
Análisis de ADN Mitocondrial en restos de hijo putativo de Luis XVI, Rey de Francia y María Antonieta

Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette

Els Jehaes, Ronny Decorte, Alain Peneau, Johan H. Petrie, Philippe A. Boiry, Anja Gilisen, Jean Paul Moisan, Herman Van den Berghe, Olivier Pascal y Jean-Jacques Cassiman

Center for Human Genetics, University of Leuven, Belgium
Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHRU, Nantes, France
Petrus Campussingel, Groningen, The Netherlands
Faculté Libre des Sciences de la Communication, Levallois-Perret, France

Resumen

Carl Wilhelm Naundorff fue sepultado en 1845 en Delft como Luis Charles, Duque de Normandía, "Luis XVII". Sin embargo, el hijo de Luis XVI y María Antonieta-Luis XVII- falleció oficialmente en el templo de París en 1795. Con el fin de determinar la identidad de Naundorff, se comparó las secuencias de las ondas del ADN mitocondrial (ADNmt) de sus restos con las secuencias obtenidas a partir del cabello de dos hermanas de María Antonieta, de la misma María Antonieta, y con las secuencias obtenidas de las muestras del ADN de dos parientes maternos vivos. La secuencia del ADNmt de una muestra de hueso de Naundorff mostró dos diferencias en los nucleótidos en cuanto a la secuencia del de las tres hermanas y cuatro diferencias en las secuencias de los parientes maternos vivos basado en esta evidencia resulta muy remoto que Naundorff sea el hijo de María Antonieta.

Palabras claves: Luis XVII, ADN mitocondrial, ADN antiguo, identificación genética

Summary

Carl Wilhelm Naundorff was buried in 1845 in Delft as Louis Charles, Duc de Normandie, "Louis XVII". However, the son of Louis XVI and Marie-Antoinette - Louis XVII- officially died in the Temple of Paris in 1795. In order to resolve the identity of Naundorff, mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop sequences of his remains were compared with the sequences obtained from the hairs of two sisters of Marie-Antoinette, Marie-Antoinette herself, and with the sequences obtained from DNA samples of two living maternal relatives. The mtDNA sequence of a bone sample from Naundorff showed two nucleotide differences from the sequences of the three sisters and four differences from the sequences of living maternal relatives. Based on this evidence it becomes very unlikely that Naundorff is the son of Marie-Antoinette.

Introducción

En junio de 1799, la familia real Francesa (Luis XVI (1752-1793), María Antonieta (1755-1793) y sus hijos María Teresa Carlota (1778-1851) y Luis Carlos (1785-1795?) (Figura 1) trataron de escapar del creciente ambiente hostil parisino. Ellos fueron arrestados en Varennes y encarcelados en el Templo, en París. En 1793, el Rey y la Reina fueron decapitados pero sus hijos permanecieron en el Templo. De acuerdo a registros oficiales Luis Carlos murió de tuberculosis en el Templo el 8 de

junio de 1795. A partir de entonces, la versión oficial sobre su muerte ha sido cuestionada en repetidas ocasiones. Una de las teorías más persistentes presume que quien murió fue un sustituto, mientras que Luis Carlos escapaba de Francia. Al inicio del siglo 19 varios individuos demandaron ser el hijo de Luis XVI. Uno de ellos, Carl Wilhelm Naundorff, pudo dar aparentemente evidencias circunstanciales suficientes para convencer a los ex miembros de Versalles sobre su descendencia.

Figura 1

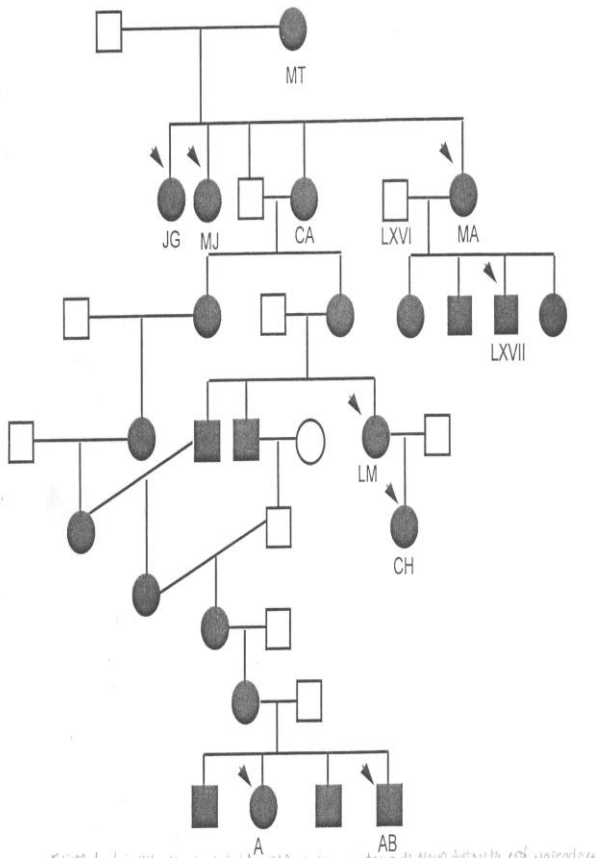


Figura 1: Estirpe de Luis XVI y María Antonieta. El parentesco materno de María Antonieta está marcado en negro. El hijo de la pareja real, Luis Carlos y los parientes maternos analizados en el presente estudio están señalados por las flechas.

Naundorff fue exiliado por las autoridades Francesas. El vivió por varios años en Inglaterra y murió en 1845 en Delft (Holanda) lugar donde fue enterrado bajo el nombre de Luis Carlos Duque de Normandía, "Luis XVII".

En 1863, las autoridades holandesas autorizaron a sus descendientes el uso del nombre "de Bourbon" el nombre de la familia Real Francesa.

Desde entonces, ha existido mucha especulación sobre la verdadera identidad de Naundorff. En algunas publicaciones sobre "el misterio de Delft", él es considerado un estafador y charlatán. Naundorff fue siempre su propio testigo, pero hacían falta pruebas formales de su identidad. Él aparentemente compró su identidad a unos alemanes, cuyos ascendentes no podían ser hallados. Ello llevó finalmente a la apertura del

ataúd de Naundorff en Delft en 1950 para realizar un estudio de los restos esqueléticos. Se removieron una mecha de cabello y el húmero derecho. El húmero se usó para investigar si la muerte de Naundorff se debió a intoxicación con arsénico. Desde 1950, ha sido mantenido en los archivos del Laboratorio Forense Holandés en Rijswijk. Las muestras de cabello de Naundorff fueron almacenados en dos sobres sellados en los archivos del pueblo de Delft. Estos restos nos fueron oficialmente facilitados en 1993 para el análisis del DNA y fueron usados con el fin de determinar la identidad de Naundorff.

