



DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL, TOXICOLOGÍA Y PSIQUIATRÍA.

UNIVERSIDAD DE GRANADA

**“ANÁLISIS DE 15 LOCI TIPO SHORT TAMDEN
REPEATS (STR) EN LA POBLACIÓN DE
PARAGUAY PARA SU USO EN IDENTIFICACIÓN
FORENSE”**

Memoria que presenta para optar al grado de doctor en Ciencias
Biológicas, **FRANCISCO FERNÁNDEZ ROSADO.**

GRANADA, Marzo 2008.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco Fernández Rosado
D.L.: En trámite
ISBN: En trámite

D. JOSE ANTONIO LORENTE ACOSTA, PROFESOR TITULAR DE MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y DIRECTOR DEL GENYO (CENTRO DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA)

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente tesis “ANÁLISIS DE 15 LOCI TIPO SHORT TAMDEN REPEATS (STR) EN LA POBLACIÓN DE PARAGUAY PARA SU USO EN IDENTIFICACIÓN FORENSE”, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología por el Licenciado en Biología Don Francisco Fernández Rosado y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente Tesis, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor en Biología ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo el presente en Granada, a 28 de mayo de dos mil ocho.

DOÑA. CARMEN ENTRALA BERNAL, DIRECTORA GENERAL DE LORGEN
GP-PARQUE TECNOLÓGICO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente tesis “ANÁLISIS DE 15 LOCI TIPO SHORT TAMDEN REPEATS (STR) EN LA POBLACIÓN DE PARAGUAY PARA SU USO EN IDENTIFICACIÓN FORENSE”, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología por el Licenciado en Biología Don Francisco Fernández Rosado y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente Tesis, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor en Biología ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo el presente en Granada, a 28 de mayo de dos mil ocho.

D. JUAN CARLOS ALVAREZ MERINO, TECNICO SUPERIOR EN DOCENCIA E INVESTIGACIÓN EN MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación que se expone en la presente tesis “ANÁLISIS DE 15 LOCI TIPO SHORT TAMDEN REPEATS (STR) EN LA POBLACIÓN DE PARAGUAY PARA SU USO EN IDENTIFICACIÓN FORENSE”, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología por el Licenciado en Biología Don Francisco Fernández Rosado y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente Tesis, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor en Biología ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo el presente en Granada, a 28 de mayo de dos mil ocho.

En memoria de mis padres,

A mis hermanos,

A mis amigos.

Agradecimientos:

No podría dar por finalizado este trabajo de tesis doctoral sin mencionar previamente a todas aquellas personas que, directa o indirectamente, me han ayudado a lo largo de estos años. Todos ellos son, además de compañeros, amigos.

A Doña María Castellano Arroyo y a Don Enrique Villanueva Cañadas, catedráticos y Directores del departamento de Medicinal legal de la universidad de Granada, durante el periodo de elaboración del presente trabajo, gracias por concederme la oportunidad de formarme.

A José Antonio Lorente Acosta, director principal de esta tesis, por abrirme las puertas en el campo de la Genética Forense y por haber confiado en mí desde el principio para formar parte de su equipo. Por ser una persona dinámica y en constante búsqueda de lo mejor para todos. Además de director de tesis, es un buen amigo con el que es un placer trabajar y del que todos los días se aprende algo nuevo y siempre desde su cariño y afecto.

A Carmen Entrala Bernal, codirectora de esta tesis, por toda la ayuda e interés prestado. De ella he aprendido a trabajar con meticulosidad y orden en el laboratorio y a llegar al origen de los problemas utilizando la paciencia y el razonamiento. Por las largas charlas en mis momentos difíciles y por los buenos consejos que siempre me ha dado. Ha sido desde los primeros momentos mi compañera, mi guía profesional pero sobre todo una gran amiga a la que quiero y tengo un enorme aprecio. Por todos los momentos vividos, unos muy dulces y otros no tanto, gracias.

A Juan Carlos Álvarez Merino, codirector de esta tesis, por darme la tranquilidad que solo una persona con su experiencia y conocimiento puede transmitir. Tener un pilar como él ha sido importante para el desarrollo de mi vida académica y laboral. En sus palabras siempre he encontrado el camino correcto a elegir en mi vida profesional.

Quiero expresar en particular mi agradecimiento y amistad a mis compañeros y amigos: **Esther, Encarni, Eva, Carla, Luís Javier, Esperanza, Loreto y Olga**, por el apoyo y la amistad que desde siempre me han prestado, por ser personas que realizan una labor eficiente, a veces no valorada en su justa medida, pero fundamental en el desarrollo de nuestros estudios. A ellos me une además del trabajo, una sólida amistad y muchos buenos momentos compartidos y que espero seguir compartiendo por mucho tiempo. Ellos han sido las personas que más han sufrido mis problemas, inquietudes y agobios durante toda mi formación y elaboración de este trabajo. Su comprensión, apoyo y cariño significan para mi mucho más de lo que ellos se imaginan.

A todos los compañeros del Departamento de Medicina Legal, en especial a **Marga** por su cariño y amistad desde el primer día que llegué. A **Lourdes** por su constante ánimo y simpatía. A los residentes, de los cuales guardo un hermoso recuerdo.

A aquellas personas que nos han honrado con sus visitas a nuestro laboratorio y que sin duda nos han aportado mucho a todos los niveles.

A mis padres y hermanos, sin los que este trabajo no hubiese sido posible, a ellos les debo todo y ellos fueron los que me animaron seguir mi verdadera vocación, probablemente sin sus consejos habría escogido el camino equivocado. Por soportar haberles dedicado menos tiempo del que merecen y del que yo hubiese querido, por aguantarme, por su enorme cariño y amor hacia mi.

Finalmente y desde mi más profundo agradecimiento a mis amigos inseparables y que siempre me han aportado todo su cariño y apoyo incondicional, gracias a **Fran, Lolo y Amarillo**, por darme la fuerza necesaria para poder terminar este trabajo, sabéis que me dais la fuerza suficiente en mi día a día. Gracias por hacerme sonreír y dejarme ser feliz junto a vosotros.

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AmpFLP	Amplificable Fragment Length Polymorphism
BSA	Bovine Serum Albumin (Albúmina Sérica Bovina)
CE	Capilar Electrophoresis (electroforesis capilar)
dNTPs	desoxiribonucleósido 5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido EtilenDiaminoTetracético
esp	Esperados
frec	Frecuencia
G²	Estadístico del test de razón de verosimilitud
gl	Grados de libertad
Het	Heterocigotos
Hom	Homocigotos
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antígeno Leucocitario Humano)
HWE	Hardy Weinberg Equilibrium (Equilibrio Hardy-Weinberg)
ISFH	International Society for Forensic Haemogenetics
K562	Linea celular humana, leucemia mieloide
Kb	Kilobase
LR	Likelihood ratio (razón de verosimilitud)
M	Molar
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
MLP	Multilocus Probe (sonda multilocus)

mM	Milimolar
MVR	Minisatellite Variant Repeat
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
Obs	Observados
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Poder de discriminación
PE	Poder de exclusión
PDA	Piperazín diacrilamida
PIC	Contenido en información polimórfica
p.m.	Peso molecular
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismos de longitud para fragmentos de restricción)
sd	Desviación estándar
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
se	Error estándar
SLP	Single Locus Probes (sondas unilocus)
STR	Short Tandem Repeat (repeticiones cortas en tándem)
TBE	Tris-Bórico-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetra methyl ethylene diamine
TWGDAM	Technical Work Group on DNA Methods
U.V.	Ultra Violeta
V	Voltio

VNTR	Variable Number of Tandem Repeats (repeticiones en tándem en número variable)
w	Vatios
w/v	Peso/Volúmen
c²	Estadístico del test de bondad de ajuste a distribuciones
mg	Microgramo
ml	Microlitro
mM	Micromolar

INDICE

1. OBJETIVOS -----	0
1.1. Justificación del tema y objetivos -----	2
2. INTRODUCCION -----	4
2.1. La identificación criminal a lo largo de la historia -----	6
2.1.1. El problema de la identificación-----	7
2.1.2. Fases ante el hecho delictivo-----	8
2.1.3. Análisis complementarios-----	9
2.2. Estudio del ADN -----	12
2.2.1. ADN no codificante-----	12
2.2.1.1. Secuencias repetidas en tándem-----	13
2.2.1.2. Secuencias repetidas intercaladas-----	14
2.2.1.3. Significado biológico del ADN repetitivo -----	16
2.2.2. Polimorfismos del ADN-----	16
2.2.2.1. ADN minisatélite-----	17
2.2.2.2. ADN microsatélite-----	18
2.2.2.3. Clasificación de polimorfismos de ADN-----	22
2.2.2.4. Origen genético de los polimorfismos en ADN repetitivo-----	25
2.3. Técnicas de estudio de los polimorfismos del ADN-----	28
2.3.1. Evolución de las técnicas de ADN utilizadas en identificación-----	28
2.3.1.1. Técnicas mediante RFLP-----	29
2.3.2. Análisis por la reacción en cadena de la polimerasa-----	31
2.3.2.1. Componentes de la PCR-----	34
2.3.2.2. Ventajas y desventajas del uso de la PCR en el análisis de indicios biológicos-----	40
2.3.2.3. Nuevas técnicas de PCR: PCR a tiempo real (RT-PCR)-----	41

2.3.3.	Sistemas de análisis de los polimorfismos STR-----	43
2.3.3.1.	Tipificación manual-----	43
2.3.3.2.	Sistemas de electroforesis capilar y detección por fluorescencia-----	44
2.3.4.	Nuevas Tecnologías-----	49
2.3.4.1.	Biochips-----	49
2.3.4.2.	Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)-----	52
2.4.	Genética de Poblaciones -----	56
2.4.1.	Ley de Hardy-Weinberg-----	57
2.4.2.	Fuerzas evolutivas-----	58
2.4.2.1.	Mutación-----	58
2.4.2.2.	La migración genética-----	59
2.4.2.3.	Deriva genética-----	59
2.4.2.4.	Selección natural-----	62
2.4.3.	Estudio poblacional aplicado a la identificación genética, ejemplo ----	65
2.5.	Bases de datos-----	71
2.5.1.	Clasificación de las bases de datos en genética forense-----	72
2.5.2.	Clasificación de las bases de datos-----	72
2.5.2.1.	Clasificación según el contenido-----	72
2.5.2.2.	Clasificación según finalidad-----	73
2.5.3.	Generación de bases de datos de identificación genética -----	75
2.5.4.	Bases de datos de identificación genética civiles: programa Fénix---	76
2.5.5.	Bases de datos de identificación criminal-----	78
2.5.6.	Problemas legales y éticos en la recogida de muestras en las bases de datos criminales (BDGIC)-----	80
2.5.7.	Estrategias y aspectos técnicos legislativos a considerar en la creación de bases de datos criminales (BDGIC)-----	81
2.6.	Casos especiales en el análisis genético forense-----	91
2.6.1.	Identificación de recién nacidos-----	91
2.6.2.	Tráfico de menores-----	92

2.6.3.	Profesiones de riesgo-----	92
2.6.4.	Identificación de alta seguridad-----	93
2.6.5.	Resolución de enigmas y casos históricos-----	93
2.6.6.	Identificación genética en grandes catástrofes-----	97
2.7. Consideraciones legales y éticas en torno al análisis de ADN-----104		
2.7.1.	Problemas derivados de la negativa del consentimiento-----	106
2.7.2.	Cuestiones jurídicas-----	108
2.7.3.	Consideraciones éticas-----	111
2.7.3.1	Aspectos éticos de la prueba-----	111
2.7.3.2	Manipulación de la información aportada por el análisis del ADN en medicina legal-----	113
2.7.4.	Consideraciones jurídicas sobre la recogida de indicios y la prueba indiciaria pericial -----	114
3. MATERIAL Y METODOS ----- 89		
3.1.	Protocolo general de trabajo-----	91
3.1.1.	Proceso extracción ADN.....	91
3.1.2.	Cuantificación del ADN extraído	91
3.1.3.	Amplificación del ADN por PCR-----	
3.1.4.	Electroforesis-----	
3.2.	Extracción y cuantificación del ADN para nuestro estudio poblacional---	97
3.2.1.	Protocolo de extracción para el ADN	97
3.2.2	Cuantificación del ADN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa-----	104
3.3	Amplificación y comprobación del producto de PCR-----	105
3.4	Electroforesis-----	108
3.4.1.	Descripción del analizador ABI Prism® 310.....	109
3.4.2.	Descripción del proceso de electroforesis y detección de fluorescencia en el ABI Prism® 310.....	111
3.4.3.	Interpretación de resultados: problemas y soluciones -----	
3.4.4	Ventajas aportadas por los sistemas de Electroforesis Capilar frente a los sistemas de Electroforesis en geles de archilamida-----	

3.5. Análisis estadístico-----	128
3.5.1. Calculo de las Frecuencias alélicas y genotípicas	128
3.5.2 Tests utilizados para demostrar la independencia de los alelos-----	
3.5.3. Parámetros estadísticos de interés forense.....	134
4. RESULTADOS-----	145
4.1. Resultados del estudio poblacional-----	147
4.1.1. Visualización de los resultados obtenidos para el kit PPLEX 16 en la población de Paraguay-----	147
4.1.2...Resultados obtenidos para la población de Paraguay-----	152
5. DISCUSION -----	205
5.1. Estudio genético-poblacional-----	207
5. 5.1.1. Discusión de los resultados del Multiplex PowerPlex16 System para la población de Paraguay.....	207
5.1.1.1. Discusión de los resultados analíticos	207
5.1.1.2. Discusión del análisis estadístico	212
5.1.2. Discusión de parámetros estadísticos para otras poblaciones	217
5.2. Discusión global -----	251
6. CONCLUSIONES-----	255
7. BIBLIOGRAFÍA -----	261
ANEXO-----	285

1. OBJETIVOS

1.1- JUSTIFICACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS

La aplicación de las técnicas de análisis de ADN al campo de la Biología Forense se vislumbró en 1980 gracias al descubrimiento por Wyman y White del primer locus de ADN polimórfico. La enorme variabilidad que presentaban dichos loci entre los diferentes individuos hizo que rápidamente se pensara en su aplicabilidad a la identificación genética, ya fuese con fines de resolución de casos de criminalística o en el estudio biológico de la paternidad. De esta manera, la Medicina Legal, y en concreto la Biología Forense, sufrió una gran revolución al poseer las herramientas necesarias para la resolución de casos de criminalística que hasta entonces ni siquiera habían sido considerados. Las técnicas de análisis de ADN han experimentado un avance considerable haciéndose cada vez más sensibles y alcanzando un nivel de fiabilidad cercano al 100% y por tanto la identificación genética de las personas por medio del análisis de regiones polimórficas del ADN no codificante se ha convertido en el medio más exacto y poderoso de identificación en ciencias forenses.

En los últimos años, el número de loci tipo Short Tandem Repeat (STR) que se han considerado como útiles en medicina legal y forense ha ido aumentando ininterrumpidamente, por lo que se hace necesario que cada laboratorio decida el uso de un número limitado de ellos. Los cálculos estadísticos que han de efectuarse para alcanzar una probabilidad de identificación determinada (W ó IP en el caso de las paternidades; MP en los casos criminalísticos) exigen la realización de estudios poblacionales previos.

Un requisito fundamental para poder utilizar nuevos polimorfismos de ADN con fines identificativos y obtener resultados altamente fiables es el estudio y caracterización de dichos polimorfismos en la población que posteriormente se utilizará como referencia. De ahí la importancia que tienen en Genética Forense los estudios genético-poblacionales.

Por tanto (un requisito básico) para poder aplicar los polimorfismos del ADN, y en el caso que nos ocupa los polimorfismos STR, en el campo de la genética forense es realizar previamente un estudio en una muestra representativa de la población de referencia para poder determinar los siguientes aspectos:

1. Grado de variabilidad del marcador y frecuencias de las distintas variantes (frecuencias alélicas) en la población de referencia. Cuanto mayor sea el número de alelos y más homogéneamente estén distribuidas las frecuencias alélicas de un *locus* STR, mayor será su poder de discriminación.
2. Proporción de genotipos en la población de referencia, es decir, si ésta es la que cabría esperar asumiendo un cruzamiento al azar entre los individuos (equilibrio Hardy-Weimberg).

3. Equilibrio de ligamiento de los distintos *loci* STR en estudio. Por tanto, determinar si la frecuencia de un genotipo *multilocus* es igual al producto de las frecuencias de cada *locus*.
4. Homogeneidad de la población o, por el contrario, determinar si está compuesta de subpoblaciones con distinta distribución de frecuencias alélicas.
5. Además se compararan los resultados obtenidos para nuestra población con los obtenidos para otras poblaciones estudiadas y de esta manera poder determinar si el sistema de análisis genético empleado es una buena herramienta de identificación humana.

Por este motivo uno de los principales objetivos del presente trabajo ha sido la caracterización en la población de referencia (Paraguay) de 15 marcadores de ADN polimórficos tipo microsatélite (**D13S317, D7S820, D16S539, D3S1358, HUMVWA, HUMFGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, THO1, TPOX, PENTA E, PENTA D, CSF1PO Y LA AMELOGANINA**). Este estudio implica la determinación de frecuencias alélicas de cada uno de los marcadores en una muestra de la población estudiada, la comprobación de que los marcadores estudiados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la aplicación de una serie de tests estadísticos, el estudio de independencia de los loci estudiados y el análisis de una serie de parámetros de interés forense.

2. INTRODUCCIÓN

2.1- LA IDENTIFICACIÓN CRIMINAL A LO LARGO DE LA HISTORIA.

La perfecta identificación de las personas es requisito previo exigido en la gran mayoría de las actuaciones judiciales, independientemente de la esfera que se considere: no se puede impartir justicia si el culpable no está plenamente identificado.

La Medicina Legal debe en gran parte su origen a la preocupación social por el crimen. Así, comprobamos cómo las referencias de carácter médico-legal más antiguas en las primeras culturas diferenciadas tratan sobre hechos caracterizados por lesiones o muertes producidas por el uso de la violencia (Código de HAMMURABI en Mesopotamia, la compilación de SONG TS'EU en China, valoración de las lesiones en India, y las aportaciones de las antiguas culturas griega y romana).

