en Sevilla”, porque siendo ambas frases muy similares, y ambas ciertas, la última parece más radical y puede entenderse como una negación de la posibilidad de que los huesos de Santo Domingo sean también de Colón. Esperemos que en poco tiempo la ciencia, con los pertinentes permisos, pueda resolver el enigma de los huesos dominicanos.

### Estudios con el cromosoma “Y” en poblaciones mediterráneas y en la población balear. El reto de los SNPs

Con objeto de determinar si existe una relación genética entre las personas que actualmente viven en la zona mediterránea del norte de Italia (con apellido “Colombo”) y en la zona catalano-parlante de España, o sea, Cataluña, Valencia, Baleares e incluso Sur de Francia (personas con apellido “Colom”), que de acuerdo a los datos históricos y lingüísticos, pueden ser cuna de Cristóbal Colón.

Para ello se está analizando el ADN del cromosoma “Y” de un total de 477 personas de las regiones mencionadas, que voluntariamente quisieron donar una muestra de ADN para este estudio. Con ello pretendemos encontrar una posible relación entre el ADN del descubridor y de posibles descendientes de familiares del mismo que habitan en esas zonas que se consideran como cuna del descubridor.

De las Islas Baleares se han tomado un total de 50 muestras, básicamente en Mallorca, a través de la Reial Academia de Medicina de las Illes Balears, por lo que es mi deseo agradecer a su Presidente, el Excmo. Sr. Dr. D, Alfonso Ballesteros la colaboración que desde el primer momento prestó a este proyecto, deseo que debe hacerse extensivo al resto de

esta secular Corporación Académica.

Los resultados se muestran a continuación en las tablas adjuntas. Es muy interesante observar cómo existe un haplotipo, que hemos denominado B-I, que aparece en 25 personas, o sea, un 50% de la población. Ello puede deberse, y sin duda este punto influye, a que las personas que han donado tienen una relación familiar por vía paterna. Pese a que en el proceso de selección se trató de evitar que personas pertenecientes a la misma familia –literalmente, a una misma rama “Colom” conocida- donasen muestra, pues es evidente que su cromosoma Y es idéntico, esto no siempre se consigue. Por ello, es probable que hayan donado muestras primos hermanos o tíos y sobrinos con un mismo origen familiar. Otras veces, a partir de la 3ª generación, hay muchas familias que no se conocen bien (primos segundos, por ejemplo).

DYS 456 | DYS 389 I | DYS 390 | CYS 389 II | DYS 458 | DYS 19 | DYS 385 | DYS 393 | DYS 391 | DYS 439 | DYS 625 | DYS 392 | Y GATA H4 | DYS 437 | DYS 438 | DYS 448

Loci de cromosoma Y estudiados (total 16)

HAPLOTIPOS	N	F	F²
B-I	25	0.5	0.25
B-I mut.	4	0.08	6.4 x10 <sup>-3</sup>
B-I mut <sup>2</sup> .	2	0.04	1.6 x10 <sup>-3</sup>
B-I mut <sup>1</sup> , B-I mut <sup>2</sup> , B-I mut <sup>3</sup> y B-I mut <sup>4</sup>	4x	1	(4.0x10 <sup>-4</sup> )x4
B-II, B-III, B-IV	3x	2	1.6 x10 <sup>-3</sup> x2
Haplotipos únicos	9x	1	(4.0x10 <sup>-4</sup> )x9
Total de individuos	50		
Probabilidad de coincidencia	0.268		ΣF²=0.0404
Diversidad haplotípica	0.7469		(n/n-1)(1-Σp <sup>2</sup> ).
Capacidad de discriminación	38%		Haplotipos/total muestrax100

Datos de los haplotipos en la muestra de Baleares

Es evidente que la variabilidad genética del apellido “Colom” en la muestra estudiada en Baleares no es muy grande (diversidad haplotípica de 0.7469, con una probabilidad de coincidencia de 0.268 y una capacidad de discriminación del 38%), ya que el 50% de las personas comparten un mismo haplotipo, y sólo hay 9 haplotipos únicos, tal y como queda resumido en la anterior tabla y representado, igualmente, en el gráfico.