La identificación de restos humanos mediante el análisis del DNA ha demostrado ser una herramienta poderosa en las investigaciones forenses e históricas. El análisis del DNA extraído del hueso, ha sido claramente usado exitosamente en el reconocimiento de la familia Romanov y de Josef Mengele. Si bien es cierto que los polimorfismos nucleares proveen la información necesaria para establecer parentescos paternos y maternos, el análisis del DNAm_t, permite determinar si los individuos tienen relación materna.

La mayoría de los polimorfismos del DNAm_t, están concentrados en dos segmentos hipervariables (HVR1y HVR2) en la región de la onda D, la cual es por ende la más apropiada para estudios de identificación.

La comparación de DNAm_t de un fallecido y un solo pariente materno es suficiente para excluir algún parentesco materno. Por otra parte, el DNAm_t está presente en gran número de copias en las células y por ello es más probable que sobreviva el proceso de autólisis luego de la muerte en relación al DNA nuclear. Recientemente se ha demostrado que el análisis del DNAm_t puede practicarse exitosamente en restos humanos de hasta 12000 años de antigüedad e incluso en el esqueleto de un Holandés.

A continuación, presentamos los resultados del análisis del DNA en los restos de Naundorff y de parientes maternos de Luis XVII para establecer la identidad de Naundorff. Con el fin de obtener resultados incuestionables, se llevó a cabo además algunos análisis independientemente por otro laboratorio en Nantes (Francia).

Materiales y métodos

Origen, autenticidad y documentación de las muestras biológicas

El análisis del DNA de Naundorff fue practicado en muestras de cabello y de húmero derecho, ambos tomados del ataúd durante la restauración de su lugar de entierro en Delft en 1950. Las muestras de cabello fueron recibidas en sobres sellados de las manos del archivista de la ciudad de Delft en presencia del Alcalde de la ciudad. Las muestras de húmero (Figura 2a☒), documentadas por un reporte científico y mantenidas en el reservorio original de archivos del Laboratorio Forense de Rijswijk, fueron transferidas a RD por AD Kloosterman y se garantizaba su origen por Fuddenberg (conservador del Instituto). La secuencia del DNAm^t materno de la familia de Luis XVII (Figura 1) se estableció por muestras de cabello de dos hermanas de María Antonieta (MA). La hermana mayor de María Antonieta, María Ana, (1738-1789) pasó los últimos días de su vida en el convento Elisabethinen en Klagenfurt (Austria). Luego de su muerte, fue sepultada en la cripta del Convento. El orden monasterial recibió su legado, el cual incluía un rosario perteneciente a su madre, María Teresa (MT) (1717-1780). Este rosario consistía de varios medallones conteniendo cabello de diferentes hijos de María Teresa (Figura 2b☒).

En marzo de 1995, dos de los medallones se abrieron ante la presencia de varios testigos, incluyendo un Notario público, para que se tomaran las muestras de algunas hebras de cabello de Johana Gabriela (JG) (1750-1762) y María Josefa (MJ) (1751-1767).

Estos cabellos fueron autenticados por el Dr. C. Tooper, archivista del convento de Klagenfurt.

Además, se analizó material biológico de otros descendientes maternos incluyendo parientes vivos de Luis XVII.

Luisa María (LM) (1812-1850), Reina de Bélgica, fue la nieta de Carolina (CA) (1752-1814) otra hija de María Teresa. Algunos sobres que contienen cabello de los miembros de la Familia Real de Bélgica, se mantienen en los archivos del Palacio Real, en Bruselas.

Un sobre con cabello de la Reina Luisa María, tomado luego de su muerte en 1850, estuvo disponible junto a tres sobres que contenían cabellos de su hija Carlota (CH) (1840-1927), Emperatriz de México, tomadas en diferentes eras. Se recibió muestras comparativas de parientes vivos maternos de María Antonieta de parte de la Reina Ana de Rumania (A) (muestras de sangre, tomada y autenticada por un médico) y de su hermano André de Bourbon Parme (AB) muestra de sangre autenticada por PA Boiry). Se incluyó además cabello de la misma María Antonieta en el estudio y fue obtenido de dos fuentes. En primer lugar a partir de medallones mantenidos en una colección privada perteneciente a la marquesa Jane de Bernardières (Cannes). El origen de este cabello pudo ser únicamente establecida por información verbal transmitida de generación en generación, en las familias que poseían los dos medallones.

En segundo lugar, se obtuvo cabello de María Antonieta a partir de un documento que contenía una mecha de cabello arreglada con un hilo de seda. El documento está estampado en varios lugares con tres lilas Francesas de los de Bourbon y contiene los manuscritos de Henri, Príncipe de Bourbon, declarando que si el sello y el hilo están intactos, el cabello sería auténtico. Este objeto estuvo en el legado del Dr. J. Stuyt a la librería de la universidad de Nijmegen (Holanda).

La librería transfirió el documento al museo Comandancia de Saint Jan en Nijmegen.

Todas las transferencias de las muestras biológicas fueron documentadas por escrito y se obtuvo autorización para su uso en estas investigaciones de las personas que tenían el poder legal de las muestras.

Medidas para prevenir contaminación

Desde el inicio de este estudio se realizó un esfuerzo extremo para recobrar muestras de DNA antiguo libres de contaminación por DNA contemporánea. Para minimizar el riesgo de contaminación superficial a partir de la manipulación del hueso, se removió la capa superficial. Solo se utilizaron los segmentos internos del hueso para la extracción del DNA. Se removieron posibles contaminantes externos de las muestras de cabello por medio de un amortiguador lítico, el cual mostró ser altamente eficaz en

eliminar saliva o sangre del cabello, seguido de un procedimiento de lavado en etanol y NA CL 0.9%. Se colocaron todas las extracciones, en un laboratorio bajo equipaje delicado. Todos los restos de la extracción (excepto la solución de fenol y butanol, Triton X-100 y proteinasa K) fueron filtrados a través de un Microcon 100 (Amicon, Beverly, MA); para remover cualquier DNA contaminante se realizó la amplificación en un laboratorio diferente, para que así los productos amplificados no entrasen al laboratorio de extracción. Las mezclas finales de PCR (excepto el DNA objetivo, Taq polimerasa y BSA) fueron filtradas por medio de un Microcon 100 con el fin de evitar contaminación. El análisis de los productos PCR se realizó en un cuadro separado, bajo equipos especiales.