El nacimiento de la **Medicina Legal** como ciencia ocurrió en el Renacimiento con dos sucesos relevantes:

-La promulgación del Código de Bamberg en 1507.

-Y, como hecho más trascendente, la sanción de la '**Constitutio Criminalis Carolina**', votada en 1532 en la Dieta de Ratisbona a instancia de Carlos V de Alemania y I de España. En ella se fijan los elementos esenciales para la comprobación de cada delito, estableciendo taxativamente la intervención de los médicos, cirujanos y comadronas, según los casos, en los procesos por lesiones, homicidio, suicidio de enfermos mentales, parto procurado o clandestino, aborto, infanticidio, envenenamiento, errores profesionales del médico, etc...

Aunque el ámbito de aplicación de la Medicina Legal incluía al de todo el Derecho, los aspectos penales predominaron siempre por su trascendencia y número de casos. Estas situaciones siempre vienen caracterizadas por la existencia de tres elementos:

- La víctima.
- Los hechos.
- El autor o autores.

Estos tres elementos son objeto de la investigación médico-legal para encontrar la verdad jurídica.

Generalmente, el estudio va destinado a esclarecer todos los aspectos de interés médico-legal sobre los hechos y relacionando los diferentes datos biológicos encontrados en cada uno de los elementos.

2.1.1-El problema de la identificación

Uno de los principales problemas que ha contado la sociedad y la Medicina Legal es el de la identificación de un determinado individuo a partir de unos elementos de juicio determinados. La cuestión se puede trasladar a numerosos casos en la práctica, los cuales, siguiendo a Villanueva y Castilla (1990), podemos encuadrar en uno de los siguientes grupos:

- **Sujetos vivos:** Es el caso de desaparecidos, usurpación de personalidad, disputas de paternidad.

- **Cadáveres recientes:** Las situaciones más frecuentes corresponden a las víctimas de desastres colectivos.

- **Esqueletos y restos óseos:** Las circunstancias de estudio pueden ser muy variadas, generalmente muy similares a las del grupo anterior, pero con un mayor paso del tiempo.

Según el diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, '**identificar**', centrándonos en la persona, es reconocer si una persona es la misma que se supone o se busca, comprobar que dicha persona es la misma conocida en otras circunstancias o de la que se poseen ciertos datos, es decir, establecer la identidad de una persona; y parte del concepto de persona como diferente al resto de las de su clase.

Por el contrario, en la 'individualización' partimos del concepto de individuo, definido como persona que forma parte de una corporación, sociedad, es decir, de un grupo. Por lo tanto, '**individualizar**' es caracterizar, particularizar, comunicar o atribuir a un ser características que lo distinguen de los demás de su especie.

Así, en la identificación encontramos a la persona mientras que en la individualización determinamos al individuo como elemento del grupo.

La multiplicidad de situaciones hace que dentro de la Medicina Legal se presenten casos de identificación y de individualización, aunque siempre, en último extremo, lo pretendido es encontrar la identidad de la persona en cuestión, como arquero que apunta al centro de la diana, pero las circunstancias de cada caso hacen que la flecha quede a más o menos distancia en uno de los círculos periféricos, y sean elementos ajenos al análisis, e incluso a la Medicina Legal, los que nos lleven hasta el centro de la diana: la identificación.

Las pruebas para llegar al diagnóstico de identificación se realizan mediante el estudio de caracteres hereditarios. Para que estos caracteres sean útiles en los diagnósticos de identificación deben cumplir ciertos requisitos:

- Ser altamente variables, esto es necesario ya que si todos los individuos presentaran los mismos sería imposible diferenciarlos entre sí.

- El modelo de herencia debe de ser conocido y estar firmemente determinado. Esta característica es importante en los diagnósticos biológicos de paternidad, en los que se analizan los caracteres que el hijo ha heredado del padre biológico y se establecen si son compatibles con los del presunto padre.
- Inmutables a lo largo de la vida del individuo, con modelos idénticos en los distintos tejidos del organismo.

Aunque muy próximos entre sí, con grandes parcelas compartidas y con una gran parte de complementariedad, el problema que se plantea en uno y otro caso es completamente diferente, originándose del mismo tronco dos ramas diferentes de la Medicina Legal, aunque con múltiples tallos que se entrecruzan e interrelacionan:

-Antropología Forense, que parte del sujeto vivo, del cadáver o de sus restos y que generalmente pretende establecer su identidad y algunas características de los hechos de los que forma parte como víctima.

-Criminalística, grupo de ciencias que "estudia los indicios dejados en el lugar de los hechos", gracias a los cuales podemos contestar a las principales preguntas que surgen ante la comisión de un delito: ¿quién es el autor? (a veces también quién es la víctima) y ¿cuáles fueron las circunstancias que rodearon al hecho?

Como se puede deducir, la Criminalística dentro del campo penal exige la existencia de un hecho delictivo, mientras que en el caso de la Antropología puede ser que éste no exista y que el problema sea exclusivamente la identificación.

2.1.2-Fases ante el hecho delictivo.

La ciencia y el desarrollo tecnológico fueron incorporando al arsenal de la Medicina Legal nuevos instrumentos capaces de resolver problemas cada vez más profundos y consecuentemente más trascendentes. Paralelamente el Derecho fue regulando la utilización de dichos medios contemplándolos en las leyes de enjuiciamiento criminal con vistas a conseguir unas garantías adecuadas a la hora de su realización.

De este modo quedan establecidas las fases que se siguen ante un hecho delictivo, desde que se tienen conocimiento del mismo hasta que se juzga y se falla. Este tiempo se puede dividir en cuatro fases según Simonin:

-Busca y constatación del delito: Corresponde fundamentalmente a la fase de reconocimiento, levantamiento del cadáver, autopsia, recogida de muestras,...

-Búsqueda del agente de la infracción. Comprende el estudio de las piezas de convicción, de los indicios. En esta fase se pretende llegar un poco más lejos; la primera es más general y trata de determinar qué es lo que ha

sucedido, mientras que en esta segunda se trata de determinar las posibles relaciones entre los diferentes elementos para encontrar el agente o autor de los hechos, así como para conocer algunas circunstancias de los mismos.

-Apreciación del grado de responsabilidad.

-Determinación de la culpabilidad. En estas dos últimas fases, independientemente de que se realice un estudio psiquiátrico-psicológico para la determinación de la imputabilidad, desde el punto de vista médico-legal destacan por ser el momento en el que se valoran todas las pruebas y estudios realizados con anterioridad.

2.1.3-Análisis complementarios.

La necesidad de encontrar el agente de la infracción hizo que la Medicina Legal no terminara su estudio en el cadáver, sino que lo ampliara en un doble sentido:

-Por una parte, sobre determinadas muestras tomadas del cadáver con el fin de realizar determinados estudios complementarios.

-Por otra, desplazándolo hacia cualquier vestigio presente en el lugar de los hechos.

El análisis complementario se centró en una primera época en los aspectos toxicológicos y más adelante se fue ampliando a otros campos como la anatomía patológica o la biología. El estudio de los indicios dio lugar a que surgiera la Criminalística: nunca una puerta tan pequeña (el indicio) condujo a una habitación tan grande en la que se guardaban muchas de las respuestas que los otros medios no nos proporcionaban.

La introducción entre 1984 y 1986 de la tecnología de análisis del ADN para la identificación judicial por el Profesor inglés Alec J. Jeffreys cambió totalmente el panorama de la investigación criminal, de tal modo que desde aquella época hasta estos momentos, las técnicas para analizar el ADN evolucionan continuamente y permiten resolver casos que antes ni siquiera eran estimados.

La introducción de las técnicas de análisis del ADN a la criminalística ha supuesto una revolución en este campo por las siguientes razones básicas:

- El ADN es de cada persona es único, y convenientemente analizado es capaz de diferenciar a un ser humano de entre todos los demás.

- El ADN es común a todas las células del cuerpo. Un análisis adecuado de cualquier parte del cuerpo -llamada indicio biológico criminal, y que incluye sangre, semen, pelos,.. Y su posterior comparación con la persona sospechosa posibilitan la identificación de un criminal.

- Es posible llegar a identificar una persona a partir de indicios biológicos muy pequeños, invisibles al ojo humano.

- Es posible obtener información de indicios biológicos aunque haya pasado mucho tiempo desde el momento en que fueron depositados, incluso muchos años después.

Por esta serie de características básicas, la tecnología del ADN ha superado con creces los límites que tenían las otras técnicas, muchas de ellas exclusivas para los diferentes tipos de indicios. Nunca hasta ahora ha sido posible utilizar procedimientos analíticos tan potentes y tan seguros para la sociedad, porque si el ADN es capaz de implicar a una persona como autor de un crimen determinado sin que quepa duda alguna, con mucha mayor facilidad es capaz de excluir como sospechoso a quien sea inocente.

Así por tanto analizando un número suficiente de regiones de ADN es posible demostrar que la coincidencia por azar entre dos personas es extraordinariamente pequeña. La probabilidad de que dos individuos no emparentados tomados al azar posean el mismo perfil de ADN después de estudiar 5 loci hipervariables, puede llegar a ser de uno entre un billón. Por tanto, la tecnología del ADN no es un simple método de exclusión-inclusión sino un método de identificación prácticamente absoluta (excluyendo a los gemelos monocigotos).

2.2- ESTUDIO DEL ADN

El término genoma humano se utiliza para describir la totalidad del ADN o material genético contenida en las células humanas. Este concepto engloba en realidad a dos genomas: un genoma complejo, el **nuclear**, y un genoma sencillo, el **mitocondrial**. El genoma nuclear proporciona la mayoría de la información genética esencial, que en su mayor parte es descodificada para especificar la síntesis de polipéptidos en los ribosomas citoplasmáticos. Las mitocondrias poseen sus propios ribosomas, y los escasos genes codificantes que contiene el genoma mitocondrial producen ARN mensajero que es traducido por ribosomas mitocondriales. No obstante, casi todos los polipéptidos mitocondriales vienen codificados en genes nucleares y son sintetizados en ribosomas citoplasmáticos antes de ser importados por la mitocondria.

2.2.1- ADN No-codificante.

Entre un 80-90% del ADN contenido en el núcleo celular no cumple la definición clásica de gen y se ha denominado ADN no codificante. Debido a que por ahora no se le asocia función alguna también se le denomina ADN basura o ADN no esencial (Alberts et al, 1992; Strachan et al, 1999). No obstante este ADN es una herramienta esencial para la investigación forense por toda una serie de características y peculiaridades que hacen de él un elemento ideal para la individualización.

En general el ADN no-codificante puede ser de dos tipos:

- ADN de copia sencilla o **no repetitivo** que actúa como ADN espaciador entre las regiones codificantes del genoma.

Entre las secuencias **no repetitivas** se encuentran los intrones, los cuales no contienen información útil para la síntesis de la cadena polipeptídica y son eliminados durante el proceso de "*splicing*". En las regiones que flanquean a los genes y en las zonas espaciadoras se han encontrado también secuencias extensas de ADN cuya función se desconoce. Las secuencias repetitivas se han encontrado en zonas como los orígenes de replicación los cuales son necesarios para el inicio de la replicación al entrar en la fase "S" de la mitosis (Huberman, 1995).

- ADN de copia múltiple, denominándose entonces ADN **repetitivo** (Singer, 1982a; Kao, 1985).

El ADN repetitivo ha sido clasificado a su vez en diversos tipos basándose en su organización estructural y frecuencia de reiteración de cada clase o tipo. Hay dos grandes clases, las **secuencias repetidas en tándem** y las **secuencias repetidas intercaladas**, que analizaremos a continuación con cierto detalle por su importancia en la identificación genética.

2.2.1.1 - Secuencias repetidas en tándem

Suponen el 5 - 10 % del genoma de los mamíferos y, generalmente, se caracterizan por la presencia de una secuencia común repetida en tándem de manera continua en un fragmento de ADN (Singer, 1982a). Son características de los centrómeros y de los telómeros y parece que son importantes para determinar la estabilidad y la posición correcta de los cromosomas. Se encuentran distribuidas en el genoma de dos maneras:

-**Tipo I:** En grandes bloques caracterizados por una disposición repetitiva en tándem de diversas unidades.

-**Tipo II:** En pequeños bloques con la misma disposición en tándem formados por la misma unidad básica y dispersos por todo en genoma.

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

* **Secuencias repetidas en tándem de tipo I** En función del tamaño de la secuencia consenso se distingue tres grupos:

- **Familias satélite:** El término "ADN satélite" se ha utilizado para describir grandes bloques de ADN altamente repetitivo organizadas en tándem. Hay cuatro grandes clases de satélites: I, II, III y IV (Singer, 1982a). Constituyen un 2-6% del genoma y debido a su diferente proporción de bases G/C con respecto al resto del ADN pueden ser aislados en un gradiente de $\text{Ag-Cs}_2\text{SO}_4$. Las secuencias consenso oscilan entre los 5 pb (satélite III) y los 170 pb (satélite I). La localización de estas secuencias es básicamente la heterocromatina estructural de las regiones centroméricas.

- **Satélite alfoide:** Tiene una densidad similar a la de los satélites II y III, sin embargo su secuencia consenso es de 340 pb. Se ha sugerido que el origen de esta secuencia estaría en la formación de un dímero de estas dos unidades de 171 pb que posteriormente darían lugar a la secuencia de 340 pb.

- **Midisatélites:** son secuencias repetidas en tándem con una longitud total comprendida entre 250 y 500 Kpb. Son de copia única y altamente polimórficos.

* **Secuencias repetidas en tándem de tipo II: repeticiones cortas.** Se distinguen dos grupos:

- **Minisatélites:** Son secuencias de ADN constituidas por una secuencia consenso de 9 a 100 pb repetida en tándem (Nakamura, 1987a). Los minisatélites suelen encontrarse cerca de los telómeros, aunque también se han encontrado intercalados en otras posiciones cromosómicas. En los extremos de los telómeros existe una familia de minisatélites que se ha denominado "ADN telomérico" y que consta de un bloque de 10 a 15 Kb de repeticiones en tándem de una secuencia de 6 nucleótidos. Los hexanucleótidos son añadidos a los extremos de los telómeros por una enzima llamada telomerasa y parece que actúan como amortiguadores de la degradación de los extremos de los cromosomas.

Estas secuencias de ADN son altamente polimórficas o variables entre los distintos individuos, presentando índices de heterocigosidad mayores del 50% e incluso a veces, cercanos al 100% (Nakamura, 1987a). A dichos polimorfismos se les denomina abreviadamente **VNTR** (Variable Number of Tandem Repeat).

- **Microsatélites:** Contienen una secuencia consenso de 1 a 6 pb repetida en tándem. Al igual que los minisatélites son secuencias altamente polimórficas y en este caso a los polimorfismos de estas secuencias se les llama **STR** (Short Tandem Repeat). Entre las repeticiones de un solo nucleótido son frecuentes las de A y T (0.3% del genoma nuclear), mientras que las de C o G son bastante más raras. En cuanto a repeticiones de dinucleótidos son comunes las repeticiones de CA (0.5% del genoma nuclear) y suelen ser muy polimórficas. También son frecuentes las repeticiones CT/AG (0.2%). Las repeticiones de trinucleótidos o tetranucleótidos son comparativamente raras pero poseen un alto grado de polimorfismo, lo cual hace que sean muy utilizados como marcadores de identificación genética.

2.2.1.2- Secuencias repetidas intercaladas

El segundo tipo principal de ADN repetitivo, el cual se encuentra en el genoma humano en una proporción del 20 %, está formado por secuencias de repeticiones intercaladas individualmente en forma de unidades sencillas en diversos puntos del genoma. Estos elementos también han sido descritos en algunos mamíferos, fundamentalmente en los primates superiores y roedores.

Atendiendo a su tamaño han sido clasificadas en dos grandes grupos (Singer, 1982b):

- **SINE** o elementos nucleares cortos dispersos (**Short Interspersed Nuclear Elements**). Uno de los SINE más conocidos es la familia de repeticiones *Alu*. Esta repetición es específica de los primates y en el genoma humano ha alcanzado un elevado número de copias.

- **LINE** o elementos nucleares largos dispersos (**Long Interspersed Nuclear Elements**). Un ejemplo de LINE en humanos es el elemento LINE-1 o L-1, que también puede encontrarse en otros mamíferos como el ratón.

A diferencia de las repeticiones en tándem, que se encuentran todas ellas a continuación unas de otras a lo largo de todo el fragmento, entre los elementos intercalados existen fragmentos de ADN no-repetitivo, apareciendo los SINEs o LINEs cada cierto número de pares de bases más o menos largo.

El mecanismo por el que los SINEs y LINEs están dispersos en forma de múltiples copias por todo el genoma no se conoce del todo. Sin embargo ambos aparecen como ejemplos de elementos genéticos móviles. Por su origen pueden ser transcritos a ARN y la secuencia copiada puede ser integrada como ADN en otro lugar del genoma, del mismo modo que los retrovirus se integran en el genoma eucariótico (retrotransposición).

No obstante, esta distinción estructural entre las secuencias repetidas en tándem y las intercaladas no debe entenderse como rígida, ya que se han descrito casos, como por ejemplo la familia de repeticiones *Sau 3a*, consistentes en 5 subunidades en tándem de aproximadamente 170 pb cada una que producen un elemento similar a un LINE de aproximadamente 850 pb de longitud que puede existir independientemente en un locus determinado del genoma sería entonces un VNTR) o encontrarse en varios loci como una serie de 850 pb cada una formando un LINE.

Es significativo que una pequeña fracción de la unidad de 850 pb del genoma humano es extracromosómica, sugiriendo que tiene propiedades de un elemento genético móvil. Efectivamente, se sabe que la mayoría de los fragmentos repetidos intercalados derivan de unas cuantas secuencias de ADN transponibles que se han multiplicado hasta dar lugar a un cierto número de copias en nuestro genoma.

Existen muchas variedades de elementos transponibles, los cuales oscilan entre 2.000 y 10.000 pb de longitud, la mayoría de ellos están presentes entre 5 y 10 copias por célula diploide, constituyendo el 10 % del genoma de los eucariotas superiores.

