

Biología molecular para inferir fenotipos de restos forenses y antiguos en bioarqueología – Revisión

Gabriel Dorado ¹, Fernando Luque ², Plácido Pascual ³, Inmaculada Jiménez ⁴, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete ⁵, Patricia Raya ⁶, Jesús Sáiz ⁷, Adela Sánchez ⁷, Teresa E. Rosales ⁸, Víctor F. Vásquez ⁹, Pilar Hernández ¹⁰

¹ Autor para correspondencia, Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain), eMail: <bb1dopeg@uco.es>; ² Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 395, 14071 Córdoba; ³ Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 14004 Córdoba; ⁴ IES Puertas del Campo, Avda. San Juan de Dios 1, 51001 Ceuta; ⁵ EE.PP. Sagrada Familia de Baena, Avda. Padre Villoslada 22, 14850 Baena (Córdoba); ⁶ Dep. Radiología y Medicina Física, Unidad de Física Médica, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁷ Dep. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal, s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁸ Laboratorio de Arqueobiología, Avda. Juan Pablo II s/n, Universidad Nacional de Trujillo, 13011 Trujillo (Perú); ⁹ Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoecológicas Andinas Arqueobios, C/. Martínez de Compañón 430-Bajo 100, Urbanización San Andrés, 13008 Trujillo (Perú); ¹⁰ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba

Resumen

El fenotipo es el resultado de la interacción del genotipo con factores epigenéticos y el medio ambiente. Se ha considerado que la genética es responsable de >70% del fenotipo facial. Curiosamente, además de secuenciar ácidos nucleicos, es posible generar mapas de metilación de ADN de restos antiguos, para determinar fenotipos. Otras áreas de aplicación son la medicina, ciencia forense y control del cumplimiento de la ley. Así, los avances en el estudio de ácidos nucleicos están permitiendo determinar el fenotipo a partir de datos genotípicos. Ello también se ve facilitado por los desarrollos en software (incluido el procesamiento paralelo) y hardware, incluidos los motores neuronales (hardware de redes neuronales). También se han implementado nuevas estrategias, involucrando inteligencia artificial y aprendizaje automático, para alcanzar dicho objetivo. El fenotipado es una tarea desafiante, a la vanguardia de la tecnología actual. Ya se han obtenido resultados prometedores, incluida la predicción de caras de neandertales (*Homo sapiens neanderthalensis*) y denisovanos (*Homo sapiens denisova*). El futuro es prometedor en esta área de investigación, en la que también se deben considerar las implicaciones éticas y legales.

Palabras clave: mutaciones, ADN, ARN, estudios de asociación del genoma completo, polimorfismos de un solo nucleótido, loci de rasgos cuantitativos, fototipificación molecular, apariencia física, ascendencia biogeográfica, paleogenómica, paleotranscriptómica.

Abstract

The phenotype is the result of the interaction of the genotype with epigenetic factors and the environment. It has been considered that genetics is responsible for >70% of facial phenotype. Interestingly, besides sequencing nucleic acids, it is possible to generate DNA methylation maps of ancient remains, to determine phenotypes. Other application areas are medicine, forensics and law-enforcement. Thus, breakthroughs in nucleic-acid analyses are

allowing to determine the phenotype from genotypic data. That is also being facilitated by developments in software (including parallel processing) and hardware, including neural engines (neural-network hardware). New strategies involving artificial intelligence and machine learning have been also deployed to reach such a goal. Phenotyping is a challenging task, on the edge of current technology. Promising results have already been obtained, including prediction of Neanderthal (*Homo sapiens neanderthalensis*) and Denisovan (*Homo sapiens denisova*) faces. The future is promising in this research area, in which ethical and legal implications should also be considered.

Key words: mutations, DNA, RNA, genome-wide association studies, single-nucleotide polymorphisms, quantitative-trait loci, molecular photofitting, physical appearance, biogeographic ancestry, paleogenomics, paleotranscriptomics.

Introducción

El genotipo es la composición genómica de entidades biológicas como virusoides, viroides, virus y células. Incluye: i) genoma principal; ii) plásmidos (principalmente en eubacterias procariotas, pero a veces también en arqueas procariotas y en eucariotas); iii) genomas de orgánulos (mitocondrias y cloroplastos) en eucariotas; y iv) plásmidos de orgánulos. La palabra genotipo fue acuñada en 1903 por el botánico danés Wilhelm Johannsen (Johannsen, 1903). Los genes dentro del genoma son únicos para las células haploides, pero pueden exhibir los mismos alelos (homocigotos) o diferentes (heterocigotos) si dos conjuntos (diploides) o más (poliploides) están presentes dentro de la misma célula, o en toda la población biológica. August Weismann (1834-1914) observó que los organismos pluricelulares pueden contener células somáticas (que construyen el cuerpo), así como células germinales (portadoras de herencia) (Winther, 2001).

Por otro lado, las características observables de las entidades biológicas se denominan fenotipo. La dualidad genotipo-fenotipo fue propuesta por Wilhelm Johannsen (Johannsen, 1911). Sin embargo, es posible que el fenotipo no esté determinado solo por el genotipo. Otros elementos involucrados pueden ser el medio ambiente (que no se hereda) y factores epigenéticos, que pueden heredarse. Por lo tanto, organismos con el mismo genotipo pueden tener aspecto o comportamiento diferentes. Por otro lado, organismos con diferentes genotipos pueden parecerse. Se ha considerado que la genética es responsable de >70% del fenotipo facial (Djordjevic et al, 2016). Los fenotipos son visibles para las entidades biológicas actuales, pero es posible que no estén disponibles para muestras antiguas o forenses. Por lo tanto, puede ser útil inferir fenotipos de los genotipos en tales escenarios. Este tema se encuentra actualmente en la frontera del conocimiento, siendo investigado activamente. Existe un amplio interés en esta área. Ello abarca conocimientos básicos para el estudio de muestras tanto modernas como antiguas, así como aplicaciones en medicina, además de las áreas forenses y policiales. De hecho, recientemente se han publicado interesantes resultados de investigaciones sobre este fascinante tema, como se describe a continuación.