Se cambió de guantes regularmente para prevenir contaminación cruzada de la muestra. Se utilizó tapones de algodón en los extremos de las pipetas exclusivamente para prevenir contaminación sobrante durante la extracción del DNA y pre PCR. Se tomaron controles de extracción negativos y negativos PCR a lo largo de todo el procedimiento, con el fin de detectar contaminación de los reactivos usados.

Cuando los controles negativos resultaron positivos tras el PCR, se rechazó el experimento. Además se determinó la secuencia del experimentador principal (EJ) y se comparó con las secuencias obtenidas del DNA antiguo y se descartaron las secuencias idénticas.

Extracción del DNA

Se extrajo el DNA de hebras de cabello conforme al procedimiento descrito por Higuchi et al excepto para la concentración del extracto de DNA, lo cual se realizó por filtración en un dispositivo Microcon 100. Se incluyó un tratamiento de xylene previo a la lisis con el fin de remover la presencia de "goma" en el cabello tomado de los medallones. Además, la concentración de DTT fue aumentada de 0.039m a 0.13m para disolver la mecha de cabello completamente.

Para la extracción del DNA del hueso, se extirparon del húmero cuatro segmentos internos de aproximadamente 1cm. Las piezas de hueso fueron reducidas a polvo bajo nitrógeno líquido en un molino frigorífico (productos Bel Art,

Pequannock, NJ). La extracción del DNA se basó en su capacidad de fijación al silice como lo describió Höss & Pääbo excepto para la incubación en el amortiguador lítico, lo cual se efectuó durante la noche.

Análisis de la onda D del DNAm

Se realizó la amplificación de dos fragmentos entre-cruzados (entre 242 y 292 bp) para cada una de las dos regiones hipervariables (430 bp) de la curva D no codificante mediante un método PCR descrito por Deecorte et al. y Jehaes et al. Los productos PCR fueron directamente secuenciados de acuerdo a un protocolo de fase sólida con el método dideoxido de desinencia de cadena en el secuenciador DNA automatizado ALF (Farmacia Biotec, Uppsala, Suiza). La mayoría de las secuencias fueron confirmadas por un solo PCR de 45 ciclos usando reservorios HotStart y tubos reactivos (productos biomoleculares, San Diego, CA), como se describió por el fabricante, o usando polimerasa Ampli Tac Gold (Perkin Elmer, Emeryville, CA).

Algunos extractos de DNA antiguo no contenían suficiente DNA para un solo PCR y podía ser únicamente amplificado por dos ciclos de PCR.

Análisis de DNA Y-CROMOSOMAL

La determinación de sexo se hizo por amplificación del gen homólogo X-Y y con un primer par, generando un producto PCR 106 bp y 112 bp respectivamente, a partir del cromosoma X y Y. Las condiciones PCR y el par inicialmente usados, han sido descritos por Sullivan et al. Los productos PCR marcados con fluoresceína fueron analizados con el secuenciador ALF de DNA.

Detección de un polimorfismo de situación HaeIII

El polimorfismo común (T por C transición) en posición 16519 entre HVR 1 y HVR 2, mismo que crea una ubicación HaeIII fue analizado.

Un fragmento de 141 bp entre la posición 16407 y 16547 fue amplificado por un round único PCR de 45 ciclos usando AmpliTaq Gold polimerasa a una temperatura de cocido de 55°C. Los productos PCR fueron digeridos con HaeIII (5 unidades) por la noche a 37°C y analizados con gel agarosa 4%.

Los resultados se confirmaron al secuenciar los productos PCR usando el equipo TermoSequenasa. Los productos PCR fueron diluidos 30 veces y se añadió 2ul de la mezcla particular A,C,G o T proporcionada en el equipo. Las muestras fueron sometidas a 20 ciclos de 30 segundos a 94°C y 30 segundos a 60°C. Se añadieron 6ul de un amortiguador formamide y se analizaron las muestras en el secuenciador ALF de DNA.

Evaluación estadística

La importancia de la similitud del DNAmT de los 2 hijos de la Emperatriz María Teresa y la muestra de cabello de María Antonieta fue evaluada por aproximación Bayesiana.

Nosotros consideramos, R, que la secuencia de DNAmT es de María Antonieta y R' que sea de una persona desconocida.

El radio de probabilidad (LR) se define a continuación: $LR = \frac{P(E|R)}{P(E|R')}$, donde el numerador P(E|R) es la probabilidad de que la muestra de cabello perteneciera a un individuo al azar. El numerador puede ser evaluado de manera análoga a Gill et al –e-gm, donde g= 2 eventos generacionales entre las dos hermanas de María Antonieta, y m= 1/33, el rango estimado de mutación de la secuencia DNAmT de la región de la onda D de acuerdo a Parsons et al. El denominador (P(E|R')) es simplemente el numero de veces que se obtiene una secuencia idéntica en una comparación de base de datos de 100 caucásicos británicos y 119 individuos belgas (resultados no publicados), lo cual resultó en 52 secuencias idénticas en 11900 comparaciones.

Resultados

Análisis de DNAmT en restos de Naundorff

Se obtuvo DNA de Naundorff a partir de muestras de cabello y de humero derecho (Figura 2a), ambos removidos de su ataúd durante la restauración de su lugar de entierro en Delft, en 1950.

La Tabla 1 se resume el número de extracciones de DNA realizadas en Leuven y sus resultados. Los 62 diferentes extractos de las muestras de cabello de Naundorff no arrojaron una secuencia reproducible.

Tabla 1

Resumen de las extracciones de ADN y los resultados frecuenciales

Muestra	Muestra de tejido	Número de extracciones	Número de resultados	Control de extracción positiva	Secuencia de la curva D completa	Secuencia incompleta
Naundorff	cabello	62	14	4	52	12
Naundorff	hueso	13	0	0	11	2
Johanna-Gabriela (JG)	cabello	2	0	0	2	0
María-Josepha (MJ)	cabello	2	0	0	2	0
Marie-Antoinette (MA)	cabello Cannes	5	1	0	2	2
Marie-Antoinette (MA)	cabello Nijmegen	4	0	0	4	0
Louise-Marie (LM)	cabello	23	2	2	10	9
Charlotte (CH)	cabello	36	1	3	26	6

Las secuencias incompletas se debieron a interrupciones prematuras, señales débiles de secuencia, o a la no obtención de producto de amplificación en alguna parte de la onda D.