2.2.1.3- Significado biológico del ADN repetitivo

A pesar de que las secuencias de ADN repetitivo no codifiquen para ninguna proteína, no puede decirse que carezcan de función. De hecho, se han propuesto varias funciones para estas regiones:

- Puntos calientes para la recombinación homóloga (Jeffreys et al, 1985a).
- Regulación de la transcripción (Gruss, 1981).
- Dirección del posicionamiento de las cromátidas homólogas durante la meiosis (Sen, 1988).
- Desarrollo de superestructuras locus específicas responsables del plegamiento de la cromatina (Vogt, 1990).
- Síntesis proteica (Ohno, 1984).

Aunque las funciones del ADN repetitivo mencionadas puedan ser de cierta importancia para la célula, la utilidad del mismo en el campo de la Biología Forense no deriva de las mismas, sino de una serie de características que hacen de él un elemento clave para la identificación. Entre estas características está el hecho de que, al ser secuencias no codificantes, no están sometidas al filtro que supone la selección natural, con lo que cualquier mutación que ocurra en estas secuencias permanecerá. Por esta razón existe un alto grado de variabilidad o polimorfismo para estos fragmentos entre los distintos individuos.

En general, la utilidad de estos polimorfismos se extiende tanto al campo de la Medicina Forense como al Diagnóstico Clínico de enfermedades genéticas, a la construcción de mapas genéticos, etc.

2.2.2- Polimorfismos del ADN.

Los primeros polimorfismos de ADN que se estudiaron eran analizados digiriendo el ADN con enzimas de restricción e hibridándolo posteriormente con sondas marcadas radioactivamente. De esta manera se podían estudiar los diferentes fragmentos que se originaban al cortar el ADN con una determinada enzima de restricción. La variabilidad entre individuos radicaba en el número de sitios de corte para esa enzima, de manera que para cada individuo se obtenía un patrón de bandas diferente. A estos polimorfismos se les llamó polimorfismos de longitud para fragmentos de restricción o, de manera abreviada, **RFLP** (Restriction Fragments Length Polymorphisms).

Posteriormente los estudios se centraron en otro tipo de polimorfismos basados en variaciones en el número de repeticiones de una secuencia

central. En función de la longitud de la secuencia central se distinguen dos tipos de polimorfismos:

- VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats")
- STR ("Short Tandem Repeats")

El descubrimiento de estos dos tipos de polimorfismos basados en técnicas de amplificación "in vitro" (PCR), hizo que los RFLPs fueran perdiendo importancia en la identificación forense hasta el punto de que en la actualidad están en franco desuso en los laboratorios de Genética Forense.

2.2.2.1 - ADN Minisatélite.

La búsqueda de loci VNTR puede hacerse mediante hibridación con fragmentos de ADN que contengan las repeticiones o bien usando sondas sintéticas complementarias a la unidad de repetición. El análisis se realiza mediante el uso de enzimas de restricción cuya diana no se encuentre dentro de las unidades de repetición. En este caso el tamaño de los fragmentos de restricción estará en función del número de repeticiones presentes en el locus analizado.

Desde el descubrimiento de la PCR el análisis de los VNTR se ha simplificado enormemente al ofrecer una serie de ventajas que no ofrecía el análisis por RFLP (Lorente y Lorente, 1995):

- Consume menos tiempo.
- La cantidad de ADN que se requiere es menor; de hecho, la PCR permite la obtención de resultados a partir de cantidades muy pequeñas de ADN con lo cual se posibilita el análisis en aquellos casos en los que los indicios biológicos encontrados son mínimos (un pelo, una mancha pequeña de sangre o semen, etc.).
- Al analizarse fragmentos pequeños, es posible amplificar material antiguo y parcialmente degradado.
- Permite estudiar la existencia de alelos nulos que no son detectados mediante Southern blot, bien porque escapan del gel durante la electroforesis al ser de pequeño tamaño o bien porque al estar formados por pocas unidades de repetición hibridan con un número bajo de moléculas de sonda. El hecho de no detectar este tipo de alelos podría estar originando un exceso de homocigotos al estar considerando como homocigotos a individuos heterocigotos con un alelo de este tipo en su genotipo (Chakraborty, 1994).
- Posibilidad de amplificar conjuntamente varios marcadores (reacciones tipo multiplex).

A los loci VNTR que, por poseer un rango de pesos moleculares comprendido entre 100-2000 pb, pueden ser amplificados mediante PCR se denominan **AmpFLP**. En la siguiente tabla se muestran algunos de los AmpFLPs usados en identificación forense.

Marcadores	Tamaño	NºAlelos	Referencias
D1S80	224-640	29	Kasai et al.1990, Budowle et al.1991.
ApoB	570-900	21	Boerwinkle 1989
YNZ22	170-870	12	Horn, 1989
COL2A1	650-890	5	Wu et al.1990.

2.2.2.2- ADN Microsatélite.

Los loci microsatélites son los de mayor utilidad hoy en día en el campo de la identificación genética. Según Richards y Sutherland (1992) cada 6-10 Kb del genoma humano puede encontrarse una secuencia de este tipo. En cuanto a los loci tri y tetraméricos (que son los de mayor interés forense en la actualidad) se estima que se distribuyen cada 15 Kb (Edwards et al, 1991).

Los STR se distribuyen ampliamente por todo el genoma encontrándose tanto en regiones génicas como extragénicas. Los STR situados en regiones extragénicas o no codificantes son los responsables del gran avance de la Genética Forense. Además de su aplicabilidad en dicho campo, estos loci son utilizados en el desarrollo de mapas de ligamiento y en el diagnóstico clínico de enfermedades de origen genético tales y como la distrofia muscular Duchenne/Becker, fibrosis quística, corea de Huntington y distrofia miotónica, (Mully et al, 1991; Morral y Estivill, 1992; Oudet et 1991; Weber et al, 1992).

El polimorfismo de los loci STR radica, al igual que en los VNTR, en las variaciones del número de repeticiones de la secuencia central. Pero además, los STR pueden variar en la longitud de la unidad de repetición y en el rigor con el que llegan a formar un modelo de repeticiones. Las unidades de repetición “simples” contienen unidades de idéntica longitud y secuencia, mientras que las llamadas unidades de repetición “complejas” pueden contener bloques de repetición de unidades de longitud variable y además una mayor o menor variación de las secuencias. Sobre la base de esto podemos decir que pueden encontrarse dos tipos de STR:

- Los que poseen un número bajo de alelos (<12) pero bien diferenciados,

- los que poseen un elevado número de alelos (>35) poco diferenciados.

A pesar de que los loci del segundo grupo son los más polimórficos, no son los más usados en identificación forense puesto que al poseer alelos que difieren en un número incompleto de repeticiones, y a veces intercaladas entre otras normales, requieren un análisis muy preciso y por lo tanto poco práctico. Los loci del primer grupo presentan alelos que difieren en una unidad de repetición aunque existen algunos loci como el HUMTH01 en el que alguno de sus alelos difieren en una repetición incompleta. Estos alelos son el 8.3, 9.3 y 10.3 y consisten en 8, 9 y 10 repeticiones AATG respectivamente más un trinucleótido ATG. De estas tres variantes alélicas la más frecuente es el 9.3 por lo que parece probable que las otras dos variantes pudieran surgir por delección o inserción de una repetición completa del alelo 9.3 originando los alelos 8.3 y 10.3 respectivamente (Brinkmann, 1996).

Los STR más utilizados son los tri, tetra y pentanucleotídicos, ya que los dinucleotídicos presentan bandas sombra o tartamudas ("stutter bands") como consecuencia de la amplificación.

La utilización del ADN microsatélite presenta grandes ventajas frente a los sistemas anteriormente mencionados.

- La aplicación de la técnica de PCR, permite obtener varios millones de copias de un fragmento determinado de ADN en un tiempo de 2 o 3 horas, permitiendo analizar muestras cuya cantidad de ADN es escasa.
- El tamaño de los productos amplificados es pequeño (100-500 pb) de forma que es posible obtener resultados a partir de ADN sumamente degradado cuyos fragmentos son de aproximadamente 1000 pb.
- El tiempo necesario para completar los análisis es muy corto, por la técnica empleada, que además es más sencilla que la utilizada para el ADN minisatélite y con un coste más reducido.
- Los sistemas STRs revelan alelos definidos con precisión, es decir, son variables discretas, esto permite simplificar el análisis estadístico de las frecuencias alélicas en las poblaciones, y por otro lado es mucho más fácil la estandarización y la comparación de los resultados entre los diferentes laboratorios.

El uso de tecnología automatizada basada en fluorescencia para la detección de loci AmpFLP y STR ha sido descrita recientemente (Schwart et al., 1992; Ziegle et al., 1992; Sullivan et al., 1992). Este sistema incorpora la medición de tamaños de los productos de PCR y elimina las diferencias en la

movilidad electroforética entre las calles del gel ya que incorpora marcadores de tamaño internos con cada muestra.

El pequeño tamaño de las unidades amplificadas sugiere que pueden estudiarse simultáneamente varios loci mediante amplificación PCR multiplex y análisis con identificación precisa de los alelos en geles de secuenciación de ADN. La precisión, sensibilidad y rapidez de detección de los alelos mediante PCR ofrece la oportunidad de su investigación en especímenes forenses. La fidelidad de amplificación de los STRs triméricos y tetraméricos indica que el tipaje genético puede ser fácilmente interpretado y susceptible de automatización. Por todo ello, la combinación de multiplex STR-PCR y la detección fluorescente automatizada resultan en una técnica rápida y poderosa para la obtención de perfiles de ADN.

LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS STRs QUE SE HAN ELEGIDO EN ESTE ESTUDIO SE REFLEJAN EN LA SIGUIENTE TABLA:

Locus-Specific Information				
STR Locus	Fluorescent Label	Chromosomal Location	GenBank® Locus and Locus Definition	Repeat Sequence 5'-->3'
Penta E	FL	15q	NA	AAAGA
D18S51	FL	18q21.3	HUMUT574	AGAA
D21S11	FL	21q11-21q21	HUMD21LOC	TCTA Complex
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01, Human tyrosine hydroxylase gene	AATG
D3S1358	FL	3p	NA	TCTA Complex
FGA	TMR / Red™-X	4q28	HUMFIBRA, Human fibrinogen alpha chain gene	TTTC Complex
TPOX	TMR/ Red™-X	2p23-2pter	HUMTPOX, Human thyroid peroxidase gene	AATG
D8S1179	TMR/ Red™-X	8q	NA	TCTA Complex
vWA	TMR/ Red™-X	12p12-pter	HUMVWFA31, Human von Willebrand factor gene	TCTA Complex

Amelogenina	TMR/ Red™-X	Xp22.1-22.3 and Y	HUMAMEL, Human Y chromosomal gene for Amelogenin-like protein	NA
Penta D	JOE	21q	NA	AAAGA
CSF1PO	JOE	5q33.3-34	HUMCSF1PO Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene	AGAT
D16S539	JOE	16q24-qter	NA	GATA
D7S820	JOE	7q11.21-22	NA	GATA
D13S317	JOE	13q22-q31	NA	TATC
D5S818	JOE	5q23.3-32	NA	AGAT

A la hora de seleccionar un STR para uso forense se requiere que éste cumpla una serie de características como son (Budowle, 1997):

- una alta heterocigosidad
- una tasa de mutación baja
- que no origine artefactos durante la amplificación tales y como bandas sombra
- fácilmente amplificable
- de pequeño tamaño y,
- fácilmente coamplificable junto a otros STR.

Los STR analizados en el presente trabajo han sido analizados mediante PCR multiplex con el kit de Promega PowerPlex™ 16 y otro marcador como la amelogenina que no es un STR y que sirve para la determinación del sexo en una muestra de ADN. Este locus llamado amelogenina es un fragmento del gen que codifica para la amelogenina humana y que se localiza en los cromosomas sexuales. El producto de amplificación resultante depende del diseño de los primers usados, originándose en el caso de muestras de ADN masculino dos fragmentos de distinto tamaño y en el caso de ADN femenino dos fragmentos idénticos.

Una vez que los STR han sido amplificados se procede al tipaje o asignación de alelos para lo cual existen dos métodos:

- electroforesis en geles de poliacrilamida** y posterior tinción con nitrato de plata,
- electroforesis capilar** y asignación de alelos automatizada a través de un software.

Los loci STR analizados en este trabajo han sido tipados por electroforesis capilar.

Las principales ventajas que ofrece el análisis de los STR frente a los VNTR son:

- Al ser fragmentos de pequeño tamaño (menores de 400 pb) son menos susceptibles a la degradación de manera que es posible obtener resultados a partir de ADN sumamente degradado.
- Poseen alelos discretos, lo cual permite simplificar el análisis estadístico de las frecuencias alélicas en las poblaciones por un lado, y por otro facilitar la interpretación de los resultados al migrar cada alelo a una longitud determinada.
- El tiempo consumido se reduce considerablemente si comparamos con los VNTR y más aún si consideramos los últimos avances en electroforesis capilar.

2.2.2.3- Clasificación de polimorfismos de ADN.

Se podrían realizar varias clasificaciones de los polimorfismos de ADN atendiendo a diferentes factores. Uno de ellos es en función de los cambios en la secuencia: así, los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición. Pueden dividirse en 2 tipos:

Polimorfismos de Secuencia. Se producen por el cambio de uno (mutación puntual) o más nucleótidos en una secuencia de ADN. Suelen ser poco polimórficos y son típicos del ADN expresivo. Se dividen en:

- Transiciones: sustitución de una purina por otra purina, o bien, una pirimidina por otra pirimidina: (A/G o T /C).
- Transversiones: sustitución de una purina por una pirimidina, o viceversa.

Polimorfismos de Longitud. Se producen por la inserción (ganancia de uno o mas nucleótidos) o delección (perdida de uno o más nucleótidos). Este tipo es el más abundante en ADN repetitivo, sobre todo en el ADN mini y microsatélite.

Hay una amplia lista de polimorfismos amplificables por PCR tal y como veremos a continuación:

- **AMPFLPs.** Los loci minisatélites que pueden ser amplificados por PCR se denominaron AMPFLPs (AMPlified Fragment Length Polymorphisms). Generalmente tienen unidades de repetición largas en múltiples copias y fragmentos alélicos de alto peso molecular. A pesar de los buenos resultados, los productos de amplificación son de un tamaño relativamente grande, lo que puede constituir un factor limitante cuando las muestras se encuentran degradadas.

- **MVR.** Los minisatélites, poseen dos tipos de variación, una debida a la longitud (dependiendo del número de repeticiones, VNTRs) y otra ocasionada por diferencias en la unidad de repetición, lo que se denomina MVR.

- **MICROSATÉLITES.** Son secuencias pequeñas de ADN repetidas en tándem (STRs), constituidas por unidades de 2 a 7 pb que se repiten un número variable de veces y que dan lugar a alelos de tamaño aproximado entre 80 y 400 pb. Su gran utilidad se puso rápidamente de manifiesto debido a su abundancia, distribución bastante regular por el genoma, naturaleza polimórfica y su pequeño tamaño, que los hace idóneos para ser amplificados por PCR.

Otros polimorfismos de ADN

En los últimos años la Comunidad Científica internacional ha dedicado tiempo y esfuerzo en la incorporación de **polimorfismos del Cromosoma Y**, a la rutina forense. Actualmente se analizan fundamentalmente haplotipos de STRs (Roewer et al 1992, Kayser et al 1997, de Knijff et al 1997).

Los microsatélites de cromosoma Y han irrumpido con fuerza en el panorama de los marcadores genéticos de uso forense, debido a sus importantes aplicaciones en un tipo de pericias muy definido.

La característica clave en el análisis del cromosoma Y radica en el tipo especial de herencia ya que esta es paterna.

El polimorfismo de secuencia de la región control del ADNmt tiene también importantes aplicaciones en Genética Forense (Gill et al 1994).

La dotación mitocondrial es haploide y se hereda exclusivamente por vía materna, lo que facilita el análisis de divergencias de secuencias, aunque esta misma propiedad hace que este ADN no sea útil para el estudio biológico de la paternidad.

El ADNmt tiene ciertas analogías con el cromosoma Y en cuanto a la herencia. En la figura aparece el modelo seguido de herencia de ambos.

vestigios mínimos o degradados u otras muestras (como esperma, saliva, pelos o cabellos sin bulbo, fragmentos óseos, etc) en las que las técnicas convencionales proporcionan resultados muy poco satisfactorios. Están siendo de gran ayuda principalmente en delitos contra la libertad sexual, en los que, ante la negativa del presunto culpable, no suele existir más indicio incriminatorio que el proporcionado por posibles restos de esperma en prendas de vestir y cavidades corporales.

Los polimorfismos de ADN aportan al análisis criminalístico la posibilidad de diferenciar fácilmente muestras compuestas por mezclas de fluidos procedentes de distintos individuos (Evelt et al 1991) y, en el caso particular de agresiones sexuales, permiten separar el ADN de células vaginales del ADN espermático (Gill et al 1987).

-Identificación genética

La identificación de cadáveres y restos óseos sólo era posible por medio de la antropología física y la odontología forense hasta la aparición de los polimorfismos de ADN.

Diversos estudios han demostrado la utilidad de la amplificación del ADN mediante PCR en la identificación de cadáveres humanos. Aún en restos muy antiguos es posible analizar ADNmt o STRs partiendo, por ejemplo, de piezas dentarias o fragmentos óseos. La comparación con el ADN obtenido de muestras de sangre de algún ascendiente o descendiente indubitado (preferiblemente de los progenitores) suele ser suficiente para establecer una relación de parentesco.

2.2.2.4. Origen genético de los polimorfismos en ADN repetitivo

Según el tamaño de la unidad de repetición, los polimorfismos de las secuencias repetitivas pueden deberse a diferentes mecanismos genéticos. En loci **microsatélites** las tasas de mutación en la línea germinal presentan variaciones considerables que pueden alcanzar niveles de hasta 8×10^{-3} . En las repeticiones de tetranucleótidos se sabe que se forman alelos de nueva longitud sin que haya intercambio de los marcadores flanqueantes, lo cual implica que éstos no se originan por entrecruzamiento desigual. Parece que el mecanismo más probable para explicar la variación del tamaño es una forma de intercambio de información de secuencia que comienza con un apareamiento incorrecto por deslizamiento (Strachan, 1999).