Fenotipado del ADN moderno intacto

La predicción del fenotipo a partir de la información genética se denomina fenotipado. Eso se puede lograr utilizando datos de genotipado generados con marcadores

moleculares, incluyendo secuenciación de ácidos nucleicos (Scudder et al, 2018), que realmente es la tecnología de genotipado definitiva, como hemos revisado (Dorado et al, 2021). En efecto, la Secuenciación de Primera Generación (FGS; del inglés, “First-Generation Sequencing”) representó una revolución, a la que hemos contribuido (Lario et al, 1997), ya que permitió leer información genética por primera vez, incluido el Proyecto Genoma Humano. La secuenciación de segunda generación (SGS; del inglés, “Second-Generation Sequencing”) mejoró aún más el rendimiento y redujo el costo, lo que permitió secuenciar genomas antiguos por primera vez, como hemos revisado (Dorado et al, 2015). Finalmente, la Secuenciación de Tercera Generación (TGS; del inglés, “Third-Generation Sequencing”) permitió secuenciar directamente ácidos nucleicos, sin retrotranscripción ni amplificación previa. Eso hace posible secuenciar directamente ARN antiguo (ARNA), como hemos revisado (Dorado et al, 2016; 2020). El fenotipado también se conoce como fototipificación molecular en ciencia forense, cuando se aplica para inferir la apariencia física y la ascendencia biogeográfica. Pero el fenotipado no es una tarea fácil. La razón es que no comprendemos completamente cómo funcionan los genes e interactúan con el medio ambiente, para producir fenotipos.

Para adquirir conocimientos sobre este ámbito de investigación, se pueden descubrir variantes genéticas significativas asociadas con un rasgo particular, utilizando los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS; del inglés, “Genome-Wide Association Studies”). Así, se pueden identificar marcadores moleculares asociados a rasgos de interés (Fagertun et al, 2015; Kayser, 2015; Marcinska et al, 2015; Wolinsky, 2015; Adhikari et al, 2016; Cole et al, 2016; Roosenboom et al, 2016 , 2018; Shaffer et al, 2016; Lee et al, 2017; Tsagkrasoulis et al, 2017; Cha et al, 2018; Claes et al, 2018; Indencleef et al, 2018; Qiao et al, 2018; Richmond et al, 2018 ; Rolfe et al, 2018; Wang, 2018; Weinberg et al, 2018; Bohringer y DeJong, 2019; Hebring, 2019; Li et al, 2019; Long et al, 2019; Sero et al, 2019; Wu et al, 2019 ; Xiong et al, 2019; Balanovska et al, 2020; Pospiech et al, 2020; White et al, 2020; Bonfante et al, 2021; Liu et al, 2021; Naqvi et al, 2021). Entre ellos, los polimorfismos de nucleótido único (SNP; del inglés, “Single-Nucleotide Polymorphisms”) pueden ser particularmente relevantes, ya que suelen abundar en los genomas. Asimismo, los loci de rasgos cuantitativos (QTL; del inglés, “Quantitative Trait Loci”) pueden resultar útiles. Así, permiten vincular marcadores moleculares con rasgos cuantitativos en fenotipos. Además, se pueden diseñar modelos matemáticos para predecir fenotipos, a partir de datos genotípicos.

Los desarrollos recientes en computación, en general, y bioinformática, en particular, también pueden ser útiles en la investigación del fenotipado (DeJong et al, 2018). Entre ellos se encuentran las aproximaciones de estadística multivariada, como el análisis de componentes principales (PCA; del inglés, “Principal-Components Analysis”) (Shui et al, 2017; Crouch et al, 2018), PCA multinivel (mPCA; del inglés, “multilevel PCA”) (Farnell et al, 2020) y cajas de herramientas para análisis integradores (White et al, 2019; Li et al, 2020). Además, el término inteligencia artificial (AI; del inglés, “Artificial Intelligence”) fue acuñado por John McCarthy en 1956. Así, la AI intenta analizar datos y generar resultados para lograr un objetivo en particular (Legg y Hutter, 2007). Por lo tanto, imita las funciones cognitivas humanas, como aprendizaje y resolución de problemas (Russell y Norvig, 2020). Por otro lado, el término aprendizaje automático (ML; del inglés, “Machine Learning”) fue acuñado por Arthur Samuel en 1959. ML es la parte de la AI que desarrolla algoritmos que

pueden mejorarse empírica y automáticamente. De esta forma, la máquina se entrena con datos, adquiriendo nueva experiencia para optimizar resultados. Por lo tanto, se pueden hacer predicciones para nuevos escenarios, que pueden no haber sido programados específicamente con anticipación. Eso diferencia al ML de la informática tradicional, que solo funciona con algoritmos preprogramados (Alpaydin, 2020; Hu et al, 2020).

Estos desarrollos en software informático se han visto facilitados gracias a las mejoras de hardware, en general, y a los microprocesadores, en particular. Entre ellos se encuentran: i) aumento de la frecuencia de reloj del microprocesador para generar pulsos (velocidad de reloj); ii) reducción del nodo litográfico del microprocesador; y iii) incremento del número de núcleos en multinúcleo (unos pocos; del inglés, “multicore”) y muchos núcleos (número elevado; del inglés, “manycore”) de unidades de procesamiento central (CPU; del inglés, “Central-Processing Units”) y unidades de procesamiento gráfico (GPU; del inglés, “Graphics-Processing Units”), lo que permite el procesamiento paralelo. El hardware de red neuronal dedicado es otro desarrollo interesante. Ello incluye el motor neuronal de fabricantes como Apple <<https://www.apple.com>>. Por ejemplo, el del microprocesador Apple Silicon M1 basado en ARM es capaz de ejecutar 11 billones (11.000 millones) de operaciones por segundo, y se utiliza para tareas de aprendizaje de máquinas. De hecho, el fenotipado es una ciencia multidisciplinaria, que incluye biología, bioinformática, ética y derecho (Claes y Shriver, 2014) (Fig. 1).