En total se encontró 17 diferentes secuencias para las 32 diferentes extractos de DNA que pudieron analizarse. Dos piezas de la cabeza del húmero y dos fragmentos de los cóndilos fueron examinados (Figura 2a), representando un total de 13 diferentes extracciones. Se usó 5 diferentes tandas de amortiguador extractor.

De estas 13 extracciones, se obtuvieron 11 secuencias completas de las cuales 9 resultaron idénticas y 2 contaminadas. En estos 2 últimos se visualizó dos secuencias sobrepuestas. Uno de estos fue idéntico a la secuencia encontrada en los otros 9 extractos. La secuencia ósea común presento 3 polimorfismos comparados con la secuencia Anderson (Tabla 2).

Tabla 2

Secuencia obtenida en las diferentes muestras comparadas con la secuencia Anderson

Origen de la muestra	Tejido de muestra	HVR1										Hse III gain	HVR2										
		T16126	G16129	A16130	A16180	T16189	C16223	T16224	A16258	C16260	C16261	C16270	A16288	C16289	A16309	T16311	G16319	T16519C	A71	T166	T162	C194	T195
Naundorff	8 muestras cabeza húmero	*****T*****										-	*****G C										
	1 muestra cabeza húmero	*****Y*****										ND	*****G C										
	1 muestra cóndilo húmero	*****T*****										-	*****G C										
Naundorff (Nantes)	2 muestras cóndilo húmero	*****Y*****										ND	*****G C										
Johanna-Gabriela (JG)	2 muestras cabello	*****T*****										+	*****G C										
María-Josepha (MJ)	1 muestra cabello	*****T*****										+	*****G C										
	1 muestra cabello	*****T*****										+	*****G C										
Marie-Antoinette (MA) (Cannes)	2 muestras cabello	*****T*****										+	*****G C										
	1 muestra cabello	*****? ? ? ? ? ? ? ?										+	? ? ? ? ? ? ? ? G C										
	1 muestra cabello	Y R R Y ***** ? ? ? ? ? ? ? ?										+	G ***** G C										
Marie-Antoinette (MA) (Nijmegen)	1 muestra cabello	*****										ND	***** G D										
	2 muestras cabello	*****Y*Y*Y*****YR										ND	R*Y*Y*Y*Y*Y*G C										
	amortiguador de fisis diferencial	*****C*Y*Y*****CA										ND	G*Y*Y*Y*Y*Y*G C										
	1 muestra cabello	*****Y*****T*Y*Y*Y*										ND	G*A*C*C*Y*Y*G C										
	amortiguador de fisis diferencial	*****T*****T*Y*Y*Y*										ND	G*A*C*C*Y*Y*G C										
Anna (A)	Muestra sangre	*****										-	*****C*Y*Y*G C										
André (AB) (Nantes)	1 muestra cabello	*****										ND	*****C*Y*Y*G C										

Y=C/T, R=A/G, ND= no determinado? = no se pudo determinar la secuencia. HVR1 es aproximadamente de la posición 16030 a 16390; HVR2 es aproximadamente de la posición 60 a 400.

El cabello de Naundorff y su hueso fueron analizados independientemente en Nantes. Se utilizaron las mismas técnicas excepto que no se usó PCR anidada para disminuir el efecto de la contaminación. Se investigaron el cabello de Naundorff de dos fuentes: una tomada en 1950 de su tumba y otra de su cadáver, tomada luego de su muerte en 1845. No se obtuvo ningún resultado de su cabello debido a la escasa cantidad y/o degradación del DNA. Se obtuvo una secuencia completa a partir del hueso la cual fue idéntica a la secuencia común encontrada en Leuven (Tabla 2). Todas las secuencias halladas en el cabello de Naundorff fueron diferentes de las secuencias obtenidas del húmero. La microscopía electrónica (ME) del cabello de Naundorff mostró material amorfo contaminante alrededor de las mechas (Figura 3b) que fue removido por un procedimiento descontaminante de lisis diferencial previo a la extracción del DNA (Figura 3c). Luego de descontaminar, la mecha de cabello aparecía intacta bajo el ME; sin embargo no se pudo obtener ninguna secuencia común. El análisis conjunto de la secuencia común de los extractos óseos y las secuencias obtenidas en dos estudios extensos sobre la variación del DNAMt en poblaciones europeas (Gran Bretaña, Bélgica, P Deconte, 1997 resultados no publicados) reveló que la secuencia del DNAMt de Naundorff eran únicos cuando se consideraban las secuencias de HVR 1 y HVR 2.

Además no se encontró la secuencia en la base de datos de las secuencias de la onda D de 233 Caucásicos Americanos, 90 Caucásicos Africanos, 115 Afro-Caribeños 114 Africanos y 90 Hispanos (M Holanda, 1997 comunicación personal).

Análisis del DNA Y-Cromosomal en los restos de Naundorff

En 10 muestras óseas de DNA, se realizó amplificación positiva para DNAMt, determinación de sexo por coamplificación de la amelogenina homóloga génica X-Y. Cinco extractos de DNA fueron XY positivos, incluyendo cuatro de los nueve extractos de DNA con secuencia de DNAMt idéntica.

Los otros extractos no tuvieron resultados y uno fue femenino, lo cual confirmó la contaminación de este extracto de DNA. Se obtuvo evidencia

adicional para la determinación de masculinidad por análisis de repeticiones Y-cromosomales cortas seguidas unas de otras, proyectando las partes masculino específicas del cromosoma Y humano, en las muestras de DNA de hueso con secuencia de DNAMt similares (información no presentada).

Análisis de DNAMt de cabello de dos tías de Luis XVII

Se usaron dos muestras de cabello de Johana Gabriela (1750-1762) y María Josefa (1751-1767), tías de Luis XVII (Figura 1) para establecer la secuencia de DNAMt materno de la familia.