Este fenómeno ocurre cuando en el apareamiento de las dos hebras complementarias las secuencias repetidas de ambas hebras se reconocen pero no se aparean con la que ocupa la posición correcta en la hebra complementaria. Esto provoca un “deslizamiento” de una hebra sobre la otra que da lugar a un apareamiento incorrecto. Aunque este mecanismo puede ocurrir tanto en ADN replicante como no replicante, parece más probable que ocurra en el replicante y en este caso a dicho mecanismo se denomina

deslizamiento replicativo. La replicación con deslizamiento es responsable de deleciones y duplicaciones debido al apareamiento entre repeticiones no contiguas y se ha sugerido que constituye un mecanismo importante de evolución de secuencias de ADN y del genoma en general.

En loci **satélites y minisatélites** los polimorfismos de longitud pueden originarse como consecuencia de un **intercambio desigual entre cromátidas hermanas**. El mecanismo consiste en una forma de recombinación en la que el entrecruzamiento afecta a secuencias no alélicas situadas en cromátidas hermanas. Tiene lugar preferentemente en posiciones en las que los bloques de secuencias repetidas en tándem son de tamaño moderado o grande. Si los cromosomas se rompen y se reúnen mientras las cromátidas están unidas por apareamientos incorrectos de este tipo aparecerá una inserción o una deleción de una unidad de repetición completa. Una de las cromátidas quedará con una inserción y la otra con una deleción ya que el intercambio es recíproco.

Otro tipo de mecanismos genéticos que parecen implicados en la generación de polimorfismos en secuencias de ADN repetidas en tándem son las **reacciones de conversión génica**. La conversión génica consiste en una transferencia no recíproca de información entre un par de secuencias no alélicas de ADN (conversión génica interlocus) o entre secuencias alélicas (conversión génica interalélica). En este proceso una de las secuencias, denominada secuencia dadora, permanece inalterada mientras que la otra (secuencia aceptora) gana alguna secuencia procedente de la dadora. En una primera etapa se produciría la formación de un heterodúplex entre una hebra de ADN del gen dador y la hebra complementaria del gen aceptor. Seguidamente se produciría la conversión de un fragmento del gen aceptor mediante el mecanismo de reparación de apareamientos incorrectos, mecanismo enzimático basado en enzimas reparadoras que reconocen una zona mal apareada en un heterodúplex y la reparan base a base (Strachan, 1999).

Las mutaciones de la línea germinal pueden estudiarse detectando y caracterizando alelos minisatélite mutantes en gametos aislados. Para ello se hace una PCR de múltiples diluciones de alícuotas de ADN (cada una con unas 100 moléculas) extraído a partir de esperma humano. Los productos de PCR obtenidos a partir de cada alícuota permiten identificar cualquier nueva mutación de un tamaño lo suficientemente distinto del alelo progenitor como para poder definirla como un alelo nuevo (Monckton et al, 1994).

Parece que la mayoría de las mutaciones que ocurren en los loci implican ganancia de unos pocos elementos en un extremo del bloque de secuencias repetidas. Existe una desviación hacia la ganancia neta de elementos repetidos y las evidencias apuntan a la existencia de intercambios de secuencia no recíprocos entre alelos, lo cual sugiere una conversión génica interalélica.

2.3- TÉCNICAS DE ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL ADN

2.3.1- Evolución de las técnicas de ADN utilizadas en identificación.

La Hemogenética Forense nace a principios de siglo, cuando Karl Landsteiner describe el sistema ABO de los hematíes y Von Dürgen y Hirschfeld descubren su transmisión hereditaria. Esta ciencia surgió como una rama de la Criminalística cuyo objetivo era la identificación genética tanto en casos de investigación criminal como en estudios biológicos de la paternidad. Inicialmente, las investigaciones se centraban en el estudio de antígenos eritrocitarios (sistema ABO, Rh, MN), proteínas séricas, enzimas eritrocitarias y sistema HLA. Con el estudio de dichos marcadores podía incluirse o excluirse una persona como posible sospechoso por poseer una combinación genética igual o diferente a la del vestigio biológico hallado en el lugar de los hechos.

Pero fue a mediados de siglo cuando gracias al descubrimiento del ADN y de su estructura y al posterior avance en las técnicas de análisis de dicha molécula la Hemogenética Forense evolucionó considerablemente hasta el punto de que hoy en día puede hablarse de una nueva subespecialidad dentro de la Medicina Forense: la Genética Forense. Dicha ciencia estudia básicamente unas regiones del ADN que presentan variabilidad entre los distintos individuos, es decir, estudia regiones polimórficas del ADN. Así, analizando un determinado número de regiones polimórficas, la probabilidad de que dos individuos sean genéticamente iguales es prácticamente nula (excepto en el caso de gemelos univitelinos).

Aunque la Ciencia poseía las herramientas necesarias para el estudio del ADN, su aplicación en la resolución de casos judiciales no se produjo hasta 1985, cuando el Ministerio del Interior Británico solicitó la ayuda de Alec J. Jeffreys, profesor de Genética de la Universidad de Leicester. Los primeros casos de Criminalística fueron resueltos gracias a la técnica de los RFLPs (fragmentos de restricción de longitud polimórfica). Jeffreys descubrió la existencia de unas regiones minisatélites hipervariables dispersas por el genoma humano que al ser tratadas con enzimas de restricción generaban fragmentos de longitud variable. Estudios posteriores realizados el mismo Jeffreys demostraron que las diferencias en el tamaño de estos fragmentos se debían a que estas regiones consistían en un determinado número de repeticiones en tándem de una secuencia central, el cual variaba de unos individuos a otros.

2.3.1.1- Técnicas de análisis de fragmentos de restricción de longitud polimorfita (RFLP)

Esta técnica consistía básicamente en “cortar” el ADN utilizando lo que se denominan **enzimas de restricción**, que son unas proteínas que tienen la capacidad de reconocer secuencias de ADN específicas (secuencias diana) y cortar el ADN generando fragmentos de diferentes tamaños. El origen de dichas variaciones puede deberse a dos hechos:

- En primer lugar, la mutación (o cambio) de un nucleótido por otro en una región que actúe como secuencia diana para la enzima de restricción originará un fragmento de mayor tamaño al no reconocer la enzima dicha secuencia. Variaciones debidas a dichos cambios se denominan **polimorfismos mutacionales**.
- O puede que las variaciones se deban a la inserción o deleción de una secuencia dentro del fragmento que es cortado por la enzima de restricción en cuyo caso se denomina **polimorfismo de longitud o de inserción-deleción**.

La técnica utilizada en el estudio tanto de los RFLPs como de los primeros VNTRs se denomina hibridación con sondas o Southern blot y, de manera resumida consta de las siguientes etapas:

1. **Digestión** del ADN con enzimas de restricción tras conseguir extraer un ADN de alta molecularidad.
2. Separación de los fragmentos obtenidos por medio de una **electroforesis** en gel de agarosa.
3. **Desnaturalización** de los fragmentos separados y cortados.
4. **Transferencia** de las cadenas simples a una membrana de nitrocelulosa o nylon y fijación de las mismas por medio de calor (80°C).
5. **Prehibridación** con sondas de ADN inespecífico para bloquear los lugares de unión inespecíficos que pudiera haber en la membrana.
6. **Marcaje de la sonda** con nucleótidos radioactivos (^{32}P normalmente).
7. **Hibridación** de la sonda marcada y desnaturalizada con los fragmentos de ADN fijados a la membrana, y lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda o aquellas que hayan hibridado mal.
8. **Revelado** en placa radiográfica e **interpretación** de los resultados.

El tipo de sondas utilizadas puede ser de dos tipos:

- **Sondas Mono-locus (SLP):** son específicas para una región de un determinado cromosoma. Se unen a secuencias largas de nucleótidos y presentan mayor variabilidad que las sondas multi-locus. Como resultado se observan una o dos bandas por individuo, según sea homocigoto o heterocigoto. El patrón de bandas obtenido con estas sondas se denomina perfil unilocus de ADN o “DNA profiling”

- **Sondas Multi-locus (MLP):** hibridan con secuencias minisatélites presentes en varios loci de diferentes cromosomas. Son sondas de 10 a 15 nucleótidos que se repiten múltiples veces y tras el revelado se observan de 10 a 20 bandas por persona. Este patrón de múltiples bandas se conoce como huella genética multilocus o “DNA fingerprint”.

A pesar de que el análisis SLP y MLP ha sido y es bastante útil en estudios de paternidad no puede decirse lo mismo de su aplicación a la Criminalística ya que presenta una serie de inconvenientes como son:

- La **cantidad de ADN** que se necesita está entre 20 y 100 ng, cantidad difícil de conseguir en casos de criminalística en los que los indicios biológicos encontrados son mínimos.
- En cuanto a la **calidad del ADN**, en la práctica forense es muy difícil encontrar en estado no degradado toda la cantidad de ADN que se necesita para un análisis con sondas mono-locus.
- El **tiempo** requerido para este tipo de análisis es de dos o tres días.
- **Especificidad entre especies:** Las sondas Multilocus permiten su uso sobre el ADN humano y de cientos de animales superiores, mientras que las Monolocus son exclusivas de ADN humano.
- **Información aportada:** Las sondas Multilocus tienen una mayor capacidad discriminativa al aparecer múltiples bandas. No obstante, las Monolocus son más específicas ya que el fragmento de ADN con el que hibridan es de menor tamaño.
- El hecho de que se requieran cantidades elevadas de ADN hacen que normalmente, con el primer análisis se consume la totalidad de la muestra, con lo que se dificultan contrapericias y una posterior revisión del caso.

Todas estas limitaciones fueron superadas gracias a la aplicación en Genética Forense de una técnica, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (“PCR”), que supuso una revolución en muchos campos de la Biología y de la Medicina.

2.3.2- ANÁLISIS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como **PCR** por sus siglas en inglés, **Polymerase Chain Reaction**) permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquáticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C). A esta temperatura dicha enzima es capaz de mantener una media de extensión de más de 60 nucleótidos por segundo en regiones ricas en uniones G-C. La temperatura óptima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN.

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos (Mullis K, 1990; Vosberg HP et al, 1989):

DESNATURALIZACIÓN:

Para que se produzca la reacción es necesario que tengamos el ADN Template en forma de cadenas sencillas que actúen de molde para la formación de una hebra complementaria. La desnaturalización se consigue elevando la temperatura del tubo de reacción hasta los 90-95° C, con lo cual se produce una ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y la separación de las cadenas de ADN. Esta temperatura se debe mantener un tiempo suficiente para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra. Posteriormente debe pasarse lo antes posible a la fase de anealing, ya que mantener temperaturas altas no beneficia y puede afectar la actividad de la polimerasa en la reacción.

UNIÓN DE LOS PRIMERS AL ADN TEMPLATE:

Esta fase se conoce como anealing ó emparejamiento. Una vez conseguida la desnaturalización se produce una disminución de la temperatura

hasta Los 40- 60 °C para que se pueda producir la unión de los primers a la secuencia específica del Template.

La temperatura de anealing dependerá de varios factores y es relativamente específica para cada primer. Entre los factores que destaca la longitud de los oligonucleótidos que lo forman y su contenido en uniones G-C. Como ejemplo, se considera que una temperatura de 55 grados C es la adecuada para primers de 20 nucleótidos con un 50 % de G-C. No obstante cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de anealing específica, ya que si la temperatura es muy baja la unión al Template se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.

El tiempo de anealing es muy bajo debido al exceso de primer existente en la mezcla de reactivos, evitando así la formación de uniones inespecíficas.

EXTENSIÓN:

En este tercer paso del ciclo la polimerasa va uniendo nucleótidos al extremo 3' del primer utilizando como patrón la cadena de ADN Template previamente desnaturalizada y a la que se han unido los primers.

Como se ha apuntado, el rango de temperaturas en el que puede trabajar la Taq es muy amplio, aunque su actividad también varía con la temperatura. Su mayor actividad está entre los 72 - 74 grados C, lo cual implica que ha de producirse una elevación desde las bajas temperaturas del anealing hasta las de la extensión.

Entre los factores que influyen sobre la temperatura y el tiempo de extensión destaca la longitud del fragmento de ADN Template que se va a copiar. Como una aproximación general se ha dicho que debe mantenerse durante un minuto por cada Kilobase de secuencias, aunque en la mayoría de las ocasiones esta cifra suele ser excesiva y debemos ajustarlo a la baja para cada marcador, e incluso si el fragmento a sintetizar es inferior a 150 pb puede ser eliminado completamente el tiempo de extensión.

Existe un punto importante en el transcurso de las diferentes fases de los ciclos, el **TIEMPO DE RAMPA**. Es el tiempo invertido en cambiar de una temperatura a otra. Depende del equipo usado, consiguiéndose con la incorporación de la última generación de Termocicladores que sea realmente mínimo.

Salvo algunas notables excepciones, la tasa de variación de la temperatura no es importante, y cuanto más rápida sea la rampa más corto será el tiempo del ciclo, de hecho para conseguir el tiempo mínimo, al diseñar el ciclo se hace con tiempo de rampa teórico igual a cero.

FASE DE MESETA O PLATEA:

No se trata de un ciclo más de la reacción, aunque es algo común a todas ellas si se dejan desarrollar durante un número de ciclos suficiente, por lo que podríamos considerarlo como un final común a todas las PCR que puede llegar a "adelantarse" y ser motivo de artefactos y errores de la REACCIÓN.

Aunque en unas circunstancias no limitadas por la existencia de unas determinadas condiciones químicas la reacción podía ser infinita,, en la práctica no lo es, y tras un número determinado de ciclos la amplificación el fragmento diana que ha venido llevando un crecimiento exponencial, comienza gradualmente a detenerse, acumulándose y entrando en una fase estacionaria o de meseta, también conocida como plateau.

El momento en el que la PCR alcanza esta fase depende de:

- **Número de copias presentes originalmente en la muestra.**
- **Cantidad total de ADN sintetizado.**

También existen otras causas menos frecuentes que pueden hacer que la meseta aparezca en un momento demasiado cercano al inicio de la reacción, estas pueden ser:

EXCESO DE SUSTRATO

En este caso hay más ADN que Taq capaz de replicarlo en el tiempo de extensión asignado. Esta situación puede solucionarse aumentando el tiempo de extensión y/o aumentando la cantidad de enzima, aunque no suele ser muy útil en la práctica debido a que cada ciclo sucesivo requeriría el doble de tiempo de extensión y/o de polimerasa para continuar con el crecimiento exponencial.

PRESENCIA DE PRODUCTOS NO ESPECÍFICOS

Esta situación está estrechamente relacionada con la anterior. En este caso los fragmentos de ADN inespecíficos compiten con los específicos por la acción de la polimerasa. Este problema puede ser reducido aumentando la especificidad de la reacción, con lo cual las secuencias inespecíficas no se amplifican, disminuyendo su proporción en ciclos sucesivos.

REASOCIACIÓN DE FRAGMENTOS UNICATENARIOS

Puede ocurrir que muchos de los productos sintetizados en la PCR se asocien entre sí antes de que los primers ya unidos sean extendidos. La causa de este problema no está completamente establecida, aunque se piensa que pueda ser debida a una migración y desplazamiento del primer o a un problema de síntesis de la polimerasa. Esta limitación se produce habitualmente cuando la concentración de productos se acerca a los 10 pico

gramos por 100 ul, resultando difícil de evitar a excepción de realizar una dilución de la reacción.

En la mayoría de los casos el plateau es una limitación inherente e inevitable de la PCR, pero afortunadamente (salvo alteraciones en los primers, dNTPs o polimerasa), cuando este se produce ya se ha conseguido una cantidad suficiente de ADN para nuestro objetivo.

Como se puede deducir de lo anteriormente expuesto, son múltiples los factores que pueden influir en las condiciones generales de la amplificación, lo cual dificulta en algunas ocasiones la investigación, pero también posibilita y permite una gran maniobrabilidad para alcanzar las condiciones ideales a cada sistema y a cada tipo de análisis.

No obstante, el resultado analítico no sólo está en el aspecto físico o térmico-temporal de las fases de cada ciclo, sino que bioquímicamente las variaciones estequiométricas también redundarán en variaciones del resultado de la reacción. **Desde el punto de vista estioquiológico la reacción está compuesta por los siguientes elementos:**

- Buffer de amplificación.
- dNTPs.
- Primers.
- Taq Polimerasa.
- ADN Template.
- Volumen final.

2.3.2.1 - Componentes de la PCR.

BUFFER DE AMPLIFICACIÓN

Se han descrito múltiples soluciones con elementos comunes, pero con algunas variaciones para tratar de conseguir mejores resultados en determinados campos.

En nuestro caso hemos empleado un buffer comercial 10X que contiene, KLC, Tris-CLH, MgCl₂ y Gelatina.

De todos los componentes, el que más influye sobre la especificidad y rendimiento de la amplificación es el cloruro de magnesio. Concentraciones de alrededor de 1'5 mM son óptimas (empleando 200 uM de cada DNTP), pero en algunas circunstancias puede ser necesario probar con diferentes cantidades de magnesio. Generalmente un exceso de dicho ión originará una acumulación de productos de amplificación no específicos, y una cantidad insuficiente reducirá el rendimiento de la reacción.

Algunos protocolos han incluido recientemente un 10 % de dimetil-sulfóxido (DMSO), el cual reduce la estructura secundaria del ADN que se va a amplificar, aunque algunos autores han comprobado que el DMSO puede

inhibir ligeramente la Taq polimerasa y disminuir el rendimiento general de la reacción.

PRIMERS

Dejando al margen las cuestiones sobre la síntesis de los primers correctos, existen otros factores relacionados con el uso de unos determinados primers para amplificar un fragmento concreto de ADN.

La mayoría de los primers tienen una longitud entre 20 y 30 bases, aunque se pueden sintetizar y utilizar primers más largos y más cortos para algunos casos específicos. También es posible durante su síntesis incorporarle alguna secuencia no complementaria al ADN Template en su extremo 5' la cual se incorpora al ADN resultante de la amplificación y posteriormente puede utilizarse (según el objetivo pretendido) como una diana de restricción o como un elemento regulador situado al final de la secuencia amplificada.