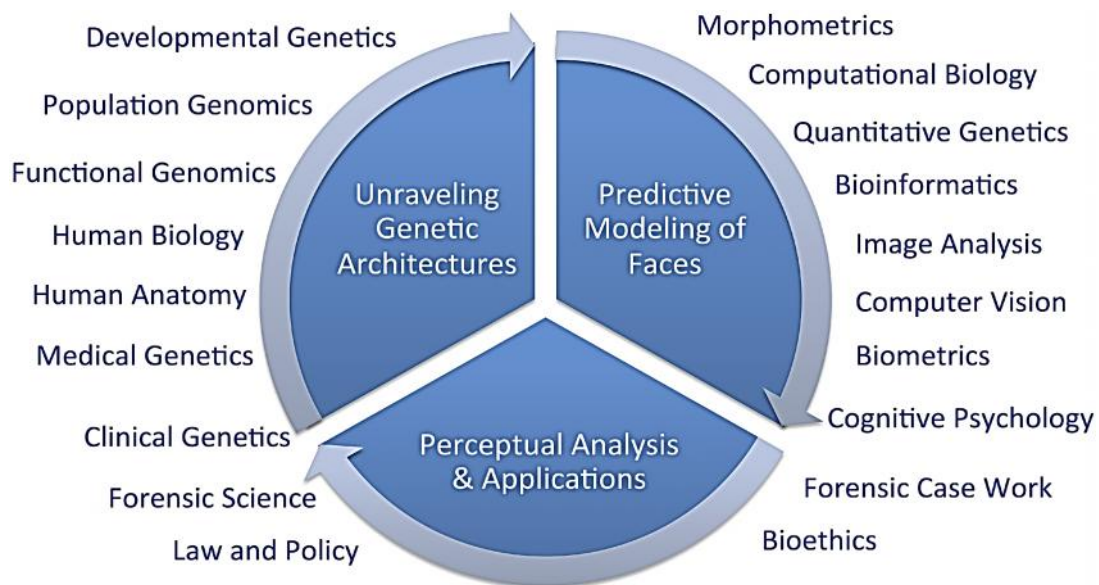


Figura 1.- Marco de fenotipado. La predicción de rasgos faciales a partir de datos de ADN es una ciencia multidisciplinaria, que involucra muchas áreas de conocimiento. © Public Library of Science (PLoS; Claes and Shriver, 2014).

Ya se han publicado algunos ejemplos interesantes de fenotipado, explotando estas tecnologías. Por ejemplo, solamente 24 SNP asociados a la variación facial se utilizaron por primera vez para inferir rostros humanos. Utilizaron modelización de imputación basada en la respuesta de remuestreo (BRIM; del inglés, “Bootstrapped Response-based Imputation Modeling”). Como reconocieron los autores, la predicción facial utilizando datos

de genotipado es un reto, pero los resultados son prometedores (Claes et al, 2014a-b). Un paso más en la fenotipificación del ADN se llevó a cabo secuenciando genomas humanos completos, con la participación del prestigioso Instituto Craig Venter (Lippert et al, 2017).

Fenotipado de ADN forense y antiguo

Es sabido que el receptor de melanocortina 1 (MC1R) está relacionado con la pigmentación. Por tanto, se amplificó un fragmento del gen *MC1R* de restos óseos neandertales, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, "Polymerase Chain-Reaction"). Curiosamente, la secuenciación de los amplicones reveló que contenían una mutación que produce piel clara y pelo rojo (pelirrojo). Se llegó a la conclusión de que al menos 1% de los neandertales homocigotos podrían haber tenido ese fenotipo (Lalueza-Fox et al, 2007). Dado que el fenotipado del ADN intacto moderno es un desafío, puede serlo mucho más usando ADN forense y antiguo (ADNa), que generalmente está dañado, tanto físicamente (fragmentos cortos) como químicamente (bases de nucleótidos modificadas).

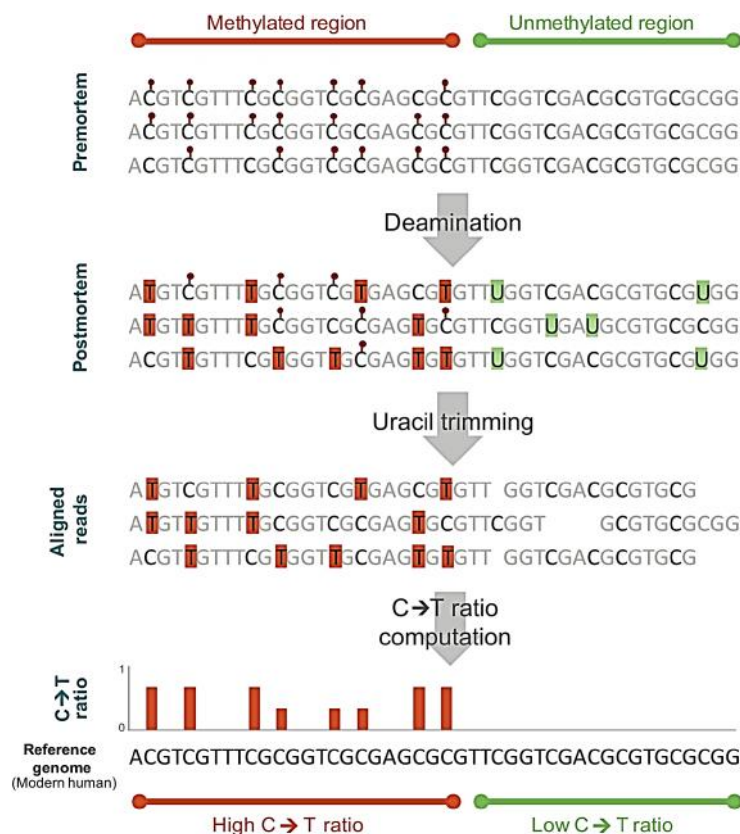


Figura 2.- Identificación de la metilación del ADN. El ADN premortem puede contener citosinas metiladas y no metiladas. Los escenarios tafonómicos postmortem pueden causar desaminación de citosina. El recorte de uracilos permite eliminar dichas bases en lecturas de secuenciación alineadas. Finalmente, las relaciones de transiciones C → T se utilizan como intermediarios para reconstruir la metilación antigua, alineando con genomas de referencia modernos. © American Association for the Advancement of Science (Gokhman et al, 2014).

Un primer paso para superar estos problemas se llevó a cabo generando mapas de metilación de ADN de restos de neandertal (*Homo sapiens neanderthalensis*) y denisovano (*Homo sapiens denisova*). Sin embargo, es posible que ese objetivo no se alcance directamente, como puede lograrse con ADN moderno. De hecho, como se ha indicado, el ADN puede sufrir daños químicos. Así, la desaminación de citosina genera uracilos o timinas (a partir de citosinas no metiladas o metiladas, respectivamente). Los uracilos se pueden recortar, pero se esperan lecturas de timina más altas en posiciones con citosinas metiladas premortem, en comparación con las posiciones no metiladas. Por lo tanto, las transiciones CpG → TpG son indicadores o intermediarios (del inglés, “proxies”) útiles de metilación del ADN antiguo (Gokhman et al, 2014, 2016; Hernando-Herraez et al, 2015; Orlando et al, 2015; Seguin-Orlando et al, 2015; Smith et al, 2015; Hanghoj et al, 2016, 2019) (Fig. 2).