En los extractos de DNA de 4 muestras de cabello de 2 tías de Luis XVII (Tabla 1), se obtuvieron 3 secuencias idénticas. Esta secuencia (encontrada en dos cabellos de Johana Gabriela y en uno de María Josefa) correspondía a la secuencia Anderson de referencia para HVR1, mientras que para HVR2 se encontró dos diferencias con respecto a la secuencia de referencia (Tabla 2). Se encontró una secuencia distinta en uno de los cabellos de María Josefa, la cual contenía 2 diferencias en nucleótidos en cuanto a la secuencia de referencia para HVR1, mientras que para HVR2 fue idéntica a las otras 3 secuencias (Tabla 2). No se encontró evidencia de contaminación de estas cuatro muestras de cabello. La secuencia común demostró dos polimorfismos en comparación a la secuencia Anderson (Tabla 2) y es una de las secuencias más prevalentes en Europa (3.7%; 100 Británicos y 168 Belgicos). La comparación de las secuencias comunes de las dos tías de Luis XVII con la secuencia del hueso de Naundorff arrojó una diferencia en HVR1, en la posición 1620. La secuencia del hueso fue también diferente de la otra secuencia encontrada en uno de los cabellos de María Josefa.

Análisis de un polimorfismo HaeIII con restricción en posición 16519

La comparación de las secuencias de las ondas D de dos tías de Luis XVII con las de Naundorff, demostró que solo existía una diferencia en nucleótidos (Tabla 2).

Debido a que existen 3 miosis que separan a Luis XVII de las dos tías, una diferencia en nucleótidos es insuficiente para excluir a Naundorff como hijo de María Antonieta. Pudiera argumentarse que

María Antonieta fuera heteroplásmica en posición 16260 (C/T) y que halla transmitido a su hijo Luis XVII una copia con la variante 16260 T. Tanto los extractos del DNA de Naundorff como los de las dos tías de Luis XVII, resultaron negativos en cuanto a evidencias sobre la presencia de 2 núcleos todos en posición 16260 mediante análisis secuencial directo de los productos PCR. Sin embargo, de esta manera se pueden pasar por alto las cantidades bajas de heteroplasmia. Luego de esto, los productos PCR de los 3 extractos de DNA de cabello de las dos tías de Luis XVII que mostraban secuencias de DNAmT idénticas; fueron clonados a un vector pUC 18 mediante un equipo de ligadura (Farmacia Biotec, Uppsala, Suiza), como lo describió el fabricante. Para cada extracto de DNA se separaron y secuenciaron 10 colonias positivas. Ninguna de las 30 colonias mostró una T en posición 16260. Por lo tanto, no pudo encontrarse ninguna muestra sobre la presencia de heteroplasmia en las dos hermanas de María Antonieta.

De manera similar, se clonó los productos PCR de un extracto de DNA óseo de Naundorff con la secuencia común, y se analizaron 16 colonias positivas. Catorce de ellas presentaron una T en posición 16260. Las dos colonias restantes con posición 16260 pudieron resultar ya sea de bajos niveles de heteroplasmia, una secuencia contaminante presente en el extracto óseo, o de errores mediados por Taq polimeras.

Teóricamente, se puede esperar un máximo de dos mutaciones por colonia para el producto PCR clonado de 228 bp, luego de 45 ciclos de amplificación. Una de las dos colonias mostró este índice de error debido a que solo hubo un error, en comparación con la secuencia común del hueso de Naundorff. La otra colonia presentó cuatro errores y, por lo tanto, debe haber provenido de una secuencia contaminante, probablemente omitida por secuenciación directa.

Sin embargo, este experimento de clonaje no pudo ser lo suficientemente conclusivo como para permitir la detección de niveles bajos de heteroplasma en la muestra ósea de Naundorff.

Con el fin de obtener pruebas genéticas adicionales que nos permitieran descartar a Naundorff como hijo de María Antonieta, se analizó un polimorfismo HaeIII con sitio de restricción en

posición 16519 (erróneamente identificado como 16517 por Ballinger et al) a partir del DNA de la muestra ósea de Naundorff y del cabello de las dos tías de Luis XVII. Se sabe que la parte codificante del DNAmT no es muy polimórfica, incluyendo la región entre HVR1 y HVR2.

Sin embargo, el polimorfismo en posición 16519 está presente en la población en gran escala. Un estudio de 88 muestras de DNA de Caucásicos Bélgicos reveló que la mayoría (68%) tenían la transición T por C en posición 16519. La presencia o falta del sitio HaeIII en posición 16519 fue detectada por digestión enzimática y confirmada por secuenciación de los productos PCR obtenidos de los diferentes extractos de DNA. Los extractos de DNA de las dos tías de Luis XVII mostraron la adquisición de un puesto HaeIII de restricción en posición 16519 como resultado de la transición T por C, mientras que la muestra de DNA de hueso de Naundorff no mostró ninguna digestión en esa posición (Tabla 2).

De tal manera, las dos diferencias de los nucleótidos en la región de la curva D (posición 16260 y 16519) encontradas entre la secuencia del húmero de Naundorff y aquellas del cabello de las dos tías de Luis XVII. Respaldan fuertemente la hipótesis de que Naundorff no es Luis XVII.

Análisis de DNAmT de otros familiares maternos de la Emperatriz María Teresa

Con el fin de probar posteriormente que las secuencias obtenidas de las dos tías de Luis XVII eran auténticas, se buscó material biológico de otros descendientes de la Emperatriz María Teresa y de ser posible de descendientes vivos matrilineales. Se obtuvieron muestras de cabello de Luisa María (1812-1850) y de su hija, Carlota (1840-1927) (Figura 1) a partir de sobres que se mantenían en los archivos del Palacio Real de Bruselas. Se recibieron muestras comparativas de parientes maternos vivos de María Antonieta de parte de la reina Ana de Rumania (muestra de sangre) y de su hermano André de Bourbon Parme (muestra de cabello) (Figura 1). Finalmente se puso a disponibilidad cabello supuestamente tomado de María Antonieta por dos fuentes. En primer lugar, se tomó cabello de dos medallones mantenidos en una colección privada (Canes) y en segundo lugar, de un documento mantenido en el

museo de "la comandancia de San Juan". (Nijmegen).

En la tabla 1 se resume el numero de extracciones de DNA realizadas en las muestras de cabello de María Antonieta, Luisa María y Carlota. Solo fueron reproducibles los resultados de las muestras de DNAmT de María Antonieta sorprendentemente, las dos secuencias completas del cabello de la curva D obtenidas del cabello de María Antonieta (Canes) correspondió con las secuencias comunes halladas en el cabello de las dos hermanas (Tabla 2). Una de las dos secuencias incompletas de la curva D confirmó las otras secuencias.