En algunas ocasiones, durante la amplificación se forman unos artefactos denominados "*dímeros de primers*", especialmente cuando se llevan a cabo un gran número de ciclos sobre una muestra que contiene una cantidad pequeña de copias de ADN Template. Estos artefactos consisten en fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de la de los primers, y parece que se producen cuando un primer es extendido a continuación del otro. El resultado es un patrón extraordinariamente eficiente para la PCR, que puede, (si se produce durante los primeros ciclos), inundar la reacción desplazando al resto del template y ser el producto predominante.

El mecanismo exacto por el que se forman estos dímeros no está completamente determinado. La observación de que primers con los extremos 3' complementarios favorecen su formación sugiere que el paso inicial se debe a interacciones transitorias que aproximan los extremos complementarios. Algunas polimerasas, incluida la Taq, han mostrado una débil actividad polimerizadora no dirigida por un ADN patrón, la cual puede unir nucleótidos adicionales al doble extremo apareado. Si esta actividad puede producirse sobre una hebra sencilla de oligonucleótidos, resultaría una buena oportunidad para que la extensión formara un corto solapamiento en el extremo 3' con el otro primer, suficiente para promover la formación del dímero.

El modo de evitar la formación de estos dímeros sería utilizando concentraciones mínimas de primers y de enzima (Taq), así como utilizar primers bien diseñados, evitando que haya complementariedad entre sus extremos 3'.

La cantidad ideal de primers también oscila entre unos amplios límites, lo cual permite variarla para encontrar las condiciones ideales en cada caso, aunque por lo general y salvo casos muy específicos, se suele emplear la misma, o con oscilaciones muy pequeñas.

A la hora de elegir unos primers para amplificar un determinado

fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

- La **longitud de cada uno de los primers** debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que primers de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad.
- Ambos primers deben tener una T_m similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5 ° C).
- La **relación bases púricas: bases pirimidínicas** debe ser 1:1 (o como mucho 4060%).
- La **secuencia de los primers** debe comenzar y terminar con 1-2 bases p úricas.
- Para evitar la formación de **dímeros de primers** es necesario comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre sí.

DESOXINUCLEOTIDOS TRIFOSFATOS (dNTPs)

Normalmente se suelen utilizar a una concentración que oscila entre 50 y 200 μM de cada uno (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Concentraciones más altas pueden inducir a incorporaciones erróneas por la polimerasa. Con dichas cantidades se pueden sintetizar aproximadamente 6,15 y 25 μg de ADN, respectivamente.

La concentración de dNTPs debe estar relacionada con la de cloruro de magnesio, ya que el magnesio se une a los dNTPs, y por lo tanto la cantidad de dNTPs presentes en la muestra determinará la cantidad de magnesio libre disponible; es decir, si se produce una modificación significativa en la concentración de nucleótidos, debemos realizar una corrección de la cantidad de Cloruro de Magnesio a aportar a la reacción.

TAQ POLIMERASA

Ya se analizaron sus características, origen y repercusión para la automatización y difusión de la técnica. Debe recordarse, no obstante, su importancia no sólo en el aspecto técnico, sino en las posibilidades de la tecnología en sí, ya que su uso supuso aumentar la especificidad y el rendimiento final de la reacción debido a las altas temperaturas a la que puede ser usada, aumentando de este modo el nivel de exigencia.

Las cantidades más adecuadas para la síntesis de ADN genómico oscilan entre 1 y 4 unidades por 100 μl ., Aumentando su cantidad por encima de este nivel se pueden producir una gran cantidad de productos no-específicos y una reducción del ADN diana deseado.

La actividad de la Taq es sensible a la concentración del ión magnesio, así como a la concentración y naturaleza de los iones monovalentes. Vemos,

pues, como todos los elementos de la reacción están relacionados, ya que antes hemos estudiado la interrelación entre el magnesio y los dNTPs, que a su vez influye sobre la actividad polimerizadora de la enzima, inhibiéndola tanto las concentraciones elevadas de Mg como las de dNTPs.

Por lo contrario, pequeñas concentraciones de KC1 estimulan la actividad sintética de la Taq en un 50-60 %, con un máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Cifras más altas comienzan a inhibirla. Se han estudiado multitud de compuestos químicos que pueden estimular o inhibir la actividad de la enzima, pero no se ha llegado a resultados concluyentes. No obstante resultan interesantes algunos datos relacionados con productos que habitualmente se emplean en diferentes pasos de la metodología del ADN. Así se ha comprobado como un 10 % de etano no llega a inhibir la Taq, y la presencia de urea a una concentración 1,0 M estimula su actividad. Por otra parte el SDS a bajas concentraciones produce una inhibición, pero puede ser reversible utilizando concentraciones elevadas de algunos detergentes no iónicos.

A pesar de los múltiples estudios realizados sobre la Taq, quedan muchas preguntas y dudas relacionadas con su estructura y función por resolver. Los estudios actuales van destinados a resolverlas para conseguir un mayor conocimiento de sus propiedades enzimáticas, bioquímicas y estructurales en relación con su termo estabilidad; todo ello nos conducirá a mejorar la especificidad, el rendimiento, la posibilidad de sintetizar fragmentos más largos y a incrementar la sensibilidad para detectar una determinada diana en el genoma.

Actualmente nos encontramos con una nueva generación de polimerasas termoestables para ser aplicadas en la PCR, una vez superadas las dificultades técnicas para su extracción y purificación posterior.

ADN TEMPLATE

Se trata del ADN presente en la muestra y del cual queremos amplificar por medio de la PCR un determinado fragmento franqueado por los primers.

La cantidad de ADN en la muestra puede variar, pero habitualmente debe contener entre 10^2 y 10^3 copias de Template (0,1 μ g de ADN genómico humano).

La cantidad de ADN es importante, ya que habitualmente se utilizan unas cantidades estándar de reactivos relacionados con dicha concentración; cuando esta varía, por exceso o por defecto, pueden surgir problemas que afecten al resultado de la amplificación. Este problema es especialmente importante en Criminalística, debido a que una gran parte de las muestras son indicios de los que extraemos el ADN que actuará como Template y por lo tanto la cantidad de este variará enormemente de unos casos a otros dependiendo de una gran cantidad de factores relacionados, fundamentalmente, con el indicio en sí y con el método de extracción. Esto obliga a realizar una cuantificación para conocer la concentración de ADN que disponemos y hacer

los cálculos necesarios para emplear en la reacción la concentración adecuada al resto de los reactivos, evitando artefactos y problemas por exceso o defecto de ADN Template.

Los principales problemas relacionados con estos elementos pueden derivarse de:

Presencia de CONTAMINANTES que inhiban o afecten a alguno de los pasos de la reacción; principalmente suelen actuar sobre la Taq.

CANTIDAD DE ADN INAPROPIADA. Como hemos apuntado puede ser por defecto, favoreciendo la formación de dímeros de primers; o por exceso, lo cual adelanta la aparición del plateau por exceso de sustrato o por competición entre los productos no específicos de la PCR.

Estos artefactos, aunque no siempre impiden que se lleve a cabo la reacción, sí dificultan su interpretación y rendimiento, a veces en grado suficiente como para que tengamos que repetirla.

Calidad del ADN: cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo; por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa.

Si el ADN está **degradado** por la acción de enzimas de restricción, el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no.

En el caso en el que tengamos ADN **sin degradar** pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR. El problema de las cantidades mínimas de ADN y la presencia de contaminantes o inhibidores de la Taq es un hecho habitual en Criminalística y requiere un estudio pormenorizado de la muestra antes de la amplificación.

ADYUVANTES DE LA PCR

Son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR. Aunque algunos autores han recomendado el uso del **DMSO** y del **glicerol**, el adyuvante más extendido y utilizado es el **BSA**. A concentraciones por encima de 0.8 µg/µl el BSA incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como una proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la Taq polimerasa.

Aparte de la o las muestras que van a ser amplificadas, es muy importante incluir en la PCR un control negativo y un control positivo.

- El **control negativo** llevaría todos los componentes de la PCR excepto

el ADN. En esta muestra, por tanto, no debemos obtener ningún resultado de amplificación, en caso contrario significaría que alguno de los componentes puede estar contaminado con ADN y, por tanto, los resultados obtenidos para nuestras muestras no serían fiables.

•El **control positivo** es una muestra de ADN cuya concentración es conocida, además también es conocido el resultado que debe salir, por lo que nos indica si la amplificación ha funcionado bien o no. En la práctica del video hemos utilizado un ADN comercial llamado K562, este ADN procede de una línea celular tumoral de mujer y su concentración es de 20 ng/ l. En el mercado existen otros ADN control de concentraciones variables, pero los kits para identificación genética suelen incluir uno.

MULTIPLEX PCR

Una de las ventajas que ofrece la PCR es que permite amplificar conjuntamente más de un marcador en una sola reacción, esto es lo que se conoce como "Múltiplex PCR".

En este tipo de PCR se añaden en un mismo tubo de amplificación los primers necesarios para amplificar 3, 4, 9 e incluso hasta 16 marcadores distintos. Para ello es necesario optimizar muy bien las condiciones de amplificación y obtener aquellas en las que todos los primers funcionen perfectamente. En caso contrario podríamos obtener muy buen resultado para unos marcadores pero no para otros.

Actualmente todos los laboratorios de Genética Forense trabajan con kits comerciales que incluyen todos los reactivos necesarios para amplificar conjuntamente una serie de marcadores. Con respecto a lo que sería amplificar uno a uno cada uno de los marcadores que se suelen utilizar, la múltiplex PCR ofrece una serie de ventajas:

1. **Ahorro de tiempo:** en el tiempo que se lleva hacer una sola reacción estamos obteniendo resultados para múltiples marcadores.
2. **Ahorro económico:** la cantidad de reactivos que se necesitan es menor, con lo que se abarata el coste total del análisis.
3. **Ahorro de muestra:** la cantidad de muestra que se requiere es menor que si hiciéramos las amplificaciones por separado, al ser una sola reacción el ADN se añade una sola vez. Este punto es muy importante en casos de muestras mínimas en los que la cantidad de ADN obtenida es muy pequeño y no nos daría para hacer varias reacciones de PCR.
4. El hecho de amplificar en una sola reacción permite que se aumente el número de marcadores estudiados, con lo que se **aumenta el poder de discriminación** del sistema.

2.3.2.2- Ventajas y desventajas del uso de la PCR en análisis de indicios biológicos.

Desde su aplicación práctica en 1989, la PCR ha supuesto una revolución en diversos campos de la Ciencia y de la Medicina, entre los que se encuentra la Genética Forense. El estudio de indicios biológicos por PCR ha permitido la resolución de un gran número de casos en Criminalística que hasta entonces eran desestimados por no poseer la suficiente cantidad de muestra para su análisis por RFLP. Con el uso de la PCR muestras tan mínimas como pueden ser un pelo con raíz, una minúscula mancha de sangre o semen e incluso caspa son suficientes en muchos casos para llevar a cabo un análisis de identificación genética.

La PCR ofrece una serie de ventajas, frente al uso de las técnicas de análisis genético utilizadas con anterioridad, como son (Devlin et al, 1990):

_ **Rapidez y sencillez** de la técnica: La PCR permite obtener copias de ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. Cada ciclo dura típicamente unos 3-5 minutos, por lo que la media de duración de una reacción típica estaría comprendida entre 90 y 150 minutos.

_ Elevada sensibilidad, es decir, su capacidad para obtener resultados en casos en los que la cantidad de ADN es **mínima**: actualmente es posible amplificar a partir de cantidades tan pequeñas de ADN como puede ser 1 ng.

_ Su capacidad para obtener resultados en casos en los que el ADN esté parcialmente **degradado**: la PCR permite es idónea para amplificar fragmentos de ADN de pequeño tamaño (como son los STR, recordar tema 3). En el caso de indicios biológicos en los que el ADN está parcialmente degradado, es probable que muchos de los STR, al ser de pequeño tamaño, no se encuentren degradados en todas las moléculas de ADN y por lo tanto, puede obtenerse un resultado de amplificación positivo.

_ Genera en un espacio corto de tiempo un **elevado número de copias** de la secuencia de ADN que es objeto de estudio, lo cual permite utilizar técnicas de visualización más sencillas y rápidas que el uso de sondas marcadas radiactivamente.

_ Permite la determinación y agrupación alélica en **clases discretas**, lo que facilita la elaboración de bases de datos al ser la estandarización inmediata y posibilitar la aplicación de métodos bioestadísticos y programas elaborados.

El uso de marcadores microsatélites de pequeño peso molecular aumenta las probabilidades de obtener resultados positivos de amplificación cuando el ADN se encuentra degradado ya que puede ser que dichos fragmentos no hayan sido digeridos. Esta ventaja es de gran importancia en Criminalística ya que normalmente los indicios biológicos encontrados han estado sometidos a diversos factores (calor y humedad) que favorecen el crecimiento bacteriano.

Paradójicamente, una de las grandes ventajas de la PCR que es su elevada sensibilidad puede, en ocasiones, convertirse en un gran problema ya que se podría coamplificar un ADN extraño o ajeno al que nos interesa aunque esté en pequeña cantidad.

No obstante, en los laboratorios de Genética Forense las medidas de precaución que se toman para evitar problemas de contaminación por manipulación son extremas; más aún cuando se trabaja con muestras mínimas (restos óseos, muestras antiguas, etc.) ya que en estos casos la presencia de ADN ajeno a la muestra podría interferir en la obtención del resultado, de tal manera que lo que se observe sea, bien el perfil del ADN contaminante o bien una mezcla de ambos perfiles (el de la muestra y el de la muestra o ADN contaminante).

2.3.2.3- Nuevas técnicas de PCR: PCR a tiempo real o cuantitativa (RT-PCR).

Los equipos de PCR a tiempo real permiten visualizar y cuantificar los productos de amplificación a medida que transcurren los ciclos de la PCR (de ahí el nombre de PCR a tiempo real).

Existen diversos equipos en el mercado para PCR cuantitativa, uno de ellos es el ABI PRISM 7000 de la casa Applied Biosystems.

Aunque en este método el fundamento de la PCR sigue siendo el mismo, existen algunas variaciones en cuanto al tipo de primers y la química que se utiliza.

Según la química utilizada existen principalmente **2 métodos**:

1. Método con Sondas Taqman
2. Método con SyBRGreen

Sondas Taqman.

Es el método más difundido. La sonda TaqMan, de un tamaño aproximado de 20-30 bases, tiene unido un **fluorocromo** (molécula que emite fluorescencia cuando es excitada por luz a una determinada longitud de onda) en posición 5' y un **amortiguador de fluorescencia** en posición 3' (molécula que absorbe la fluorescencia). Además, esta sonda está fosforilada en el extremo 3' para evitar su extensión durante la reacción de PCR.

Cuando la sonda se encuentra libre o unida al ADN antes de que comience la PCR, la fluorescencia que emite el fluorocromo (Reporter, R) es absorbida por el Quencher (Q), por lo que no hay señal de fluorescencia.

Una vez que se unen los primers y la Taq comienza a incorporar nucleótidos, una vez llegue a la zona de la sonda ésta es degradada gracias a

la actividad 5´-3´ exonucleasa de la Taq polimerasa. Al quedar el Reporter libre la fluorescencia que emite ya no es absorbida por el Quencher y, por tanto hay señal de fluorescencia que es recogida por el equipo de PCR cuantitativa. Conforme aumente el nº de ciclos de ADN y haya mayor nº de copias del producto de PCR, esta señal irá aumentando.

Este proceso de degradación de la sonda tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación del producto de PCR, por lo que se produce un incremento exponencial de la señal de fluorescencia en cada ciclo de la reacción de PCR. Además, la Taq polimerasa no digiere la sonda libre sino únicamente la hibridada, por lo que la cantidad de la señal fluorescente emitida es proporcional a la cantidad de producto acumulado.

La medición de la intensidad de fluorescencia se realiza de forma continua, lo que nos proporciona una **información dinámica en tiempo real** del proceso. De esta forma, podemos establecer el ciclo umbral (CT o cycle threshold), es decir, el número de ciclos necesarios para que la cantidad de producto producido alcance el nivel de detección que hayamos fijado, lo que a su vez se correlaciona directamente con la cantidad de células que contienen la secuencia diana.

La cuantificación del número de copias de una muestra se realiza mediante la comparación del CT de la muestra problema con el de una serie de diluciones de una muestra control positiva.

Con las diluciones de la muestra control positiva se establece una recta patrón que refleja el número de copias iniciales frente al número de ciclos. Cuando se realiza la cuantificación de la muestra problema, el ciclo umbral de su detección se interpola en la recta patrón, permitiendo conocer el número de copias de partida de la secuencia diana que tiene la muestra que estamos analizando.

Igualmente, el diseño de los cebadores así como de las sondas TaqMan específicas de cada diana es de gran importancia para que la eficiencia de la reacción sea la adecuada y se consiga una sensibilidad suficiente.

SyBRGreen.

El SyBRGreen es un agente intercalante que se une al ADN de doble cadena. Una vez intercalado da una fluorescencia, la cual será más intensa a medida que aumente la cantidad de producto amplificado.

Las ventajas del uso del SYBRGreen son las siguientes:

- Es un método simple y económico
- Es sensible
- No se necesitan sondas específicas

La principal desventaja que presenta es la siguiente:

- Al ser un agente que se une al ADN de doble cadena, puede unirse también a dímeros de primers y a otros productos inespecíficos, con lo cual la señal que se obtendría no correspondería solamente al producto amplificado.

Principales aplicaciones de la PCR cuantitativa:

- Cuantificación de ADN: autonómico, cromosoma Y, ADN Mitochondrial
- Estudio de polimorfismos en un solo nucleótido (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms)
- Ensayos de expresión Génica
- Detección de bacterias y hongos en Microbiología
- Detección y cuantificación de virus
- Diagnostico de enfermedades de origen genético: trisomías, hemocromatosis, coagulopatías, etc.