Esta metodología se utilizó además para inferir la anatomía esquelética y facial de neandertales y denisovanos. Así, se identificaron los cambios de metilación en humanos arcaicos, chimpancés y humanos modernos. La expresión génica se determinó considerando que la hipermetilación del promotor reprime los genes. Tal regulación a la baja está asociada con mutaciones conocidas que causan pérdida de función. Tres filtros unidireccionales permiten predecir cambios morfológicos. Se reconstruyeron perfiles esqueléticos de neandertales y chimpancés, teniendo en cuenta las morfologías conocidas. Además, se evaluó la exactitud, precisión y sensibilidad del método (Gokhman et al, 2019) (Fig. 3).

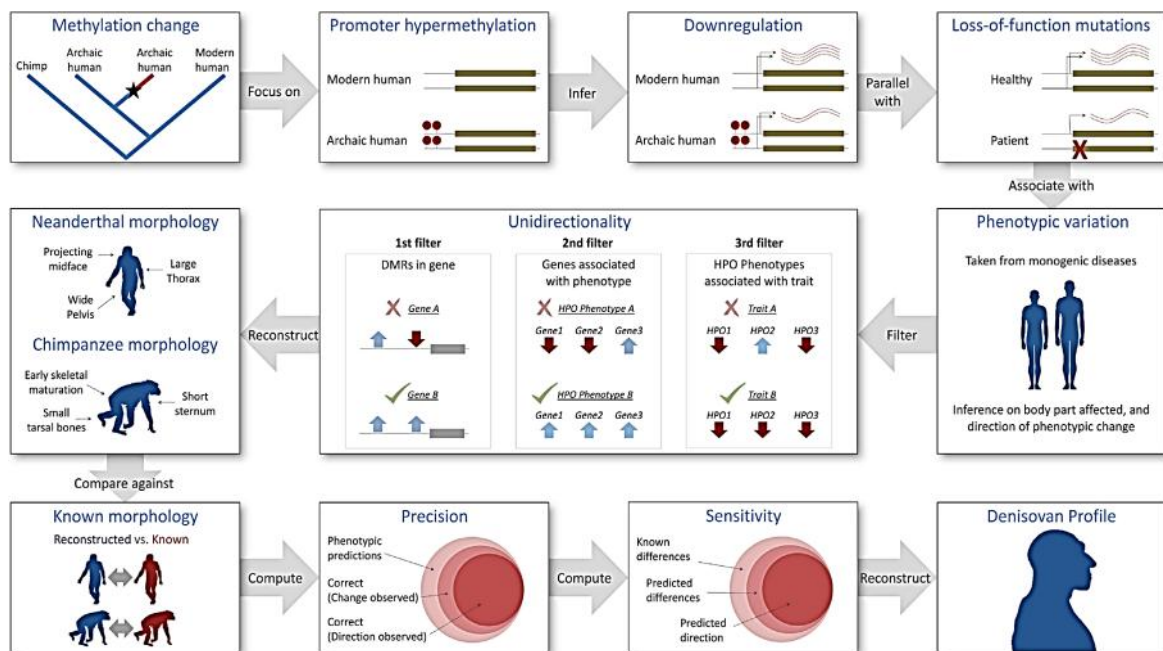


Figura 3.- Flujo de trabajo para inferir la anatomía de denisovanos a partir de los cambios de metilación del ADN. Recuadros: 1 a 5) los cambios de metilación se relacionaron con fenotipos; 6) se aplicaron tres filtros de unidireccionalidad; 7 a 10) se calculó la precisión; y 11) se predijo el perfil denisovano. © Elsevier (Gokhman et al, 2019).

Curiosamente, también se ha encontrado hipermetilación diferencial de genes relacionados con la voz y el rostro entre los humanos modernos, en comparación con homínidos antiguos (neandertales y denisovanos), así como con los grandes simios modernos (chimpancés). Por tanto, se ha propuesto que jugaron un papel clave en la evolución humana, dando forma a nuestro tracto vocal y rostro (Gokhman et al, 2020). Los patrones de metilación del ADN también se pueden utilizar para predecir la edad (Zbiec-Piekarska et al, 2015) y enfermedades como la esquizofrenia (Banerjee et al, 2018, 2019), así como para la expresión génica de muestras antiguas (Batyrev et al, 2019; Hahn et al, 2020; Liu et al, 2020; Mathov et al 2020; Rubi et al, 2020). Ello tiene implicaciones para entornos y estilos de vida antiguos (Gokhman et al 2017). Asimismo, la regulación génica en muestras modernas y arcaicas se puede inferir utilizando enfoques indirectos (Yan y McCoy, 2020) y modelos estadísticos entrenados (Colbran et al, 2019).

Por otro lado, la autodomesticación se define como un proceso conductual que implica una menor agresión y una mayor colaboración, como lo demuestran homínidos como bonobos y humanos (Wrangham, 2003). Curiosamente, la biología molecular aplicada a humanos arcaicos y modernos ha demostrado que el gen bromodominio adyacente al dominio de dedos de zinc 1B (*BAZ1B*; del inglés, "Bromodomain Adjacent to Zinc-finger domain 1B") estuvo involucrado en la autodomesticación, siendo un regulador maestro del rostro humano moderno (Zanella et al, 2019). Por tanto, metodologías que involucran tanto a la arqueología como a la biología molecular, incluyendo la paleogenómica, paleotranscriptómica y paleoproteómica, como hemos revisado (Dorado et al, 2007-2014, 2017, 2018, 2019), han permitido inferir rostros de homínidos arcaicos, como neandertales y denisovanos. (Figura 4).



Figura 4.- Predicción de caras de neandertales y denisovanos. De izquierda a derecha: reconstrucción artística de hembras adolescentes y adultas de tales subespecies, respectivamente. © 2019 Royal Pavilion & Museums; Brighton & Hove (izquierda) y Maayan Harel (derecha).

Conclusiones finales y perspectivas futuras

Los avances recientes en arqueología, biología molecular, software y hardware están permitiendo realizar proyectos científicos que antes no eran posibles. Uno de ellos es inferir rostros humanos modernos o arcaicos, a partir de sus genomas. Esta predicción fenotípica basada en el genotipo es un desafío, ya que se encuentra en el límite de lo que es posible actualmente. Sin embargo, ya se han publicado algunos logros interesantes en esta área, con resultados prometedores. Debería ser posible una predicción fenotípica más precisa con la optimización de tecnologías actuales y el desarrollo de otras nuevas. Entre ellas se encuentran: i) genómica estructural, incluyendo el ADN no codificante y la identificación de todos los genes presentes en los genomas; ii) genómica funcional, incluidas las implicaciones de la transcripción espuria o generalizada, como hemos revisado (Dorado et al, 2020); y iii) epigenética, incluidos mapas de metilación genómica. Finalmente, se deben tener en cuenta las implicaciones éticas y legales de la investigación genómica (Berkman et al, 2016).