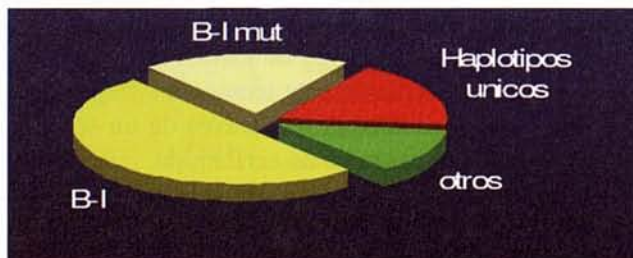


Gráfico de distribución de haplotipos en la muestra de Baleares

## El reto de los SNPs del cromosoma Y

En este momento estamos trabajando en la parte final y probablemente en la parte más apasionante desde el punto de vista científico. Tenemos mucho en nuestras manos, ya que contamos con ADN de Cristóbal Colón, con ADN de su hijo Hernando y con ADN del Príncipe de Viana. Igualmente, tenemos el ADN de 477 personas de apellidos Colom y Colombo.

Pero tenemos, igualmente, una limitación derivada de la falta de desarrollo científico. Con las técnicas actuales es imposible estudiar adecuadamente el ADN del cromosoma Y, si el mismo procede de huesos o de muestras degradadas. Ello se debe a que el cromosoma Y se estudia en la ciencia forense desde hace apenas 10 años, y básicamente con el objetivo de identificar a personas que han cometido delitos contra la libertad sexual, ya que el cromosoma Y se recupera de las muestras de semen sin que haya mezcla con muestras de la víctima, que lamentable y vergonzosamente, es una mujer en más del 95% de los casos.

Hay por lo tanto que desarrollar nuevos marcadores que funcionen adecuadamente con ADN antiguo o degradado, cual es el que procede de huesos con 500 años de antigüedad, y en ello estamos. Nos hemos centrado en el estudio de un panel de 44 polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs), ya que el tamaño final del fragmento a estudiar garantiza mejores resultados –en muestras degradadas– que la mayor parte de los STRs existentes. Estos trabajos los estamos desarrollando en colaboración con expertos del FBI, de la Universidad del Norte de Texas (campus de Fort Worth) y con científicos de la compañía ORCHID-CELLMARK de Texas (EE.UU.), con resultados muy alentadores hasta el momento, y que esperamos que a lo largo de los próximos meses sean capaces de dar una respuesta científicamente sólida al enigma del origen de Colón.

## Bibliografía

1. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980; 77(11):6715-9.

2. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290(5806):457-65.

3. Aquadro CF, Greenberg BD. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*. 1983; 103(2):287-312.

4. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*. 1986; 233(4768):1076-8.

5. Wrischnik LA, Higuchi RG, Stoneking M, Erlich HA, Arnheim N, Wilson AC. Length mutations in human mitochondrial DNA: direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucleic Acids Research*. 1987; 15(2):529-42.

6. Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989; 86(23):9350-4.

7. Di Rienzo A, Wilson AC. Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88(5):1597-601.

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

9. Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, Vigilant L, Erlich HA. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *American Journal of Human Genetics*. 1991; 48(2):370-82.

10. Barinaga M. "African Eve" backers beat a retreat [news; comment]. *Science*. 1992; 255(5045):686-7.

11. Sullivan KM, Hopgood R, Gill P. Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *International Journal of Legal Medicine*. 1992; 105(2):83-6.

12. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *Journal of Forensic Sciences*. 1993; 38(3):542-53.

13. Hagelberg E, Clegg JB. Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 1993; 252(1334):163-70.

14. Kurosaki K, Matsushita T, Ueda S. Individual DNA identification from ancient human remains. *American Journal of Human Genetics*. 1993; 53(3):638-43.