Sin embargo, la otra secuencia incompleta mostró cuatro posiciones ambiguas que fueron útiles como evidencia de la contaminación de ese extracto de DNA en particular.

Al igual que en el cabello de las dos tías de Luis XVII se encontró una transición T-C en posición 16519 en el DNA del cabello de María Antonieta. Los productos PCR de los dos extractos de DNA que tenían una secuencia de DNAmT idéntica, fueron clonados con el fin de determinar heteroplasmia no detectada en posición 16260. Se analizaron 13 colonias positivas. Ninguno de ellos mostró una T en posición 16260, excluyendo así la posibilidad de que María Antonieta fuera heteroplásmica en esta posición. También se analizaron dos cabellos de María Antonieta en Nantes pero no hubo ningún resultado. Además de esto se examinaron también las muestras de cabello de María Antonieta provenientes de la segunda fuente (Nijmegen).

Los cuatro extractos de DNA mostraron en total 3 secuencias: 3 extractos de DNA contenían cada una dos secuencias combinadas, mientras que la 4ta mostró una secuencias ambigua idéntica a la encontrada en las muestras anteriores de cabello de María Antonieta.

El análisis de los amortiguadores líticos usados para limpiar los cabellos, previo a su extracción, revelaron una sola secuencia. Ésta se encontró en las muestras de cabello en forma combinada. La substracción de esta secuencia contaminada reveló que era idéntica a aquella encontrada previamente en la primera fuente de las muestras de cabello de María Antonieta (Tabla 2). Por lo tanto, estos resultados proporcionaron información adicional

sobre la autenticidad de la secuencia común de las dos tías de Luis XVII.

Los 59 extractos diferentes, obtenidos de las muestras de cabello de Luisa María y Carlota no arrojaron ninguna secuencia en común. Esto pudiera ser debido a contaminación y/o degradación del DNA. Además se encontró que las muestras de cabello de Luisa María y Carlota estaban en mal estado (Figura 3d y 3e). Todas las secuencias halladas en el cabello de Luisa María y Carlota fueron diferentes de las secuencias obtenidas del húmero de Naundorff y de las dos hermanas de María Antonieta.

Finalmente, se investigó el DNA de dos parientes maternos vivos de María Teresa. La secuencia de la curva D obtenida de una muestra de sangre de la reina Ana de Rumania fue confirmada independientemente por una secuencia obtenida de una muestra de cabello de su hermano André de Bourbon Parme, en Nantes. Ambas secuencias de la curva D del DNAmT resultaron idénticas y revelaron cuatro polimorfismos en comparación a la secuencia Anderson (Tabla 2).

El análisis conjunto de la secuencia obtenida con las secuencias resultantes de diferentes poblaciones Europeas demostró, al igual que en el caso de la secuencia de Naundorff, una secuencia única. Además se observó en la muestra de sangre de la Reina Ana una ubicación de Transición T por C en posición 16519. Sin embargo, la comparación de la secuencia común de la curva D del DNAmT de las tres hermanas, Johana Gabriela, María Josefa y María Antonieta con la secuencia obtenida de los parientes maternos vivos reveló dos diferencias en HVR2. Algunas explicaciones para esta discordancia, entre los parientes maternos de la Emperatriz María Teresa se pudieran formular, tales como:

- 1) la familia muestra una tasa alta de mutación;
- 2) el cabello obtenido de las hijas de María Teresa o las secuencias obtenidas no eran auténticas;
- 3) la Reina Ana y su hermano son descendientes de una mujer adoptada algunas generaciones atrás.

De cualquier modo, la secuencia del DNAmT obtenida de los dos parientes maternos vivos convierte aun mas remota la posibilidad de que Naundorff fuera hijo de Luis XVII.

Discusión

El estudio actual proporciona evidencia sobre el hecho de que los restos de Naundorff no pueden ser identificados como los de Luis XVII, hijo de Luis XVI y María Antonieta. Esta tentativa conclusión se respalda por el análisis comparativo de DNAmT del hueso de Naundorff y de las muestras de DNA de dos parientes maternos vivos de Luis XVII, así como del análisis de DNA de muestras de cabello de parientes maternos vivos de Luis XVII, incluyendo dos de sus tías y de la mismas María Antonieta. Mientras que las diferencias en las secuencias del DNAmT entre las hijas de María Teresa y Ana de Rumania y su hermano Andrés son desconcertantes los dos tipos de información apuntan hacia una diferencia en la secuencia de DNAmT de Naundorf y del hijo de María Antonieta. Las muestras de cabello de otros dos parientes maternos, Luisa María, Reina de Bélgica y su hija Carlota, no nos permitieron sin embargo encontrar una secuencia auténtica de DNAmT debido a la pobre condición de las hebras de cabello de estas muestras. Esto también se dio para las muestras de cabello de Naundorff, los cuales en primera instancia fueron usadas para establecer la secuencia del DNAmT del mismo.

El uso de un procedimiento de Lisis diferencial previo a la extracción del ADN, eficaz en la renovación de saliva contaminada o sangre de cabello moderno, tuvo que haber eliminado el ADN contaminante. Sin embargo, la aplicación de este método o de otro alternativo en cabello de hebras dañadas, no resulta eficiente para eliminar material contaminado completamente.

El amortiguador diferencial de Lisis pudiera también penetrar en las hebras de cabellos, resultando ello en una pérdida sustancial de ADN capilar. Además, el ADN contaminante pudo haber entrado en las mechas dañadas. De manera sorprendente, los cabellos mucho más antiguos como los de Johana Gabriela, María Josefa y María Antonieta tenían mejor presentación de la mecha (Figura 3f y 3g) y también revelaron una secuencia común. Los cabellos de las 2 tías de Luis XVII y de su mamá habían sido presentados en un medallón por más de 200 años. Este estudio demuestra que a pesar de que el análisis de ADN NT en las muestras de cabello antiguos es factible, existe gran variabilidad en cuanto a la calidad del

cabello. En algunas familias, es aun común preservar cabello de miembros de familia de generaciones previas. Este material en algunos casos es útil para establecer o descartar parentesco materno. Un requisito es que la hebra de cabello esté intacta, lo cual puede ser determinado por microscopía electrónica.