Agradecimientos. Financiado por Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO proyecto BIO2015-64737-R) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (MINECO e INIA RF2012-00002-C02-02); Consejería de Agricultura y Pesca (041/C/2007, 75/C/2009 y 56/C/2010), Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (P11-AGR-7322) y Grupo PAI (AGR-248) de Junta de Andalucía; y Universidad de Córdoba (Ayuda a Grupos), Spain.

Referencias Bibliográficas

- Adhikari K, Fuentes-Guajardo M, Quinto-Sánchez M, Mendoza-Revilla J, Camilo Chacón-Duque J, Acuña-Alonzo V, Jaramillo C, Arias W, Lozano RB, Pérez GM, Gómez-Valdés J, Villamil-Ramírez H, Hunemeier T, Ramallo V, Silva de Cerqueira CC, Hurtado M, Villegas V, Granja V, Gallo C, Poletti G, Schuler-Faccini L, Salzano FM, Bortolini MC, Canizales-Quinteros S, Cheeseman M, Rosique J, Bedoya G, Rothhammer F, Headon D, González-José R, Balding D, Ruiz-Linares A (2016): A genome-wide association scan implicates *DCHS2*, *RUNX2*, *GLI3*, *PAX1* and *EDAR* in human facial variation. *Nature Communications* 7: 11616 (11 pp).
- Alpaydin E (2020): "Introduction to Machine Learning" (4th ed). MIT Press (Cambridge, MA, USA).
- Balanovska E, Lukianova E, Kagazezheva J, Maurer A, Leybova N, Agdzhoyan A, Gorin I, Petrushenko V, Zhabagin M, Pylev V, Kostyukova E, Balanovsky O (2020): Optimizing the genetic prediction of the eye and hair color for North Eurasian populations. *BMC Genomics* 21(Suppl 7): 527 (13 pp).

- Banerjee N, Polushina T, Bettella F, Giddaluru S, Steen VM, Andreassen OA, Le Hellard S (2018): Recently evolved human-specific methylated regions are enriched in schizophrenia signals. *BMC Evolutionary Biology* 18: 63 (11 pp).
- Banerjee N, Polushina T, Bettella F, Steen VM, Andreassen OA, Le Hellard S (2019): Analysis of differentially methylated regions in great apes and extinct hominids provides support for the evolutionary hypothesis of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 206: 209-216.
- Batyrev D, Lapid E, Carmel L, Meshorer E (2019): Predicted archaic 3D genome organization reveals genes related to head and spinal cord separating modern from archaic humans. *Cells* 9: 48 (9 pp).
- Berkman BE, Shapiro ZE, Eckstein L, Pike ER (2016): The ethics of large-scale genomic research. In: Collmann J, Matei SA (eds): "Ethical Reasoning in Big Data: An Exploratory Analysis", 53-69. Springer (New York City, NY, USA).
- Bohringer S, DeJong MA (2019): Quantification of facial traits. *Frontiers in Genetics*.10: 397(14 pp).
- Bonfante B, Faux P, Navarro N, Mendoza-Revilla J, Dubied M, Montillot C, Wentworth E, Poloni L, Varón-González C, Jones P, Xiong Z, Fuentes-Guajardo M, Palmal S, Chacón-Duque JC, Hurtado M, Villegas V, Granja V, Jaramillo C, Arias W, Barquera R, Everardo-Martínez P, Sánchez-Quinto M, Gómez-Valdés J, Villamil-Ramírez H, Silva de Cerqueira CC, Hünemeier T, Ramallo V, Liu F, Weinberg SM, Shaffer JR, Stergiakouli E, Howe LJ, Hysi PG, Spector TD, Gonzalez-José R, Schüler-Faccini L, Bortolini MC, Acuña-Alonzo V, Canizales-Quinteros S, Gallo C, Poletti G, Bedoya G, Rothhammer F, Thauvin-Robinet C, Faivre L, Costedoat C, Balding D, Cox T, Kayser M, Duplomb L, Yalcin B, Cotney J, Adhikari K, Ruiz-Linares A (2021): A GWAS in Latin Americans identifies novel face shape loci, implicating VPS13B and a Denisovan introgressed region in facial variation. *Science Advances* 7: eabc6160 (18 pp).
- Cha S, Lim JE, Park AY, Do JH, Lee SW, Shin C, Cho NH, Kang JO, Nam JM, Kim JS, Woo KM, Lee SH, Kim JY, Oh B (2018): Identification of five novel genetic loci related to facial morphology by genome-wide association studies. *BMC Genomics* 19: 481 (17 pp).
- Claes P, Hill H, Shriver MD (2014a): Toward DNA-based facial composites: preliminary results and validation. *Forensic Science International: Genetics* 13: 208-216.
- Claes P, Liberton DK, Daniels K, Rosana KM, Quillen EE, Pearson LN, McEvoy B, Bauchet M, Zaidi AA, Yao W, Tang H, Barsh GS, Absher DM, Puts DA, Rocha J, Beleza S, Pereira RW, Baynam G, Suetens P, Vandermeulen D, Wagner JK, Boster JS, Shriver MD (2014b): Modeling 3D facial shape from DNA. *PLoS Genetics* 10: e1004224 (14 pp).
- Claes P, Roosenboom J, White JD, Swigut T, Sero D, Li J, Lee MK, Zaidi A, Mattern BC, Liebowitz C, Pearson L, González T, Leslie EJ, Carlson JC, Orlova E, Suetens P, Vandermeulen D, Feingold E, Marazita ML, Shaffer JR, Wysocka J, Shriver MD, Weinberg SM (2018): Genome-wide mapping of global-to-local genetic effects on human facial shape. *Nature Genetics* 50: 414-423.