2.3.3- SISTEMAS DE ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS STR

El análisis de los loci STR para su aplicación en identificación genética humana se ha simplificado enormemente gracias a la posibilidad de amplificar conjuntamente dos o más loci en una única reacción (multiplex-PCR) (Edwards, 1991). Los sistemas de amplificación multiplex ofrecen una serie de ventajas sobre los sistemas individuales:

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

Los productos de amplificación pueden ser separados en función de su tamaño mediante una técnica rutinaria en los laboratorios de Genética Forense, la electroforesis. Mediante esta técnica los fragmentos de ADN amplificado migran a través de un soporte, que suele ser de agarosa o de acrilamida, cuando son sometidos a la acción de un campo eléctrico. Los sistemas convencionales de electroforesis utilizan como soporte geles desnaturizantes de poliacrilamida y la detección de los fragmentos separados se hace de manera manual mediante tinción de los geles con nitrato de plata, sin embargo para nuestro estudio este se ha llevado a cabo en un sistema por electroforesis capilar y detección por fluorescencia.

2.3.3.1- Tipificación manual.

La tipificación manual de STR mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida y su posterior tinción con nitrato de plata presenta las

ventajas de que es un método sencillo y que no requiere un equipamiento costoso. Es una técnica accesible a cualquier laboratorio básico de Genética Forense y que permite la resolución tanto de estudios de paternidad como de identificación genética. El uso conjunto de tres de estos sistemas multiplex: **CTT** (CSF1PO, TPOX, TH01), **FFv** (F13A01, FESFPS, vWA) y el **SilverSTR™ III Triplex** (D16S539, D7S820, D13S317) permite que se alcancen probabilidades de coincidencia de 1 en 1.03×10^9 en poblaciones de caucasianos-americanos e índices de paternidad de 521 (Promega, Technical Manual, 1998). Sin embargo, presentan otra serie de inconvenientes que dificultan la interpretación de los datos: uno de ellos es el desdoblamiento de bandas y el otro la aparición de bandas tartamudas o “stutter bands”.

El *desdoblamiento de bandas* se debe al hecho de que a veces las dos cadenas de ADN de un determinado fragmento amplificado pueden migrar a diferentes tasas debido a la diferencia en la secuencia de bases. Este hecho suele observarse en los fragmentos de mayor tamaño.

Las *stutter bands* son bandas que poseen una unidad de repetición menos que el alelo verdadero. Son generadas por un deslizamiento de la polimerasa durante la amplificación y dificultan enormemente la interpretación de los resultados en los casos de mezclas de muestras.

2.3.3.2- Sistemas de electroforesis capilar y detección por fluorescencia

La **electroforesis capilar** (normalmente representada por su acrónimo en inglés, CE) es un método alternativo para la separación de fragmentos y obtención de secuencias de ADN que suple, en parte, los inconvenientes de los sistemas convencionales. En este caso el soporte o medio de separación es un polímero incluido en un capilar de silica de unos $50\mu\text{m}$ y de longitud variable lo cual hace que la cantidad de calor generado sea menor y que puedan aplicarse voltajes mayores. La gran ventaja en cuanto a rapidez de la técnica se debe a que la preparación del gel y la carga de muestras se hacen de manera automática. Por otro lado se consigue una mayor sensibilidad, al poderse obtener resultados interpretables en los casos en los que el número de copias obtenidas por PCR es bastante bajo, y aumenta la capacidad para diferenciar alelos que se distinguen en un par de bases. Además, los resultados obtenidos son analizados por un software evitándose así problemas de interpretación y permitiendo que éstos queden almacenados para posibles futuros análisis.

Para que pueda llevarse a cabo el análisis por electroforesis capilar es necesario que el ADN sea amplificado utilizando un par de primers o más (en el caso de los multiplex) marcados en el extremo 5' con unas moléculas llamadas **fluorocromos** los cuales emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda cuando son excitados por láser. En los kits de amplificación los fluorocromos van ligados a uno de los primers (con lo cual se evitan los problemas derivados de la diferente movilidad de las dos cadenas de ADN), mientras que en kits de secuenciación pueden ir marcados o bien los primers o bien los dideoxinucleótidos.

El software de recogida de datos define ciertas áreas en una cámara CCD para recoger exclusivamente las emisiones procedentes del grupo de fluorocromos que estemos utilizando. Estas áreas se conocen con el nombre de filtros virtuales y su funcionamiento es similar al de los filtros físicos que se utilizan para separar las diferentes longitudes de onda. A pesar de que existe cierto solapamiento entre los diferentes rangos, este problema es minimizado gracias a la creación en el ordenador de una matriz matemática. Dicha matriz consta de cuatro filas y cuatro columnas y los números indican el grado de solapamiento entre las longitudes de onda emitidas por los cuatro fluorocromos. Los valores de la matriz varían según el analizador, el filtro virtual y las condiciones de electroforesis por lo que ésta debe ser creada para cada analizador y para unas determinadas condiciones electroforéticas.

El analizador ABI Prism 310 utiliza seis tipos de filtros virtuales denominados *A*, *B*, *C*, *D*, *E* y *F*. Los filtros *A*, *C*, *D* y *F* son usados en aplicaciones de GeneScan que es un software para análisis de fragmentos, mientras que el *A*, *B*, y *E* se usan para aplicaciones de secuenciación. En nuestro caso, para el análisis de fragmentos amplificados con el kit PowerPlex 16 el filtro utilizado fue el *A*. Cada filtro combina cuatro o menos fluorocromos (incluyendo el reservado para el estándar de tamaño) asignando un color a cada uno de ellos.

El **capilar** en el que se lleva a cabo la electroforesis se encuentra cubierto por poliamida opaca excepto por una pequeña zona denominada “ventana del capilar” la cual es atravesada por el láser y permite que las muestras sean excitadas a su paso por la misma.

Finalmente los datos analizados son enviados al ordenador el cual los transforma en secuencias de ADN o en fragmentos analizados con sus correspondientes alelos asignados.

DESCRIPCIÓN DEL ANALIZADOR

El instrumento de electroforesis capilar utilizado en este trabajo ha sido el analizador genético **ABI Prism 310** de Perkin Elmer Applied Biosystems. Fundamentalmente el analizador genético consta de dos partes: una en la que se lleva a cabo todo el proceso de inyección de la muestra, electroforesis y detección de la fluorescencia y otra que es el sistema informático acoplado al analizador.

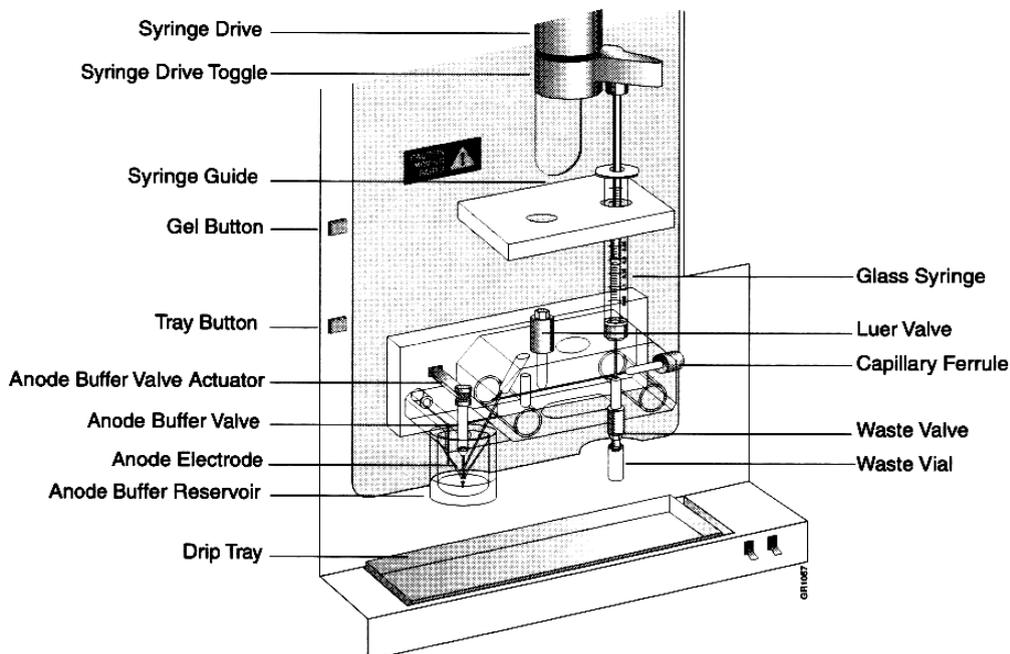
Una vez que las muestras amplificadas han sido preparadas y desnaturalizadas se colocan en un soporte con capacidad para 48 o 96 tubos y que encaja en la parte del analizador destinada a la carga de muestras (conocida como distribuidor de muestras o **autosampler**, que es su denominación inglesa). El autosampler se encarga de mover el soporte y, por lo tanto, los tubos de manera que el capilar pueda ser introducido en los mismos. Además dispone de:

- 2 viales de 4 ml: uno en el que se añade el buffer y otro con agua destilada para lavar el electrodo negativo y el capilar entre unos análisis y otros.
- Un tubo eppendorf de 1.5 ml que es el vial de deshecho, al cual irá la carga de polímero utilizada para cada muestra una vez terminado el análisis.

Encima del autosampler y junto al capilar a una distancia de unos 2 mm se encuentra el **electrodo negativo** que está conectado a una fuente de alto voltaje (15000 V) y proporciona la corriente necesaria para la electroforesis.

Existe otra zona en el aparato que es la encargada de bombear el polímero hacia el capilar. Esta zona consta de una jeringa que se rellena de polímero y un bloque de metacrilato con conductos internos y donde se encuentra además el electrodo positivo o ánodo al cual va acoplado el reservorio de buffer. A través de los conductos internos los electrodos inmersos en el buffer quedan conectados durante la electroforesis, generándose así la diferencia de potencial necesaria para la separación de los fragmentos de ADN (ver figura).

Gel Block Region The following is a diagram of the Gel Block region.
Diagram

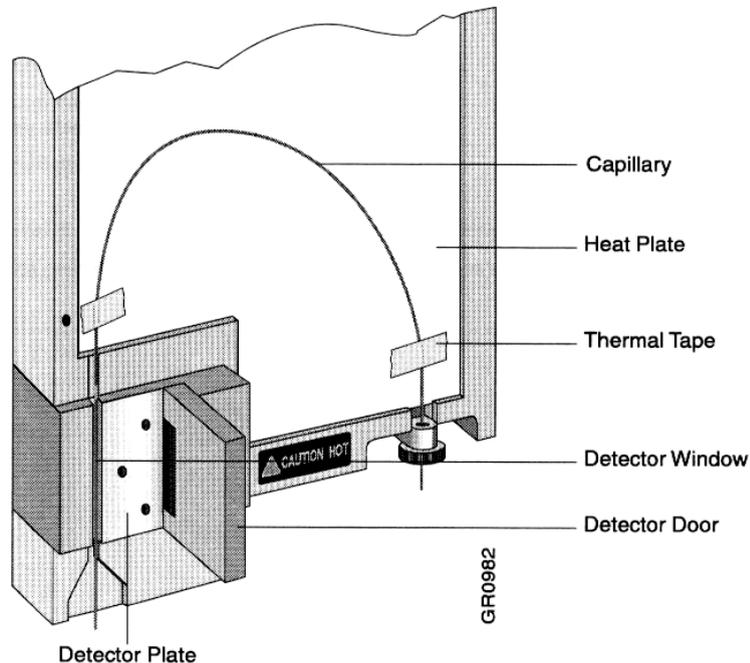


Entre las válvulas del bloque de metacrilato se encuentran:

- *Válvula del buffer del ánodo*: se mantiene cerrada mientras se realiza el relleno del capilar y se abre para contactar el polímero con el buffer durante la electroforesis.
- *Válvula de deshecho*: permite la salida de exceso de polímero.

La última zona importante en el analizador es la dedicada a la electroforesis y detección de fluorescencia la cual consta de (ver figura)

Detection Region Diagram The following is a diagram of the Detection Region.



- Una **placa** o plato que proporciona al capilar la temperatura adecuada para la electroforesis (60°C en análisis de fragmentos y 50°C en secuenciación)
- El **capilar de silica** relleno de polímero. Es el soporte de la electroforesis.
- Un **láser de argón**.
- Una **cámara CCD**.
- Una **ventana detectora** en la cual se hace coincidir la ventana del capilar.

Una vez que las muestras han sido analizadas los datos generados son recogidos por el **ordenador**. El ordenador acoplado al secuenciador ABI Prism 310 es un modelo de Macintosh que permite la instalación de diversos programas informáticos con diferentes funciones. El ABI Prism 310 Data Collection Software es el programa que recoge lo que se denomina el dato bruto o raw data y que es la fluorescencia detectada en la cámara CCD cuando los fragmentos marcados, separados por electroforesis y excitados por el láser pasan por la ventana de detección. Existen dos programas que analizan el dato

bruto y lo convierten en secuencia de ADN o en fragmentos de un determinado tamaño:

- **ABI Prism® DNA Sequencing analysis**: para secuenciación
- **GeneScan® Analysis**: para análisis de fragmentos.

En este trabajo, puesto que se han analizado fragmentos de ADN, los programas utilizados han sido el ABI Prism® 310 Data Collection y el GeneScan® Analysis. Una vez analizados los fragmentos y con sus correspondientes tamaños (en pb) se hizo una asignación automática de los alelos mediante otro programa informático llamado **Genotyper® 2.5.2**.

VENTAJAS DEL USO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

1. El hecho de utilizar diferentes fluorocromos para cada locus permite el análisis simultáneo de varios loci aunque éstos posean alelos con tamaños solapantes.
2. La cuantificación del tamaño en pares de bases del fragmento amplificado se hace de manera exacta ya que, en los sistemas de electroforesis capilar, en cada muestra se incorpora un estándar interno de movilidad que permite medir de manera automática el tamaño, eliminando las diferencias de movilidad electroforética que puedan existir entre las diferentes calles de un gel de acrilamida.
3. Al marcarse sólo uno de los primers se elimina el problema del desdoblamiento de bandas que tan frecuentemente se observa con la tipificación manual como consecuencia de la diferente movilidad de las cadenas complementarias de algunos STR. Estos fluorocromos utilizados para el marcaje de los primers hace posible detectar cantidades muy pequeñas de ADN amplificado. De esta manera, resultados apenas visibles y por lo tanto, difícilmente interpretables por el ojo humano en geles de acrilamida, pueden llegar a ser visualizados e interpretados en equipos de electroforesis capilar.
4. Los resultados se obtienen de manera informatizada lo cual facilita su análisis a través de programas informáticos.
5. Rapidez de la técnica: Por un lado la preparación del gel y la carga de las muestras en el mismo se hace de manera automatizada, lo cual ahorra tiempo; y por el otro lado, permite el análisis simultáneo de varios loci aunque estos posean alelos con tamaños solapantes, actualmente hay Kits preparados para electroforesis capilar que permiten el análisis simultáneo de 15 loci tipo STR en una sola reacción de PCR.

2.3.4- Nuevas tecnologías.

Las técnicas de análisis genético se encuentran hoy en día en continuo desarrollo y evolución. La necesidad de técnicas que permitan el aislamiento y análisis de los miles de genes que componen el genoma humano justifica la existencia de líneas de investigación destinadas al descubrimiento de nuevos métodos que permitan monitorizar elevados volúmenes de información genética en paralelo y que reduzcan tanto el tiempo empleado como el coste por análisis.

Desde el análisis de los primeros polimorfismos de ADN con fines identificativos, la Genética Forense ha sufrido una gran **evolución**. Los expertos en la materia han sido testigos de cómo el descubrimiento de la PCR revolucionó las técnicas de identificación genética.

La próxima revolución está llevándose a cabo con los llamados **biochips** o **microarrays** que día a día se están confirmando como la tecnología del futuro en Genética Forense (entre otros campos).

2.3.4.1- Biochips

Los biochips surgen como una consecuencia de una combinación entre técnicas microelectrónicas empleadas para la fabricación de microprocesadores informáticos y materiales biológicos

En general, puede decirse que la principal característica de los chips es su capacidad para generar información en muy poco espacio, ya que posibilitan el procesamiento de multitud de ensayos simultáneamente. Esta característica es la que hace que los biochips sean probablemente la tecnología del futuro en el campo de las investigaciones biomédicas.

Pueden definirse los biochips y microarrays de ADN como una **matriz bidimensional de material genético**, que permite la automatización simultánea de miles de ensayos encaminados a conocer en profundidad la estructura y funcionamiento de nuestra dotación genética.

No se ha establecido un estándar en microarrays de ADN, ya que coexisten distintas tecnologías con el mismo fin: análisis de la expresión y variabilidad génica.

Las principales aplicaciones de microarrays y biochips (además de la mencionada en Genética Forense) son las siguientes:

- . Monitorización de la expresión génica.
- . Cribado de compuestos activos y validación de dianas terapéuticas.
- . Farmacogenómica. Medicina personalizada.
- . Diagnóstico molecular y pronóstico de enfermedades.
- . Detección de agentes infecciosos.

Clasificación de microarrays según:	Características	Nombre
Material inmovilizado	<ul style="list-style-type: none"> • Oligonucleótidos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Gene Chips.
	<ul style="list-style-type: none"> • cDNAs. • Proteínas. • Tejidos. 	<ul style="list-style-type: none"> • cDNA Array. • Protein Chip. • Tissue Chip.
Diseño del array o surtido	Personalizado	Arrayers
	Industrial	Cassettes
Fabricación	Densidad de integración	Alta: microarrays
		Baja: macroarrays
Impresión	Generación de la sonda	"in situ"
		"depositadas"
Soporte / Tipo de unión	No poroso / Covalente	Soporte rígido (Cristal y Plástico)
	Poroso / No covalente	Membranas
Aplicación	<ul style="list-style-type: none"> • Secuenciación por hibridación. • Detección de cambios en la expresión génica. • Cuantificación de la expresión génica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Chips de secuenciación. • Chips de hibridación comparativa. • Chips de expresión.