15. Smith BC, Fisher DL, Weedn VW, Warnock GR, Holland MM. A systematic approach to the sampling of dental DNA. *Journal of Forensic Sciences*. 1993; 38(5):1194-209.
16. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P. The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *International Journal of Legal Medicine*. 1993; 106(2):85-90.
17. Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, et al. Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. *Journal of Forensic Sciences*. 1993; 38(1):60-8.
18. Paabo S. Ancient DNA. *Scientific American*, investigación y Ciencia. 1993, 1994. 1993 Nov: 86-92.
19. Hoss M, Paabo S, Vereshchagin NK. Mammoth DNA sequences [letter; comment]. *Nature*. 1994; 370(6488):333.
20. Handt O, Richards M, Trommsdorff M, et al. Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science*. 1994; 264(5166):1775-8.
21. Hagelberg E, Quevedo S, Turbon D, Clegg JB. DNA from ancient Easter Islanders [letter]. *Nature*. 1994; 369(6475):25-6.
22. Torroni A, Lott MT, Cabell MF, Chen YS, Lavergne L, Wallace DC. mtDNA and the origin of Caucasians: identification of ancient Caucasian-specific haplogroups, one of which is prone to a recurrent somatic duplication in the D-loop region. *American Journal of Human Genetics*. 1994; 55(4):760-76.
23. Hagelberg E, Thomas MG, Cook CEJ, Sher AV, Baryshnikov GF, Lister AM. DNA from ancient mammoth bones [letter; comment]. *Nature*. 1994; 370(6488):333-4.
24. Sajantila A, Lahermo P, Anttinen T, et al. Genes and languages in Europe: an analysis of mitochondrial lineages. *Genome Research*. 1995; 5(1):42-52.
25. Boles TC, Snow CC, Stover E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *Journal of Forensic Sciences*. 1995; 40(3):349-55.
26. Kaneda H, Hayashi J, Takahama S, Taya C, Lindahl KF, Yonekawa H. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995; 92(10):4542-6.
27. Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics*. 1995; 141(2):743-53.
28. Holland M, Roby R, Canik J, Weedn V. An Update on the Military's Program of Skeletal Remains Identification Using Mitochondrial DNA Sequence Analysis: Identification of Soldiers Killed During the Vietnam War, Korean War and World War II. In: Promega, ed: *Progress in Forensic Genetics*; 1995.
29. Wilson MR, DiZinno JA, Polansky D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *International Journal of Legal Medicine*. 1995; 108(2):68-74.
30. Sullivan KM, Alliston-Greiner R, Archampong FI, et al. A Single Difference in MtDNA Control Region Sequence Observed Between Hair Shaft and Reference Samples from a Single Donor. In: Promega, ed: *Progress in Forensic Genetics* 5; 1996.
31. Miller KW, Dawson JL, Hagelberg E. A concordance of nucleotide substitutions in the first and second hypervariable segments of the human mtDNA control region. *International Journal of Legal Medicine*. 1996; 109(3):107-13.
32. Handt O, Krings M, Ward RH, Paabo S. The retrieval of ancient human DNA sequences. *American Journal of Human Genetics*. 1996; 59(2):368-76.
33. Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC. Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *American Journal of Human Genetics*. 1996; 59(6):127687.
34. Sorenson MD, Fleischer RC. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(26):15239-43.
35. Jazin EE, Cavellier L, Eriksson I, Orelund L, Gyllensten U. Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996; 93(22):12382-7.
36. Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nature Genetics*. 1996; 12:417-420.
37. Lee SD, Shin CH, Kim KB, Lee YS, Lee JB. Sequence variation of mitochondrial DNA control region in Koreans. *Forensic Science International*. 1997; 87(2):99-116.