- Claes P, Shriver MD (2014): Establishing a multidisciplinary context for modeling 3D facial shape from DNA. *PLoS Genetics* 10: e1004725 (3 pp).
- Colbran LL, Gamazon ER, Zhou D, Evans P, Cox NJ, Capra JA (2019): Inferred divergent gene regulation in archaic hominins reveals potential phenotypic differences. *Nature Ecology & Evolution* 3: 1598-1606.
- Cole JB, Manyama M, Kimwaga E, Mathayo J, Larson JR, Liberton DK, Lukowiak K, Ferrara TM, Riccardi SL, Li M, Mio W, Prochazkova M, Williams T, Li H, Jones KL, Klein OD, Santorico SA, Hallgrímsson B, Spritz RA (2016): Genomewide association study of African children identifies association of *SCHIP1* and *PDE8A* with facial size and shape. *PLoS Genetics* 12: e1006174. (19 pp).
- Crouch DJM, Winney B, Koppen WP, Christmas WJ, Hutnik K, Day T, Meena D, Boumertit A, Hysi P, Nessa A, Spector TD, Kittler J, Bodmer WF (2018): Genetics of the human face: Identification of large-effect single gene variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 115: E676-E685.
- DeJong MA, Hysi P, Spector T, Niessen W, Koudstaal MJ, Wolvius EB, Kayser M, Bohringer S (2018): Ensemble landmarking of 3D facial surface scans. *Scientific Reports* 8: 12 (11 pp).
- Djordjevic J, Zhurov AI, Richmond S, Visigen Consortium (2016): Genetic and environmental contributions to facial morphological variation: A 3D population-based twin study. *PLoS One* 11: e0162250 (20 pp).
- Dorado G, Gálvez S, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2021): Analyzing modern biomolecules: the revolution of nucleic-acid sequencing – Review. *Biomolecules* (section Molecular Genetics) 11: 1111 (18 pp).
- Dorado G, Jiménez I, Rey I, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2013): Genomics and proteomics in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 7: 47-63.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2015): Second-generation nucleic-acid sequencing and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 9: 216-230.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Pérez-Jiménez M, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Martín J, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2016): Sequencing ancient RNA in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 10: 103-111.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF (2017): Clustered Regularly-Interspaced Short-Palindromic Repeats (CRISPR) in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 11: 179-188.
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales T, Vásquez VF, Hernández P (2018): Evolution from first hominids to modern humans: philosophy, bioarchaeology and biology - Review. *Archaeobios* 12:69-82
- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2019): Bioarchaeology to bring back scents from extinct plants - Review. *Archaeobios* 13: 66-75.

- Dorado G, Luque F, Pascual P, Jiménez I, Sánchez-Cañete FJS, Raya P, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2020): Implications of non-coding RNA on biology and evolution: from first hominids to modern humans - Review. *Archaeobios* 14: 107-118.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF (2009): Ancient DNA to decipher the domestication of dog (REVIEW). *Archaeobios* 3: 127-132.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P, Vásquez VF (2010): Biological mass extinctions on planet Earth (REVIEW). *Archaeobios* 4: 53-64.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2011): Ancient nucleic acids from maize - A review. *Archaeobios* 5: 21-28.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2012): Isotopes in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 6: 79-91
- Dorado G, Sánchez-Cañete FJS, Pascual P, Jiménez I, Luque F, Pérez-Jiménez M, Raya P, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2014): Starch genomics and bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 8: 41-50.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes (REVIEW). *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology (REVIEW). *Archaeobios* 1: 1-2.
- Fagertun J, Wolffhechel K, Pers TH, Nielsen HB, Gudbjartsson D, Stefansson H, Stefansson K, Paulsen RR, Jarmer H (2015): Predicting facial characteristics from complex polygenic variations. *Forensic Science International: Genetics* 19: 263-268.
- Farnell DJJ, Richmond S, Galloway J, Zhurov AI, Pirttiniemi P, Heikkinen T, Harila V, Matthews H, Claes P (2020): Multilevel principal components analysis of three-dimensional facial growth in adolescents. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 188:105272 (10 pp).
- Gokhman D, Lavi E, Prufer K, Fraga MF, Riancho JA, Kelso J, Paabo S, Meshorer E, Carmel L (2014): Reconstructing the DNA methylation maps of the Neandertal and the Denisovan. *Science* 344:523-527.
- Gokhman D, Malul A, Carmel L (2017): Inferring past environments from ancient epigenomes. *Molecular Biology and Evolution* 34: 2429-2438.
- Gokhman D, Meshorer E, Carmel L (2016): Epigenetics: It's getting old. Past meets future in paleoepigenetics. *Trends in Ecology & Evolution* 31: 290-300.
- Gokhman D, Mishol N, de Manuel M, de Juan D, Shuqrun J, Meshorer E, Marques-Bonet T, Rak Y, Carmel L (2019): Reconstructing Denisovan anatomy using DNA methylation maps. *Cell* 179:180-192.e10 (24 pp).

- Gokhman D, Nissim-Rafinia M, Agranat-Tamir L, Housman G, García-Pérez R, Lizano E, Cheronet O, Mallick S, Nieves-Colón MA, Li H, Alpaslan-Roodenberg S, Novak M, Gu H, Osinski JM, Ferrando-Bernal M, Gelabert P, Lipende I, Mjungu D, Kondova I, Bontrop R, Kullmer O, Weber G, Shahar T, Dvir-Ginzberg M, Faerman M, Quillen EE, Meissner A, Lahav Y, Kandel L, Liebergall M, Prada ME, Vidal JM, Gronostajski RM, Stone AC, Yakir B, Lalueza-Fox C, Pinhasi R, Reich D, Marques-Bonet T, Meshorer E, Carmel L (2020): Differential DNA methylation of vocal and facial anatomy genes in modern humans. *Nature Communications* 11: 1189 (21 pp).
- Hahn EE, Grealy A, Alexander M, Holleley CE (2020): Museum epigenomics: charting the future by unlocking the past. *Trends in Ecology & Evolution* 35: 295-300.
- Hanghoj K, Renaud G, Albrechtsen A, Orlando L (2019): DamMet: ancient methylome mapping accounting for errors, true variants, and post-mortem DNA damage. *Gigascience* 8: giz025 (6 pp).
- Hanghoj K, Seguin-Orlando A, Schubert M, Madsen T, Pedersen JS, Willerslev E, Orlando L (2016): Fast, accurate and automatic ancient nucleosome and methylation maps with epiPALEOMIX. *Molecular Biology and Evolution* 33: 3284-3298.
- Hebbring S (2019): Genomic and phenomic research in the 21st century *Trends in Genetics* 35: 29-41.
- Hernando-Herraez I, Garcia-Perez R, Sharp AJ, Marques-Bonet T (2015): DNA methylation: Insights into human evolution. *PLoS Genetics* 11: e1005661 (12 pp).
- Hu J, Niu H, Carrasco J, Lennox B, Arvin F (2020): Voronoi-based multi-robot autonomous exploration in unknown environments via deep reinforcement learning. *IEEE Transactions on Vehicular Technology* 69: 14413-14423.
- Indencleef K, Roosenboom J, Hoskens H, White JD, Shriver MD, Richmond S, Peeters H, Feingold E, Marazita ML, Shaffer JR, Weinberg SM, Hens G, Claes P (2018): Six *NSCL/P* loci show associations with normal-range craniofacial variation. *Frontiers in Genetics* 9: 502 (14 pp).
- Johannsen W (1903): Om arvelighed i samfund og i rene linier. *Oversigt Birdy over Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Forhandlingerm* 3: 247.370.
- Johannsen, W. (1911).The genotype conception of heredity.*American Naturalist* 45:129-159.
- Kayser M (2015): Forensic DNA phenotyping: predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics* 18: 33-48.
- Lalueza-Fox C, Rompler H, Caramelli D, Staubert C, Catalano G, Hughes D, Rohland N, Pilli E, Longo L, Condemi S, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Stoneking M, Schoneberg T, Bertranpetit J, Hofreiter M (2007): A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science* 318:1453-1455.
- Lario A, González A, Dorado G (1997): Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. *Analytical Biochemistry* 247: 30-33.