La fabricación de los biochips es similar a la de los chips informáticos: por medio de la técnica denominada fotolitografía se depositan circuitos microscópicos sobre láminas de silicio. En el caso concreto de los biochips, estas láminas son de vidrio y lo que se deposita en dichas láminas son cadenas de ADN. Las láminas de vidrio presentan una serie de ventajas como son:

- Posibilidad de unir las cadenas de ADN a la superficie del cristal, convenientemente tratada, mediante enlaces covalente.
- Su capacidad para aguantar altas temperaturas y lavados de elevada fuerza iónica.
- Al ser un material no poroso el volumen de hibridación puede reducirse al mínimo.
- Su baja fluorescencia evita ruidos de fondo.

Hay compañías comerciales que han desarrollado otras estrategias para la fabricación de biochips. No obstante, los más usados actualmente y con mayor número de aplicaciones son los basados en **técnicas fotolitográficas**.

Estos chips, como se dijo anteriormente, consisten en una pequeña lámina de vidrio que posee unos grupos reactivos, a los que posteriormente se

unirán los nucleótidos, protegidos mediante una película realizada con un agente químico fotodegradable. Mediante una máscara que se sitúan sobre el chip, se logra enfocar un haz de luz hacia unas posiciones y regiones determinadas, degradando al agente químico protector en dichas zonas y dejándolo intacto en las zonas protegidas por la máscara. A continuación se añade al chip un medio que contiene uno de los cuatro nucleótidos que se unirá, mediante enlace covalente, al cristal con los grupos reactivos que hayan quedado desprotegidos. Cada grupo añadido lleva una molécula receptora fotodegradable.

Todo este proceso se va repitiendo con los diferentes nucleótidos y máscaras hasta generar unos oligonucleótidos con las secuencias que nos interesen.

Cada "casilla" del chip posee una cadena de un oligonucleótido de manera que solamente aquel fragmento de ADN que hibride perfectamente con ella permanecerá unido tras los diversos lavados.

Previamente a la hibridación, el ADN de la muestra a estudiar debe haber sido amplificado y marcado fluorescentemente en uno de sus extremos. Una vez marcado se incuba en el recipiente que contiene al chip, tras lo cual se lava varias veces para eliminar los fragmentos que no hayan hibridado y se introduce el chip en un escáner en el que se detectan los patrones de hibridación. Esta detección se realiza en base a la fluorescencia emitida por los fluorocromos de la muestra cuando son excitados por luz y en aquellos pocillos en los que la unión haya sido completa la fluorescencia será mayor que los que contengan alguna base desapareada.

Tipos de biochips:

En función de la técnica utilizada para la fabricación de los biochips, existen actualmente en el mercado varios chips de ADN que están siendo desarrollados por diferentes compañías comerciales:

. **Genechips.** Fueron los primeros en aparecer y están siendo desarrollados por la compañía Affymetrix. La técnica empleada es la fotolitografía (que ha sido explicada anteriormente). Por ahora, parece que éstos son los más utilizados y con mayores aplicaciones.

. **Matrices electrónicamente activas.** Están siendo desarrolladas por la compañía Nanogen y permiten que el usuario diseñe sus propios chips mediante un programa informático específico. También se denominan bioelectrochips debido a que el método utilizado es electrónico. Este método posiciona el ADN y lo fuerza a hibridar, las hebras de ADN del chip se mantienen unidas aprovechando su carga eléctrica negativa. Al añadir la muestra se invierte la polaridad de la placa, de manera que sólo permanecerán unidas aquellas cadenas que hayan hibridado. Las posibles aplicaciones de estos chips son el diagnóstico de enfermedades infecciosas, cáncer, descubrimiento de fármacos y determinación de expresión génica.

. **GEMarrays.** Han sido producidos por Incyte -Synteni. Están destinados a la cuantificación de expresión génica. Para su formación se parte de una librería de ADNc del sistema que se quiera estudiar y se deposita sobre una superficie de cristal. El empleo de distintos fluorocromos posibilita por un lado, la diferenciación de expresión entre dos muestras de ARNm y por el otro, la cuantificación del nivel de expresión de cada gen en función de la intensidad de fluorescencia.

. **Espectrochips.** Se utilizan en secuenciación, empleando espectrometría de masas para obtener el peso molecular de los fragmentos. Han sido desarrollados por la compañía Sequenom.

Aplicaciones de los biochips:

A pesar de ser una tecnología muy reciente y que, por lo tanto, está aún en vías de experimentación, actualmente los biochips están siendo aplicados en:

. **Monitorización de expresión génica:** permite determinar cual es el patrón de expresión génica y cuantificar el nivel de expresión de manera simultánea para un elevado número de genes. Esto permite realizar estudios comparativos de activación de determinados genes en tejidos sanos y enfermos y determinar así la función de los mismos.

. **Detección de mutaciones y polimorfismos:** permite el estudio de todos los posibles polimorfismos y la detección de mutaciones en genes complejos.

. **Secuenciación:** mientras que se han diseñado algunos biochips para secuenciación de fragmentos cortos de ADN, no existe aún en el mercado ningún biochip que permita secuenciar de novo secuencias largas de ADN.

. **Diagnóstico clínico y detección de microorganismos:** posibilitan la identificación rápida empleando unos marcadores genéticos de los patógenos.

. **Screenig y toxicología de fármacos:** el empleo de los biochips permite analizar los cambios de expresión génica que se dan durante la administración de un fármaco de forma rápida, así como la localización de nuevas posibles dianas terapéuticas y los efectos toxicológicos asociados.

. **Seguimiento de terapia:** los biochips permiten valorar rasgos genéticos que pueden tener incidencia en la respuesta a una terapia.

. **Medicina preventiva:** el conocimiento y posible diagnóstico de ciertos caracteres genéticos asociados a determinadas patologías permite una prevención de las mismas antes de que aparezcan los síntomas.

2.3.4.2- Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)

En los últimos tiempos está aumentando el desarrollo y el análisis de

sistemas basados en la detección de polimorfismos de un único par de bases o SNPs (**S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphism) y pronunciados como "snips". Los SNPs localizados en regiones no codificantes del ADN, tienen presumiblemente poco o ningún impacto en la estructura o función del organismo; en cambio, tienen un importante interés con fines de individualización y se están incluyendo ya en la batería de marcadores de muchos laboratorios forenses.

Actualmente, los sistemas STR **constituyen el presente en los casos rutinarios**. Sin embargo, se prevé que los SNPs se usarán de modo continuo en el futuro. La ventaja de los SNPs en los casos forenses es que se amplifican fragmentos de 40 a 50 pares de bases, por lo que muestras con ADN muy degradado podrán ser analizadas mediante SNPs. Además, la tecnología de SNP tiene un gran potencial para la automatización.

Aunque la información genética obtenida por un SNP, por término medio, es mucho más baja que la obtenida por un sistema de STR, se estima que una selección de 50-100 SNPs seleccionados serían suficientes para los análisis genéticos.

Los SNPs no se distribuyen uniformemente a lo largo del genoma humano. Hay SNPs tanto dentro de las regiones codificantes como de las no codificantes. También se ha observado que la variación de la secuencia es mucho más baja para los cromosomas sexuales. Dentro de un cromosoma, los SNPs pueden concentrarse sobre una región específica, implicando un área de interés médico o de investigación.

Distintas técnicas

El análisis de SNPs puede hacerse con distintas tecnologías de genética molecular, de las que merecen especial mención las que permiten, además de la automatización, la **miniaturización**, posibilitando el estudio simultáneo de múltiples muestras en un solo ensayo como son la minisequenciación y los microarrays.

Hay otras técnicas basadas en el kit **ABI PRISM® SNaPshot™ Múltiplex System** que consiste en una fórmula premezclada en un solo tubo que se combina en una reacción con el ADN y los primers.

Este método consiste en la incorporación de fluorocromos (hasta 5 colores) a unos primers diseñados con colas no homólogas de longitudes variables, posibilitando la "interrogación" de hasta diez sitios SNPs en una única reacción.

El SNaPshot™ puede analizar diez sitios de SNP en un el solo capilar, rindiendo así entre 480 y 23,000 genotipos en un periodo de 24 horas dependiendo de la plataforma o equipo que se utilice.

Hay multitud de métodos para el estudio de los SNPs, aunque nos vamos a centrar en el **kit SNaPshot de Applied Biosystems** que es uno de

los más utilizados.

Igualmente, existen numerosos instrumentos para llevar a cabo el análisis mediante SNPs y cada uno con una técnica o planteamiento distinto.

La elección de un método u otro dependerá del número de SNPs que se quieren detectar y del número de muestras a estudiar.

El que vamos a ver con algo de detenimiento es el que se basa en la reacción de **minisequenciación por SNaPshot** y que utiliza las plataformas de electroforesis capilar de equipos como el ABI Prism 310 y 3100 de Applied Biosystems.

El procedimiento analítico completo para el análisis de SNPs, a modo de resumen, sería el siguiente (basándonos en la minisequenciación por SNaPshot):

Una vez preparada y extraída la muestra, la etapa inicial consiste en **amplificar mediante PCR la región del ADN** que nos interesa.

Concluida esta fase se ha de **purificar el producto de PCR** mediante el uso de enzimas tipo exonucleasas como la EXO I o con filtros microcon 100 por ejemplo, con objeto de eliminar componentes no deseados de la PCR y que puedan interferir en fases posteriores.

Posteriormente se ha de realizar la **minisequenciación** con el kit SNaPshot de Applied Biosystems.

Este proceso a su vez consta de una etapa de **unión del primer a su cadena complementaria** y que va a hibridar en la posición 3' en un punto inmediatamente anterior a la posición que queremos chequear, a continuación gracias a la polimerasa y a los didexosinucleotidos o terminadores presentes se incorporará la base complementaria a la primera posición que estamos comprobando, esto se llevará a cabo en un proceso cíclico hasta conseguir el número suficiente para ser detectados.

Terminado el anterior proceso, hay una nueva etapa de **purificación**, en esta ocasión del producto obtenido por SNaPshot (se utiliza por ejemplo enzimas como la SAP o columnas de purificación como Centrisep).

Finalmente se procede a **analizar la muestra** mediante electroforesis y a **comparar los resultados**.

Ventajas de la técnica de SNaPshot:

-Es más rápido y más barato que la secuenciación convencional.

-Las amplificaciones realizadas son muy pequeñas, lo cual lo convierte en un instrumento muy eficaz para trabajar con muestras muy degradadas.

- Puede interrogar en una única reacción entre 10-15 SNPs.
- Un SNPs puede ser evaluado por el diseño de primers en que hibriden en la cadena forward o en reverse.
- Puede ser analizado en un equipo automatizado convencional.

2.4 GENETICA DE POBLACIONES

El polimorfismo de los STRs del ADN es utilizado en Medicina Forense con fines identificativos en dos campos fundamentales:

- En el campo del Derecho Penal para determinar la Relación de un determinado sospechoso con unos hechos basándose en la coincidencia de su perfil de ADN tipado con el encontrado en la escena del crimen.
- En el del Derecho Civil para establecer la Paternidad o Maternidad Biológica de unos padres putativos y, en general, establecer o descartar las posibles relaciones de parentesco.

En cualquiera de los casos, se trata de ver si se produce una coincidencia de los alelos procedentes de muestras biológicas diferentes. Cuando dicha coincidencia no se produce, salvo que se haya producido algún tipo de error, la interpretación es sencilla, puesto que se **excluye** al sospechoso o padre putativo, pero cuando hay un emparejamiento entre las bandas no es suficiente para decir que se trata del mismo individuo; en este caso es necesario saber cual es la probabilidad de que un individuo al azar de la población coincida con el genotipo de la muestra cuestionada. Esta probabilidad dependerá de cómo de frecuente sea el genotipo observado en la población general, ya que si este es común la probabilidad de emparejamiento será más alta, pero si es poco frecuente y coincide, habrá muchos elementos para pensar que se trata de muestras procedentes del mismo individuo.

Los resultados anteriormente expuestos han de presentarse en términos de probabilidad, con lo cual necesitamos conocer la frecuencia de los genotipos en la población general.

Para conocer las distribuciones de las frecuencias genotípicas en la población, ante la imposibilidad técnica y material de realizar un estudio de todos y cada uno de los individuos, tomamos una muestra representativa de forma aleatoria y de su estudio y análisis se lleva a cabo la estimación de los valores poblacionales de las frecuencias genotípicas.

Por tanto el objetivo fundamental de la Genética de Poblaciones es el análisis de las consecuencias de las leyes de la herencia mendeliana sobre la composición genética de las poblaciones y la influencia que ejercen procesos como la **mutación**, **selección**, **migración** y **deriva genética** sobre las frecuencias génicas de las mismas. El estudio se centra en el conjunto de individuos y no en el individuo aislado, ya que éste no puede ser considerado como unidad evolutiva al no sufrir cambios genéticos o evolutivos a lo largo de su existencia. En cambio, la constitución genética de una población puede cambiar y evolucionar de generación en generación.

La Genética de Poblaciones basa sus estudios en un modelo de población ideal que podría ser definida como un *grupo de individuos que se reproducen entre sí de forma aleatoria y que pueden presentar diferencias en*

las frecuencias génicas con respecto a otros grupos vecinos (Moreno Suárez, 1999). No obstante, este concepto es un modelo teórico que rara vez se da en la Naturaleza ya que no todos los individuos de una población se casan con individuos del mismo grupo al ser los límites o fronteras entre poblaciones cada vez menos frecuentes. Estos límites son esenciales en el estudio de la Genética de Poblaciones puesto que definen unidades reproductoras de individuos. En general pueden dividirse en dos grupos: fronteras naturales y fronteras sociales.

Las *fronteras naturales* vienen determinadas por el propio ambiente físico, ya sean cadenas montañosas, océanos, islas, etc., e impiden la transmisión de genes de unas poblaciones a otras. Hoy en día, este tipo de fronteras apenas se dan debido a la facilidad y rapidez de las comunicaciones.

Las *fronteras sociales* condicionan la relación entre individuos debido a diferencias de cultura, clase social, religión, etc. pero al igual que las naturales no son impenetrables.

2.4.1- Ley de Hardy-Weinberg

Esta ley es el principio básico de la Genética de Poblaciones y fue postulada en 1908 de manera independiente por dos científicos: George Hardy, matemático inglés, y Wilhelm Weinberg, médico alemán. Según esta ley *en toda población de gran tamaño en la que los apareamientos se dan al azar (población panmíctica) y en la que hay ausencia de fuerzas evolutivas como la mutación, selección y migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.* Una población que cumpla dichas características se dice que está en equilibrio de Hardy-Weinberg y sus frecuencias genotípicas estarán determinadas por sus frecuencias génicas. En el caso de un locus con dos alelos codominantes cuyas frecuencias génicas son p y q respectivamente, la frecuencia de equilibrio para los tres genotipos se establece por la siguiente fórmula:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

La finalidad de los estudios poblacionales realizados por genetistas forenses o antropólogos es definir las poblaciones analizadas mediante las frecuencias génicas de determinados loci polimórficos y aplicar una serie de tests estadísticos destinados a la confirmación de equilibrio de Hardy-Weinberg para esa población y a la correlación de unos loci con otros. En este tipo de estudios es muy importante que el tamaño de la muestra sea grande (por encima de 100 individuos) para que los resultados sean fiables. Además, en el caso de estudios poblacionales con fines forenses es importante que la muestra sea tomada al azar y que entre los individuos analizados no exista ningún tipo de relación familiar ya que la consanguinidad puede alterar las frecuencias génicas.

2.4.2- Fuerzas evolutivas que pueden influir en el equilibrio Hardy-Weinberg

La asunción de equilibrio de Hardy-Weinberg en una población implica el hecho de que en esa población no existiría evolución, entendida ésta como un cambio de las frecuencias génicas. En esta estabilidad de las frecuencias génicas influye la ausencia de fuerzas evolutivas como son la mutación, selección, flujo y deriva genética (Moreno Suárez, 1999).

Los procesos básicos que cambian las frecuencias génicas son la mutación, la migración, la deriva genética y la selección natural.

2.4.2.1 - Mutación.

Una mutación puede definirse como un cambio en el material genético de un locus determinado. Cuando el locus que sufre la mutación codifica alguna proteína funcional del organismo el efecto de tal mutación se hace notable y es probable que tal mutación no pase a través del filtro que supone la selección natural (mutaciones deletéreas). En cambio, mutaciones en regiones o locus de ADN no codificante pasan inadvertidas de generación en generación (mutaciones neutras).

Los genes pueden mutar en cualquier tipo de célula, ya sea somática o sexual. En el primer caso el cambio producido no se transmitirá a la descendencia y, por lo tanto, desde el punto de vista evolutivo estas mutaciones no tienen importancia. En cambio, cuando la mutación se da en células sexuales (óvulos o espermatozoides) el gen alterado puede transmitirse a la descendencia y alterar el estado de equilibrio.

La frecuencia de aparición de una mutación se denomina frecuencia de mutación y se define como el número de nuevas mutaciones por locus y por generación. En la especie humana las tasas de mutación son muy bajas.

Las variantes hereditarias que posibilitan la evolución surgen por el proceso de mutación. Pero este es un **proceso muy lento, debido a que las tasas de mutación son muy bajas**. Veamos un ejemplo.

Consideremos un alelo A que se convierte en B por mutación a una tasa del 1 por 100.000, que es típica de muchos genes (en cada generación una cienmilésima de todos los alelos A se convierte en B). Sí en un momento dado, la frecuencia de los alelos A es 0'10, en la generación siguiente será del 0'0999999, un cambio pequeñísimo. Y así sucesivamente.

La fracción del alelo que cambia es siempre la misma; pero como la frecuencia del alelo es cada vez menor, el efecto de la mutación se va reduciendo de generación en generación. En nuestro caso, se requieren 10.000 generaciones para que la frecuencia del alelo A se reduzca de 0'1 a 0'09.

Por otra parte, las mutaciones son reversibles: el alelo B también puede mutar a A. La frecuencia de los alelos cambiará aún más lentamente.

De todo esto se deduce que la mutación, aunque tiene su contribución, no es fuerza suficiente para impulsar todo el proceso evolutivo. Las frecuencias de los genes están determinadas por la interacción entre mutación y selección.

2.4.2.2- La migración genética (flujo genético).

La migración, en el sentido genético, implica que los organismos (o sus gametos o semillas) que van de un lugar a otro se entrecruzan con los individuos de la población a la que llegan. Por eso la migración se llama **flujo genético**.