La comparación de la secuencia de ADN NT del hueso de Naundorff con la de las 2 tías de Luis XVII demostró 2 diferencias una localizada en HVR1 (16260) y otra en la región entre HVR1 y HVR2 (16519). Estudios realizados con Americanos nativos, Africanos y Europeos, han demostrado que la posición nucleótida 16519 es hipervariable y sufre mutación en mayor porcentaje que las demás posiciones del área no codificante. El uso de un polimorfismo HAEIII 16519 es por ende, cuestionable en estudios filogenéticos. Sin embargo, esto no implica que no pueda usarse para establecer parentesco materno. En el caso de Naundorff nos proporciona evidencias sustanciales sobre su exclusión como hijo de María Antonieta. Contrario a todas las muestras de ADN investigadas de parientes maternos de Luis XVII, solo el hueso de Naundorff faltó de mutación en posición 16519. En la posición 16260 no se encontró ningún signo de heteroplasma en las hijas de María Teresa. No se encontró ningún signo de heteroplasma en las secuencias de ADNmt clonado de diferentes cabellos de otras 3 personas tomadas en diferentes ocasiones.

Se encontraron 2 diferentes nucleótidas entre la secuencia de ADNmt de los parientes maternos vivos de Luis XVII y 2 tías y mamá del mismo y por explicar esta discrepancia. Se puede formular 3 posibles hipótesis. Una pudiera ser que las muestras de cabello de las 3 hermanas no son auténticas. A diferencia de la muestra de cabello de María Josefa, Johana Gabriela y Naundorff (ver metodología), el origen de la muestra de cabello de María Antonieta pudiera cuestionarse. En cuanto a la primera fuente de cabello de María Antonieta pudiera cuestionarse. En cuanto, solo fue disponible información oral transmitida y en las familias que poseían los 2 medallones. Sin embargo, la 2da. fuente de cabello fue autenticada en la cabeza del príncipe Henri de Bourbon y el sello oficial de los Bourbon estaba en el documento. A pesar de que faltan pruebas sobre la autenticidad de la muestra de cabello de María

Antonietta, se encontró al igual que en las hermanas la misma secuencia de DNAm_t en la onda D.

Posteriormente, estas muestras se conservaron bajo diferentes condiciones, pegadas en medallones en el caso de Johana Gabriela y María Josefa, disecadas en un medallón en el caso de la primera muestra de María Antonietta y secadas en cartón en la segunda. Es muy incierto de esta forma que las tres muestras de cabello pertenecieran a tres individuos no relacionados y que solo una secuencia contaminante común, diferente a la del personal del mismo laboratorio fuera encontrada. La probabilidad de encontrar una misma secuencia de María Antonietta en dos personas no relacionadas, si aceptamos que María Josefa y Johana Gabriela fueran hermanas, es 1.7×10^{-3} con una frecuencia en haplotipos de 9 de 219 caucásicos (100 individuos Británicos y 119 Belgicos). La probabilidad de que estas tres personas no fueran parientes es aún más remota ($P = 6.9 \times 10^{-5}$). Por medio de una aproximación Bayesiana (ver sección de metodología) se obtuvo un radio de probabilidades de 215 (para una figura significativa), es decir, que es 215 veces más probable que el cabello sea de un pariente materno de María Josefa y Johana Gabriela.

Este radio de probabilidad representa una atadura mayor debido a que se basó en la probabilidad de encontrar al azar dos individuos con una secuencia idéntica. Una atadura menor para el RP sería de 25:1 cuando se usa la frecuencia de la secuencia de DNAm_t (0.037) de María Antonietta en la población (7 de 100 Británicos y 3 de 168 Belgicos).

La segunda hipótesis es más remota, señalando que se adoptó una niña en la estirpe de la Emperatriz María Teresa, introduciendo otra secuencia de DNAm_t en la familia, la cual se transmitió luego a la Reina Ana y su hermano. La evidencia para esta hipótesis seguramente estarían disponibles en los registros oficiales o históricos.

La tercera hipótesis indica que ocurrieron dos mutaciones durante las 9 meiosis que separan a las tres hermanas de la Reina Ana y su hermano. Parsons et al. Calculó la tasa de substitución intergeneracional resultando ello en una tasa promedio de 1 en 33 generaciones. La información también indicaba que es común en humanos la segregación extremadamente rápida de las

secuencias variantes de la región de control entre generaciones y por lo tanto, que existe un escaso DNAm_t original. Sin embargo la tasa de substitución calculada por Parsons et al es 7 veces mayor que la tasa empírica de 2 de 9 ó 1 de 4.5 generaciones observada en nuestro estudio.

También pudiera ser como lo observó Parsons et al, que algunas familias acumulan mutaciones más rápidamente que otras y que la familia de la Emperatriz María Teresa sea un ejemplo de tal circunstancia. Además, las dos mutaciones observadas en los parientes maternos vivos de Luis XVII están presentes en HVR 2, de la cual se sabe que tiene mayor tasa de heterogenicidad que HVR1.

Una de las dos posiciones HVR2, posición 152, está entre las posiciones la curva D más rápidamente, según se ha determinado en análisis filogenéticos.

La otra posición (194) está junto a otra posición de rápido desarrollo, 195. Para indicar que existieron dos mutaciones entre las 9 meiosis que separan a los parientes maternos vivos de los otros, sería necesario analizar los restos de otros parientes maternos en la familia. Nuestro intento de usar muestras de cabello de la Reina Luisa María y su hermana Carlota; sin embargo, fracasaron debido a la mala preservación de las hebras de cabello. La tentativa exclusión de Naundorff como hijo de Luis XVII en nuestro estudio, se encuentra respaldada por una investigación histórica independiente. Sin embargo, será sin dudar rechazada por el gran número de autores y expertos que llegaron a la conclusión contraria. No existen registros oficiales que muestren el reclamo de Naundorff de que fuera hijo de Luis XVII y María Antonietta. El análisis de las características físicas de Naundorff y Luis XVII, color y estructura del cabello, y los sitios de lesiones físicas fueron ya sea inconclusas ó diferencias favorecedoras (revisado por Petrie).

Con respecto a esto, sería importante el análisis del DNA de los restos de un niño que murió en el Templo el 8 de junio de 1795. El fue supuestamente enterrado en una tumba general en el cementerio de Santa Margarita (París), pero nunca se encontraron sus restos. Tras su muerte, se realizó una autopsia por parte de 5 médicos. Uno de estos (Pelletan) aparentemente colocó el

corazón del niño en su bolsillo. Este corazón fue donado a la cripta Real de la Basílica San Daniel (París) donde aun permanece.