- Lee MK, Shaffer JR, Leslie EJ, Orlova E, Carlson JC, Feingold E, Marazita ML, Weinberg SM (2017): Genome-wide association study of facial morphology reveals novel associations with *FREM1* and *PARK2*. *PLoS One* 12: e0176566 (13 pp).
- Legg S, Hutter M (2007): A collection of definitions of intelligence. *Frontiers in Artificial Intelligence and Applications* 157: 17-24.
- Li J, Zarzar TG, White JD, Indencleef K, Hoskens H, Matthews H, Nauwelaers N, Zaidi A, Eller RJ, Herrick N, Günther T, Svensson EM, Jakobsson M, Walsh S, Van Steen K, Shriver MD, Claes P (2020): Robust genome-wide ancestry inference for heterogeneous datasets: illustrated using the 1,000 genome project with 3D facial images. *Scientific Reports* 10: 11850 (15 pp).
- Li Y, Zhao W, Li D, Tao X, Xiong Z, Liu J, Zhang W, Ji A, Tang K, Liu F, Li C (2019): *EDAR*, *LYPLAL1*, *PRDM16*, *PAX3*, *DKK1*, *TNFSF12*, *CACNA2D3*, and *SUPT3H* gene variants influence facial morphology in a Eurasian population. *Human Genetics* 138: 681-689.
- Lippert C, Sabatini R, Maher MC, Kang EY, Lee S, Arikan O, Harley A, Bernal A, Garst P, Lavrenko V, Yocum K, Wong T, Zhu M, Yang WY, Chang C, Lu T, Lee CWH, Hicks B, Ramakrishnan S, Tang H, Xie C, Piper J, Brewerton S, Turpaz Y, Telenti A, Roby RK, Och FJ, Venter JC (2017): Identification of individuals by trait prediction using whole-genome sequencing data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 114: 10166-10171.
- Liu D, Alhazmi N, Matthews H, Lee MK, Li J, Hecht JT, Wehby GL, Moreno LM, Heike CL, Roosenboom J, Feingold E, Marazita ML, Claes P, Liao EC, Weinberg SM, Shaffer JR (2021): Impact of low-frequency coding variants on human facial shape. *Scientific Reports* 11: 748 (13 pp).
- Liu Y, Weyrich LS, Llamas B (2020): More arrows in the ancient DNA quiver: Use of paleoepigenomes and paleomicrobiomes to investigate animal adaptation to environment. *Molecular Biology and Evolution* 37: 307-319.
- Long GS, Hussen M, Dench J, Aris-Brosou S (2019): Identifying genetic determinants of complex phenotypes from whole genome sequence data. *BMC Genomics* 20: 470 (17pp)
- Marcinska M, Pospiech E, Abidi S, Andersen JD, van den Berge M, Carracedo A, Eduardoff M, Marczakiewicz-Lustig A, Morling N, Sijen T, Skowron M, Sochtig J, Syndercombe-Court D, Weiler N; EUROFORGEN-NoE Consortium, Schneider PM, Ballard D, Borsting C, Parson W, Phillips C, Branicki W (2015): Evaluation of DNA variants associated with androgenetic alopecia and their potential to predict male pattern baldness. *PLoS One*. 10: e0127852 (18 pp).
- Mathov Y, Batyrev D, Meshorer E, Carmel L (2020): Harnessing epigenetics to study human evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 62: 23-29.
- Naqvi S, Sleyp Y, Hoskens H, Indencleef K, Spence JP, Bruffaerts R, Radwan A, Eller RJ, Richmond S, Shriver MD, Shaffer JR, Weinberg SM, Walsh S, Thompson J, Pritchard JK, Sunaert S, Peeters H, Wysocka J, Claes P (2021): Shared heritability of human face and brain shape. *Nature Genetics* 53: 830-839.
- Orlando L, Gilbert MT, Willerslev E (2015): Reconstructing ancient genomes and epigenomes. *Nature Reviews Genetics* 16: 395-408.