38. Wilson MR, Polansky D, Replogle J, DiZinno JA, Budowle B. A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. *Human Genetics*. 1997; 100(2):167-71.
39. Melton T, Ginther C, Sensabaugh G, Soodyall H, Stoneking M. Extent of heterogeneity in mitochondrial DNA of sub-Saharan African populations. *Journal of Forensic Sciences*. 1997; 42(4):582-92.
40. Savolainen P, Rosen B, Holmberg A, Leitner T, Uhlen M, Lundeberg J. Sequence analysis of domestic dog mitochondrial DNA for forensic use. *Journal of Forensic Sciences*. 1997; 42(4):593-600.
41. Wallace DC, Stuard C, Murdock D, Schurr T, Brown MD. Ancient mtDNA sequences in the human nuclear genome: a potential source of errors in identifying pathogenic mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(26):14900-5.
42. Melton T, Wilson M, Batzer M, Stoneking M. Extent of heterogeneity in mitochondrial DNA of European populations. *Journal of Forensic Sciences*. 1997; 42(3):437-46.
43. Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *Journal of Forensic Sciences*. 1997; 42(6):1126-35.
44. Kolman CJ, Bermingham E. Mitochondrial and nuclear DNA diversity in the Choco and Chibcha Amerinds of Panama. *Genetics*. 1997; 147(3):1289-302.
45. Rosenblum BB, Lee LG, Spurgeon SL, et al. New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Research*. 1997; 25(22):4500-4.
46. Butler JM, Levin BC. Forensic applications of mitochondrial DNA. *Trends in Biotechnology*. 1998; 16(4):158-62.
47. Seo Y, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Takahama K, Schneider PM. Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. *Forensic Science International*. 1998; 97(2-3):155-64.
48. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany [published errata appear in *Int J Legal Med* 1998;111(5):286 and 1999;112(2):145-50]. *International Journal of Legal Medicine*. 1998; 111(2):67-77.
49. Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *International Journal of Legal Medicine*. 1998; 111(3):124-32.
50. Pfeiffer H, Steighner R, Fisher R, Mornstad H, Yoon CL, Holland MM. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *International Journal of Legal Medicine*. 1998; 111(6):309-13.
51. Rousselet F, Mangin P. Mitochondrial DNA polymorphisms: a study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework. *International Journal of Legal Medicine*. 1998; 111(6):292-8.
52. Weichhold GM, Bark JE, Korte W, Eisenmenger W, Sullivan KM. DNA analysis in the case of Kaspar Hauser. *International Journal of Legal Medicine*. 1998; 111(6):287-91.
53. Gocke CD, Benko FA, Rogan PK. Transmission of mitochondrial DNA heteroplasmy in normal pedigrees. *Human Genetics*. 1998; 102(2):182-6.
54. Carracedo A, D'Aloja E, Dupuy B, et al. Reproducibility of mtDNA analysis between laboratories: a report of the European DNA Profiling Group (EDNAP). *Forensic Science International*. 1998; 97(2-3):165-70.
55. Saville BJ, Kohli Y, Anderson JB. mtDNA recombination in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998; 95(3):1331-5.
56. Handt O, Meyer S, von Haeseler A. Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nucleic Acids Research*. 1998; 26(1):126-9.
57. Liu VW, Zhang C, Nagley P. Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Research*. 1998; 26(5): 1268-75.
58. Allen M, Engstrom AS, Meyers S, et al. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *Journal of Forensic Sciences*. 1998; 43(3):453-64.
59. Stone AC, Stoneking M. mtDNA analysis of a prehistoric Oneota population: implications for the peopling of the New World. *American Journal of Human Genetics*. 1998; 62(5):1153-70.
60. Schneider PM, Seo Y, Rittner C. Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. *International Journal of Legal Medicine*. 1999; 112(5):315-6.
61. Gabriel M, Huffine E, Ryan J, et al. Improved Strategies for mtDNA Sequence Analysis of Highly Degraded Forensic Remains. In: *Promega*, ed: Tenth International Symposium on Human Identification; 1999.