Si se logra demostrar el origen y autenticidad de este corazón, el análisis del DNA de sus restos podría demostrar que el niño que murió en el Templo el 8 de junio de 1795 es o no es el hijo de María Antonieta, y, si se confirma, poner un fin a la teoría sobre el sustituto.

No se ha podido obtener la autorización para realizar tal estudio.

El estudio independiente de otros restos de Naundorff y de otros descendientes de María Teresa, si fuera confirmado, debieran lograr que este fascinante problema se resolviera.

Reconocimientos

Estamos agradecidos con un gran número de personas quienes contribuyeron a la realización exitosa de estas investigaciones: Príncipe Carlos Luis de Bourbon y Príncipe Carlos Luis Edmond de Bourbon, descendientes de Naundorff, por su continuo interés en nuestra búsqueda por la evidencia objetiva: DSK Shoor, consejero del Príncipe Carlos de Bourbon (Amsterdam); E Persoons, director general de los Archivos Nacionales (Bruselas); J Roegiers, Departamento de Historia (Leuven); Marques de Trazegnies (Bruselas); F. Pichornes (Wien); Hermana Michael, Convento Elisabethina (Klagenfurt); C Topper, Director de Archivos der Diözese Gurk (Klagenfurt); G Kapsch, orfebre (Klagenfurt); AV van Walsum, Alcalde actual de la ciudad de Delft; AD Kloosterman, Laboratorio de Ciencia Forense (Rijswijk); W Froentjes, científico retirado (Den Haag); F Uddenberg, conservador, Laboratorio de Ciencia Forense (Rijswijk); Marquesa Jane de Bernadières (Canes); J Van Ypersele de Strihou, chef del gabinete del Rey de Bélgica (Bruselas); G Janssens, archivista del Palacio Real (Bruselas); JAPh Laguette, miembro del comité de Fundación Graeft Voort (Tumba); G Lemmens, director del museo (Comandancia de San Juan Nijmegen); GGAM Pijnenborg, bibliotecario de la Universidad de Nijmegen; y Reina Ana de Rumania y A de Bourbon Parme por contribuir muestras biológicas comparativas.

El apoyo técnico de B Van Der Schueren, por los análisis de ME del cabello es altamente importante, también agradecemos a M Holland (Instituto Patológico de las Fuerzas Armadas, Washington) por proporcionar más información de la base de datos del DNAMt de las Fuerzas Armadas Estadounidenses.

Referencias bibliográficas

1. Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ: Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427-429, 1991
2. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, et al: Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6: 130-135, 1994
3. Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A: Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Science Int* 56: 65-76, 1992
4. Aquadro CF, Greenberg BD: Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics* 103: 287-312, 1983
5. Orrego C, King MC: Determination of familial relationships. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols*. Academic Press, London 416-426, 1990
6. Bogenhagen D, Clayton DA: The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. *J Biol Chem* 249: 7991-7995, 1974
7. Rogan PK, Salvo JJ: Molecular genetics of pre-Columbian South American mummies. *Yearbook of Physical Anthropology* 33: 195-214, 1990
8. Hagelberg E, Sykes B, Hedges R: Ancient bone amplified. *Nature* 342: 485, 1989
9. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S: Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90: 19-30, 1997
10. Jhaes E, Gilissen A, Decorte R, Cassiman J-J: Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *Forensic Science Int* 1998
11. Higuchi R, Von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA: DNA typing from single hairs. *Nature* 332: 543-546, 1988

12. Höss M, Pääbo S: DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res* 21: 3913-3914, 1993
13. Decorte R, Jehaes E, Xiao FX, Cassiman J-J: Genetic analysis of single hair shafts by automated sequence analysis of the mitochondrial D-loop region. *Adv For Haemogen* 6: 17-20, 1996
14. Jehaes E, Habex H, Decorte R, Charlier C, Van Den Berghe H, Cassiman J-J: Isolation and characterization of mitochondrial DNA from ancient remains; application to bone samples from the archaeological site at Erpskwerps. *Acta Archaeologica Lovaniensia* 33: 101-106, 1994
15. Sanger F, Niklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467, 1977
16. Sullivan KM, Mannuci A, Kimpton CP, Gill P: A rapid and quantitative DNA sex test: Fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotchniques* 15: 100-119, 1993
17. Decorte R, Cassiman J-J: Evaluation of the ALF DNA sequencer for high-speed sizing of short tandem repeat alleles. *Electrophoresis* 15:1542-1549, 1996
18. Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K et al: A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet* 15: 363-368, 1997
19. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P: The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian identification. *Int J Legal Med* 106: 85-90, 1993
20. Anderson S, Bankier AT, Barrel BG et al: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465, 1981
21. Kayser M, Caglia A, Corach D et al: Evolution of y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 110: 125-133, 1997
22. Eckert KA, Kunkel TA: DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction: *PCR Methods Appl* 1: 17-24, 1991
23. Ballinger SW, Schurr TG, Torroni A et al; Southeast Asian mitochondrial DNA analysis reveals genetic continuity of ancient Monogoloid migrations. *Genetics* 130: 139-152, 1992
24. Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A: Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21: 33-49, 1983
25. Horai S, Hayasaka K: Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* 46: 828-842, 1990
26. Horai S, Kondo R., Nakagawa-Hattori Y, Hayashi S, Sonoda S, Tajima K: Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. *Mol Biol Evol* 10: 23-47, 1993
27. Wilson MR, Polanskey D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B: Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Biotechniques* 18: 662-669, 1995
28. Torroni A, Sukernik RI, Schurr TG et al: Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53: 563-559, 1993
29. Torroni A, Sukernik RI, Schurr TG et al: mtDNA variation of aboriginal Siberians reveals distinct genetic affinities with Native Americans. *Am J Hum Genet* 53: 591-608, 1993
30. Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, Wallace DC: Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am J Hum Genet* 57: 133-149, 1995
31. Torroni A, Huopen K, Francalacci P et al; Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144: 1835-1850, 1996
32. Aris-Brosou S, Excoffier L: The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Mol Biol Evol* 13: 494-504, 1996
33. Petrie JH: Lodewijk XVII-Naundorff, een mysterie ontrafeld. De Bataafsche Leeuw: Amsterdam, 1995

Artículo publicado con la autorización del Dr. Jean-Jacques Cassiman. Traducido del inglés al español por Michelle Andrade Soriano, estudiante del sexto curso de Medicina, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

☒ Las figuras no se reprodujeron por falta de nitidez del material reproducido.