- Pospiech E, Kukla-Bartoszek M, Karłowska-Pik J, Zielinski P, Wozniak A, Boron M, Dabrowski M, Zubanska M, Jarosz A, Grzybowski T, Ploski R, Spolnicka M, Branicki W (2020): Exploring the possibility of predicting human head hair greying from DNA using whole-exome and targeted NGS data. *BMC Genomics* 21: 538 (18 pp).
- Qiao L, Yang Y, Fu P, Hu S, Zhou H, Peng S, Tan J, Lu Y, Lou H, Lu D, Wu S, Guo J, Jin L, Guan Y, Wang S, Xu S, Tang K (2018): Genome-wide variants of Eurasian facial shape differentiation and a prospective model of DNA based face prediction. *Journal of Genetics and Genomics* 45: 419-432.
- Richmond S, Howe LJ, Lewis S, Stergiakouli E, Zhurov A (2018): Facial genetics: a brief overview. *Frontiers in Genetics* 9: 462 (21 pp).
- Rolfe S, Lee SI, Shapiro L (2018): Associations between genetic data and quantitative assessment of normal facial asymmetry. *Frontiers in Genetics* 9: 659 (10 pp).
- Roosenboom J, Hens G, Mattern BC, Shriver MD, Claes P (2016): Exploring the underlying genetics of craniofacial morphology through various sources of knowledge. *Biomed Research International* 2016: 3054578 (9 pp).
- Roosenboom J, Indencleef K, Lee MK, Hoskens H, White JD, Liu D, Hecht JT, Wehby GL, Moreno LM, Hodges-Simeon C, Feingold E, Marazita ML, Richmond S, Shriver MD, Claes P, Shaffer JR, Weinberg SM (2018): SNPs associated with testosterone levels influence human facial morphology. *Frontiers in Genetics* 9: 497 (10 pp).
- Rubi TL, Knowles LL, Dantzer B (2020): Museum epigenomics: Characterizing cytosine methylation in historic museum specimens. *Molecular Ecology Resources* 20: 1161-1170.
- Russell SJ, Norvig P (2020): "Artificial Intelligence: A Modern Approach" (4th ed). Pearson (London, UK).
- Scudder N, McNevin D, Kelty SF, Walsh SJ, Robertson J (2018): Massively parallel sequencing and the emergence of forensic genomics: Defining the policy and legal issues for law enforcement. *Science & Justice* 58:153-158.
- Seguin-Orlando A, Gamba C, Sarkissian C, Ermini L, Louvel G, Boulygina E, Sokolov A, Nedoluzhko A, Lorenzen ED, Lopez P, McDonald HG, Scott E, Tikhonov A, Stafford TW Jr, Alfarhan AH, Alquraishi SA, Al-Rasheid KAS, Shapiro B, Willerslev E, Prokhortchouk E, Orlando L (2015): Pros and cons of methylation-based enrichment methods for ancient DNA. *Scientific Reports* 5: 11826 (15 pp).
- Sero D, Zaidi A, Li J, White JD, Zarzar TBG, Marazita ML, Weinberg SM, Suetens P, Vandermeulen D, Wagner JK, Shriver MD, Claes P (2019): Facial recognition from DNA using face-to-DNA classifiers. *Nature Communications* 10: 2557 (12 pp).
- Shaffer JR, Orlova E, Lee MK, Leslie EJ, Raffensperger ZD, Heike CL, Cunningham ML, Hecht JT, Kau CH, Nidey NL, Moreno LM, Wehby GL, Murray JC, Laurie CA, Laurie CC, Cole J, Ferrara T, Santorico S, Klein O, Mio W, Feingold E, Hallgrimsson B, Spritz RA, Marazita ML, Weinberg SM (2016): Genome-wide association study reveals multiple loci influencing normal human facial morphology. *PLoS Genetics* 12:e1006149 (21 pp).
- Shui W, Zhou M, Maddock S, He T, Wang X, Deng Q (2017): A PCA-Based method for determining craniofacial relationship and sexual dimorphism of facial shapes. *Computers in Biology and Medicine* 90: 33-49.

- Smith RW, Monroe C, Bolnick DA (2015): Detection of cytosine methylation in ancient DNA from five native american populations using bisulfite sequencing. *PLoS One* 10: e0125344 (23 pp).
- Tsagkrasoulis D, Hysi P, Spector T, Montana G (2017): Heritability maps of human face morphology through large-scale automated three-dimensional phenotyping. *Scientific Reports* 7:45885 (18 pp).
- Wang X (2018): Clinical trans-omics: an integration of clinical phenomes with molecular multiomics. *Cell Biology and Toxicology* 34:163-166.
- Weinberg SM, Cornell R, Leslie EJ (2018): Craniofacial genetics: Where have we been and where are we going? *PLoS Genetics* 14: e1007438 (8 pp).
- Wrangham R (2003): The evolution of cooking. In: Brockman J (ed): "The New Humanists: Science at the Edge". Sterling Publishing (New York, NY, USA), pp. 99-110.
- White JD, Indencleef K, Naqvi S, Eller RJ, Hoskens H, Roosenboom J, Lee MK, Li J, Mohammed J, Richmond S, Quillen EE, Norton HL, Feingold E, Swigut T, Marazita ML, Peeters H, Hens G, Shaffer JR, Wysocka J, Walsh S, Weinberg SM, Shriver MD, Claes P (2020): Insights into the genetic architecture of the human face. *Nature Genetics* 53:45-53.
- White JD, Ortega-Castrillón A, Matthews H, Zaidi AA, Ekrami O, Snyders J, Fan Y, Penington T, Van Dongen S, Shriver MD, Claes P (2019): MeshMonk: Open-source large-scale intensive 3D phenotyping *Scientific Reports* 9: 6085 (11 pp).
- Winther R (2001): August Weismann on germ-plasm variation. *Journal of the History of Biology* 34: 517-555.
- Wolinsky H (2015): CSI on steroids: DNA-based phenotyping is helping police derive visual information from crime scene samples to aid in the hunt for suspects. *EMBO Reports* 16: 782-786.
- Wu W, Zhai G, Xu Z, Hou B, Liu D, Liu T, Liu W, Ren F (2019): Whole-exome sequencing identified four loci influencing craniofacial morphology in northern Han Chinese. *Human Genetics* 138: 601-611.
- Xiong Z, Dankova G, Howe LJ, Lee MK, Hysi PG, de Jong MA, Zhu G, Adhikari K, Li D, Li Y, Pan B, Feingold E, Marazita ML, Shaffer JR, McAloney K, Xu SH, Jin L, Wang S, de Vrij FM, Lendemeijer B, Richmond S, Zhurov A, Lewis S, Sharp GC, Paternoster L, Thompson H, Gonzalez-Jose R, Bortolini MC, Canizales-Quinteros S, Gallo C, Poletti G, Bedoya G, Rothhammer F, Uitterlinden AG, Ikram MA, Wolvius E, Kushner SA, Nijsten TE, Palstra RT, Boehringer S, Medland SE, Tang K, Ruiz-Linares A, Martin NG, Spector TD, Stergiakouli E, Weinberg SM, Liu F, Kayser M; International Visible Trait Genetics (VisiGen) Consortium (2019): Novel genetic loci affecting facial shape variation in humans. *Elife* 8: e49898 (web HTML only).
- Yan SM, McCoy RC (2020): Archaic hominin genomics provides a window into gene expression evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* 62: 44-49.
- Zanella M, Vitriolo A, Andirko A, Martins PT, Sturm S, O'Rourke T, Laugsch M, Malerba N, Skaros A, Trattaro S, Germain PL, Mihailovic M, Merla G, Rada-Iglesias A, Boeckx C, Testa G (2019): Dosage analysis of the 7q11.23 Williams region identifies BAZ1B as a major human gene patterning the modern human face and underlying self-domestication. *Science Advances* 5: eaaw7908 (15 pp).

Zbiec-Piekarska R, Spolnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Z, Paleczka A, Kucharczyk K, Ploski R, Branicki W (2015): Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics* 17: 173-179.