62. Huhne J, Pfeiffer H, Brinkmann B. Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples. *International Journal of Legal Medicine*. 1999; 112:27-30.
63. Huhne J, Pfeiffer H, Waterkamp K, Brinkmann K. Mitochondrial DNA in human hair shafts--existence of intra-individual differences? *International Journal of Legal Medicine*. 1999; 112(3):172-5.
64. Pfeiffer H, Brinkmann B, Huhne J, et al. Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database: genetic diversity as a function of sample size and microgeography. *International Journal of Legal Medicine*. 1999; 112(5):291-8.
65. Pfeiffer H, Huhne J, Ortmann C, Waterkamp K, Brinkmann B. Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts - success rates and sequence comparisons. *International Journal of Legal Medicine*. 1999; 112(5):287-90.
66. Morley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G. Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *International Journal Of Legal Medicine*. 1999; 112:241-8.
67. Szibor R, Michael M. Correct mitochondrial L-strand sequencing after C-stretches. W. Parson et al. *Int J Legal Med* (1998) 111: 124-132 [letter]. *International Journal of Legal Medicine*. 1999; 112(5):348-9.
68. White SL, Collins VR, Wolfe R, et al. Genetic counseling and prenatal diagnosis for the mitochondrial DNA mutations at nucleotide 8993. *American Journal of Human Genetics*. 1999; 65(2):474-82.
69. Izagirre N, de la Rúa C. An mtDNA analysis in ancient Basque populations: implications for haplogroup V as a marker for a major paleolithic expansion from south-western Europe. *American Journal of Human Genetics*. 1999; 65(1):199-207.
70. Krings M, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, Paabo S. DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the neandertal type specimen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(10):5581-5.
71. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA [letter]. *Nature Genetics*. 1999; 23(2):147.
72. Bandelt HJ, Macaulay V, Richards M. Median networks: speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2000; 16(1):8-28.
73. Cavelier L, Jazin E, Jalonen P, Gyllensten U. MtDNA substitution rate and segregation of heteroplasmy in coding and noncoding regions. *Human Genetics*. 2000; 107(1):45-50.
74. Carracedo A, Bjar W, Lincoln P, et al. DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing [editorial]. *Forensic Science International*. 2000; 110(2):79-85.
75. Brenner CA, Barritt JA, Willadsen S, Cohen J. Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertility and Sterility*. 2000; 74(3):573-8.
76. Dimo-Simonin N, Grange F, Taroni F, Brandt-Casadevall C, Mangin P. Forensic evaluation of mtDNA in a population from south west Switzerland. *International Journal of Legal Medicine*. 2000; 113(2):89-97.
77. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals. *International Journal of Legal Medicine*. 2000; 113(3):155-61.
78. Bär, W., B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, W. Mayr, and B. Olaisen. 1997. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Society for Forensic Haemogenetics*[editorial]. *International Journal Of Legal Medicine*. 110(4):175-6.
79. Bell, G., M. Selby, and W. Rutter. 1982. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*. 295(5844):31-35.
80. Budowle, B., T. Moretti, and M. Keys. 1997. Validation studies of the CTT STR Multiplex Sys Entrala, C., J. A. Lorente, M. Lorente, J. C. Alvarez, B. Budowle, and E. Villanueva. 1999. Spanish population data on the loci D13S317, D7S820, and D16S539 generated using silver staining (SilverSTR III Multiplex). *Journal Of Forensic Sciences*. 44(5):1032-4.
81. Entrala, C., M. Lorente, J. A. Lorente, J. C. Alvarez, T. Moretti, B. Budowle, and E. Villanueva. 1998. Fluorescent multiplex analysis of nine STR loci: Spanish population data. *Forensic Science International*. 98(3):179-83.
82. Entrala, C., M. Lorente, J. A. Lorente, J. C. Alvarez, T. Moretti, B. Budowle, and E. Villanueva. 1998. Fluorescent multiplex analysis of nine STR loci: Spanish population data. *Forensic Science International*. 98(3):179-83.
83. Frégeau, C. J., K. L. Bowen, and R. M. Fourney. 1999. Validation of highly polymorphic fluorescent multiplex short tandem repeat systems using two generations of DNA sequencers. *Journal Of Forensic Sciences*. 44(1):133-66.

84. Hantschel, M., R. Hausmann, T. Lederer, P. Martus, and P. Betz. 1999. Population genetics of nine short tandem repeat (STR) loci-DNA typing using the AmpFISTR Profiler PCR amplification kit. *International Journal of Legal Medicine*. 112:393-395.
85. Kayser M, Sajantila A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. *Forensic Science International* 2001; 118(2-3):116-21.
86. Kayser M, Brauer S, Willuweit S, et al. Online Y-chromosomal short tandem repeat haplotype reference database (YHRD) for U.S. populations. *Journal of Forensic Sciences* 2002; 47(3):513-9.
87. Henke J, Henke L, Chatthopadhyay P, et al. Application of Y-chromosomal STR haplotypes to forensic genetics. *Croatian Medical Journal* 2001; 42(3):292-7.
88. Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, et al. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Science International* 2001; 118(2-3):106-13.
89. Kayser M, Caglia A, Corach D, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *International Journal of Legal Medicine* 1997; 110(3):125-33, 141-9.
90. Kayser M, Krawczak M, Excoffier L, et al. An extensive analysis of Y-chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. *American Journal of Human Genetics* 2001; 68(4):990-1018.
91. Szibor R, Kayser M, Roewer L. Identification of the human Y-chromosomal microsatellite locus DYS19 from degraded DNA. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology: Official Publication of the National Association of Medical Examiners* 2000; 21(3):252-4.
92. Morales J, Monterrosa JC, Alvarez JC, Entrala C, Lorente JA, Lorente M, Villanueva E, Budowle B. El Salvador population data for the D1S80 and D17S5 (YNZ22) loci. *Progress in Forensic Genetics* 8 1999.
93. Pagano S, Alvarez JC, Entrala C, Lorente JA, Lorente M, Budowle B, Villanueva E. Uruguayan population data for eighth STR loci (using the PowerPlex 1.2™ Kit). 2001. *Journal of Forensic Sciences*. 46(1):178.