En este caso, lo que cambian son las frecuencias génicas de una localidad dada, si es el caso que las frecuencias de los emigrantes y de los residentes no son iguales.

El flujo o migración de genes de una población a otra es otro de los factores que pueden contribuir en el cambio de las frecuencias génicas de una población. Este flujo de genes entre dos poblaciones puede darse en una sola dirección o en dos, y, en este segundo caso, dará lugar a poblaciones genéticamente idénticas. Si dos poblaciones genéticamente diferentes están aisladas geográficamente pero interconectadas por una serie de poblaciones intermedias es probable que se origine un gradiente geográfico de frecuencias génicas. Estos gradientes suelen conocerse con el nombre de geoclinas y tienden a desaparecer cuando el intercambio es muy fuerte y, por lo tanto, las poblaciones intermedias son genéticamente idénticas.

2.4.2.3- Deriva genética.

En cada generación se produce un sorteo de genes durante la transmisión de gametos de padres a hijos que se conoce como deriva genética. Durante la formación de los gametos de organismos diploides, el que un gameto lleve un alelo u otro de un determinado gen depende del azar. Así, podemos decir que la formación de gametos y su consiguiente unión para formar los huevos de la siguiente generación es un proceso probabilístico. Es por este motivo por el que en cada generación esperamos una fluctuación al azar de las frecuencias alélicas en las poblaciones. Si en algún momento durante esta conducta fluctuante un tipo de alelos no llega a transmitirse a la siguiente generación, entonces este alelo se habrá perdido para siempre. El resultado de la deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones.

Las frecuencias génicas pueden cambiar por razones puramente aleatorias, lo que se llama deriva genética, debido a que cualquier población consta de un **número finito de individuos**. La frecuencia de un gen puede por ello cambiar de una generación a otra gracias a lo que se llaman errores de muestreo, ya que de todos los genes de la población sólo una pequeñísima fracción pasará a la siguiente (por lo mismo también es posible que salgan más de 50 caras al lanzar una moneda 100 veces).

Si en una población de 1.000 individuos, la frecuencia de *a* es 0'5 en una generación, en la siguiente generación puede ser, por azar, de 0'505 ó de

0'493, a causa de la producción fortuita de unos pocos más o unos pocos menos descendientes de cada genotipo. En la segunda generación habrá otro error de muestreo, que ahora trabaja sobre la nueva frecuencia génica, así que la frecuencia de a puede llegar de 0'505 hasta 0'511 ó bajar a 0'498. Este proceso de fluctuación aleatoria continúa de generación en generación, sin que ninguna fuerza empuje a la frecuencia a retornar a su valor original. De este modo, el resultado final es que **la deriva provoca que las frecuencias génicas sean $p=1$ ó $q=1$** ($q=0$ ó $p=1$, respectivamente). Tras este final, ya no es posible ningún cambio: **la población se ha hecho homocigótica**. Una población aislada a partir de la primera también sufre esta deriva genética aleatoria, pero en lugar de hacerse homocigótica para el gen A , puede hacerse para el gen a . A medida que el tiempo transcurre, las poblaciones aisladas divergen entre ellas, perdiéndose heterocigotidad: la variación que aparecía en las poblaciones aparece ahora **entre** poblaciones.

Cuanto mayor sea el número de individuos de la población, menor será la diferencia entre las frecuencias de una generación y otra, aunque lo que cuenta no es el número real de individuos, sino lo que se llama tamaño eficaz. El **tamaño eficaz** de una población se define por aquellos individuos que dejan descendientes, que en el caso de casi todos los organismos puede ser un número mucho menor que el total de individuos (sólo los individuos reproductores transmiten sus genes).

Si no hubiera otros procesos de cambio evolutivo, tales como la mutación y la selección natural, **las poblaciones llegarían al final a tener un solo alelo de cada gen**, aunque se tardasen muchas generaciones en llegar a ello. La razón es que, tarde o temprano, uno u otro alelo sería eliminado por la deriva genética sin posibilidad de que reapareciera por mutación o migración. Debido a la mutación los alelos desaparecidos de una población pueden reaparecer de nuevo, y gracias a la selección natural, la deriva genética no tiene consecuencias importantes en la evolución de las especies, excepto en poblaciones de pocos individuos.

Una situación extrema de deriva genética se da cuando se establece una nueva población a partir de pocos individuos, cuando una población pequeña se separa de otra original más grande. Es lo que **Ernst Mayr** ha llamado **efecto fundador**. Es lo que ocurre en numerosas islas oceánicas, con poblaciones numerosísimas establecidas por muy pocos individuos. Las frecuencias de muchos genes pueden ser diferentes en los pocos colonizadores y en la población de la que proceden, y ello puede tener efectos duraderos en la evolución de tales poblaciones aisladas. Sería un caso de "deriva aguda", el resultado de una única generación de muestreo, seguida de varias generaciones durante las cuales la población sigue siendo pequeña. El efecto fundador es, probablemente, responsable de la **práctica ausencia de grupo sanguíneo B** entre las poblaciones de indios de América, cuyos antecesores llegaron en números muy pequeños a través del Estrecho de Behring hace unos 10.000 años. Ejemplos más recientes se pueden ver en grupos religiosos aislados, como los Dunkers y los Amish de Norteamérica. Estas sectas fueron fundadas por pequeños grupos de emigrantes, procedentes de congregaciones mucho más amplias de Europa Central. Desde entonces han estado prácticamente cerradas a la inmigración de poblaciones

procedentes de su entorno. El resultado es que, por ejemplo, sus frecuencias en los grupos sanguíneos son totalmente diferentes a las de las poblaciones de Europa y Norteamérica.

Para comprobar la deriva genética y sus consecuencias se realizó en su época el siguiente experimento. De una misma población de *Drosophila* que vivía en libertad se seleccionaron, por diez veces consecutivas, 20 fundadoras a las que se encerró en jaulas. Estas subpoblaciones dieron lugar a poblaciones muy divergentes entre sí en cuanto a caracteres y cualidades. Se repitió el experimento seleccionando esta vez 4.000 individuos otras 10 veces; las poblaciones resultantes apenas presentaban diferencias entre sí y con la población inicial. Esto es precisamente lo que ya sospechaba Darwin con los pinzones de las Galápagos, de los cuales intuía que debían proceder de muy pocos individuos o de tan solo una pareja.

Un resultado del muestreo aleatorio es que la mayoría de las nuevas mutaciones, incluso si no hay selección contra ellas, nunca logran fijarse en la población. Supongamos que un individuo particular es heterocigoto para una nueva mutación; existe alguna probabilidad de que este individuo no deje descendencia, incluso, si la dejara, la probabilidad de que la nueva mutación no se transmita sería de $\frac{1}{2}$. Si el individuo deja dos descendientes, la probabilidad de que ninguno de ellos lleve la nueva mutación es de $\frac{1}{4}$, y así sucesivamente. Pero supongamos que la nueva mutación se transmite con éxito a algún descendiente; entonces la "lotería" se repite en la siguiente generación, y de nuevo se puede perder el alelo. De hecho, si la población es de tamaño N , la probabilidad de que la mutación nueva se pierda por azar es

$$(2N - 1)/2N$$

Pero si la nueva mutación no se pierde, entonces lo único que puede ocurrirle a una población finita es que, finalmente, llegue a fijarse con una probabilidad de

$$1/2N.$$

El proceso es prácticamente idéntico aunque la nueva mutación presente cierta ventaja selectiva, siempre que la población sea de tamaño limitado.

Variaciones aleatorias en las frecuencias alélicas similares a las debidas al efecto fundador tienen lugar cuando las poblaciones pasan a través de un cuello de botella. Cuando el clima u otras condiciones son desfavorables, es posible que las poblaciones reduzcan de manera drástica sus efectivos y corran el riesgo de extinguirse. Más tarde, tales poblaciones pueden recobrar su tamaño original, pero la deriva quizás alteraría considerablemente sus frecuencias alélicas durante el cuello de botella. Este fenómeno parece que es el ocurrido con el ser humano y alguno de sus antecesores: la variabilidad genética de la que gozamos es tan increíblemente pequeña en comparación con el de gorilas y chimpancés, por ejemplo, que todo hace pensar que, en algún momento de nuestra evolución, el número de individuos se vio reducido tan drásticamente, por la causa que fuese, que las frecuencias alélicas cambiaron radicalmente por perderse una buena parte del patrimonio genético original.

2.4.2.4- Selección natural.

Una de las causas más importantes del cambio de las frecuencias génicas reside en la capacidad que tienen sus portadores para producir descendencia superviviente. La enorme variedad de mecanismos responsables de la modificación del éxito reproductivo de un genotipo se conoce como selección.

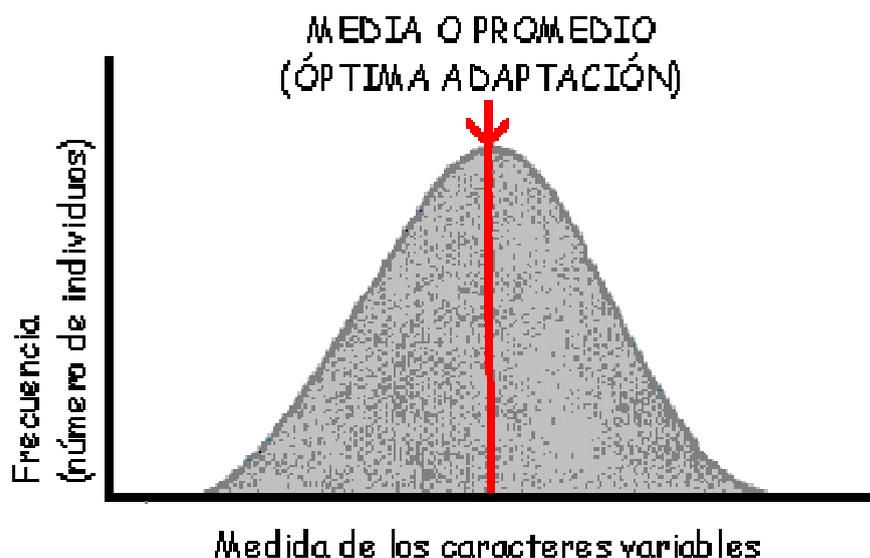
Estos mecanismos incluyen factores como cambios de temperatura, humedad, en la disponibilidad de alimento, diferencias en la atracción sexual, etc.

Cualquier variante alélica que aumente la probabilidad de que un individuo sobreviva y se reproduzca verá aumentada su frecuencia en las siguientes generaciones ya que dejarán más descendientes que los individuos que carezcan de ella. La fuerza que actúa sobre cada genotipo para reducir su valor adaptativo se denomina coeficiente de selección, s .

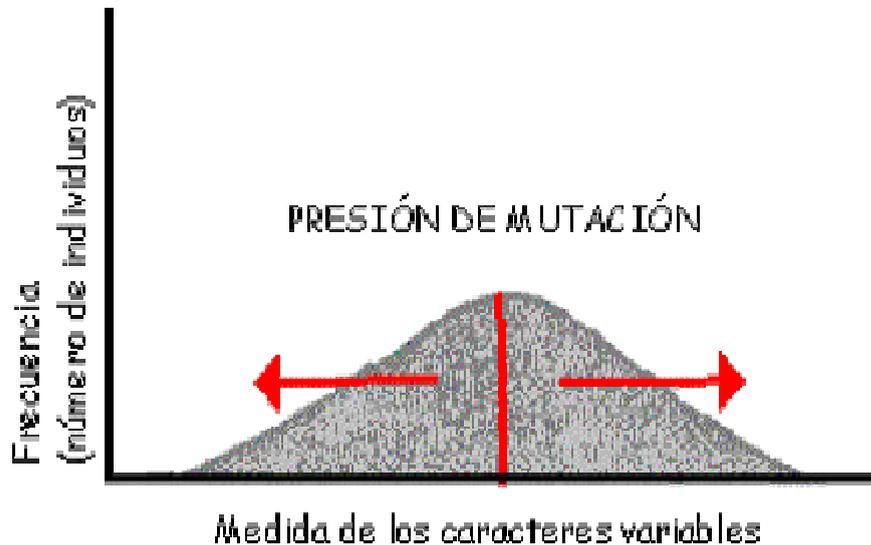
$$s = 1 - w$$

Siendo w la eficacia biológica, un parámetro que mide el mayor o menor éxito reproductor de un genotipo. Cuando en un mismo ambiente un genotipo puede dar lugar a más descendencia que otro, se dice que tiene una eficacia mayor. Por lo tanto, el coeficiente de selección mide la reducción de la eficacia.

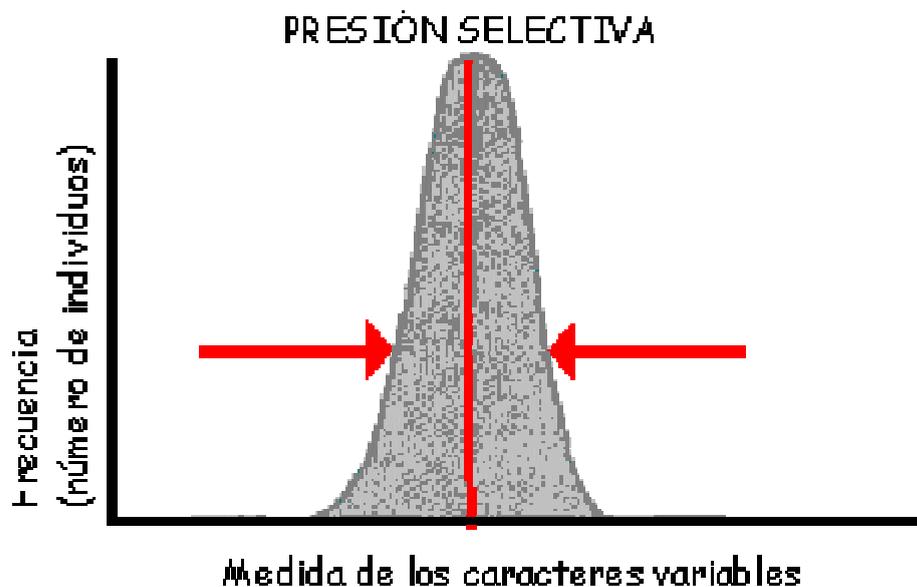
Si observamos cualquier población, cualquier miembro está adaptado casi perfectamente a su biotopo. **El grado ideal de adaptación es el que presentan la mayoría de los individuos; constituye la media.** Sólo unos pocos se desvían a uno y otro lado de esa media, y cuanto mayor sea la desviación, menor será el número de individuos que la presenten. Esta idea se puede representar mediante una curva de Gauss con forma de campana.



Cuando aparecen mutaciones en la población, estas lo hacen sin ninguna orientación concreta, generando nuevos caracteres que se desvían constantemente de la media, de modo que la curva se aplana y se ensancha. Este fenómeno se llama **presión de mutación** y su influencia consiste en ir disminuyendo la frecuencia relativa de los individuos más aptos.



Pero estas desviaciones son controladas por la selección. Los individuos que se apartan de la media son generalmente eliminados, y más cuanto mayor sea su desviación. La curva vuelve a estrecharse y a hacerse más alta. A esto se le llama **presión selectiva**. La selección tiende a mantener un nivel óptimo asegurando los logros conseguidos durante generaciones y eliminando los individuos divergentes. Este aspecto fundamental de la selección recibe el nombre de **selección estabilizadora**, estableciéndose un equilibrio entre mutación y selección.



Este rigor selectivo en contra de la mutación se da, sobre todo, en medios poco cambiantes. Es lo que ocurre con los llamados "**fósiles vivientes**" de los que ya habló Darwin. Es el caso de los árboles Ginkgo, la Araucaria y las Secuoyas gigantes; también el caracol Neopilina, descubierto en 1951 a 3500 metros de profundidad, el Celacanto, que se creía extinto hasta que se redescubrió en las Islas Comores, y el Nautilo o los cangrejos Cacerola de las Molucas. Todos ellos existen prácticamente sin variación alguna desde hace millones de años, dato que nos proporciona el registro fósil. Impresionante es el caso del lagarto tuátera, que vive en algunas islas de Nueva Zelanda, y que apenas ha experimentado cambios desde hace 170 millones de años. Toda la región australiana es rica en este tipo de seres, ya que quedó aislada hace 65 millones de años del resto del mundo.

El hecho de que algunos animales sean ciegos o tengan una piel pálida también se relaciona con la selección estabilizadora. Cuando estos animales desplazaron su hábitat a las cavernas, la selección dejó de ejercer presión sobre estos caracteres: ni el color de la piel tenía sentido para el camuflaje, por ejemplo, ni la vista era muy necesaria, de modo que **la presión de mutación tomó la delantera**. Estos caracteres suelen estar regidos por varios genes y un cambio en uno solo de ellos provoca la atrofia de todo el órgano. La presión de mutación también favoreció en estos seres el desarrollo de nuevas estructuras, como largos tentáculos, pelos sensibles y líneas laterales en los peces.

Cuando se produce la alteración en el medio ambiente, los organismos favorecidos son precisamente esos que se desvían de la media. La selección ejerce en estos casos una presión direccional más o menos fuerte y desplaza la media hacia una mayor adaptación a las nuevas circunstancias. Van siendo eliminados ciertos alelos que habían sido útiles y se van fijando otros que son más convenientes. **El patrimonio genético cambia y se produce el proceso evolutivo**. Se trata de una **selección transformadora: es una selección direccional y progresivamente modificadora**. Como se originan nuevas combinaciones de genes y nuevas especies se dice que la selección es en este caso creadora. Pero resulta imprescindible que para que esto ocurra se produzcan cambios en el medio ambiente.

La **selección sexual** es una forma especial de selección natural. De la misma manera que en otros casos, los organismos más eficaces para asegurarse su pareja consiguen con ello una mayor adecuación.

Hay dos circunstancias generales que conducen a la selección sexual: una es la preferencia de un sexo (frecuentemente las hembras) por individuos del sexo opuesto que presentan determinadas características; la otra es el aumento en fortaleza (usualmente entre los machos) que les permite el éxito en el apareamiento.

Ejemplos de selección a la luz de la genética de poblaciones hay muchos. Todos se explican bajo el concepto de **eficacia biológica**, que se entiende como eficacia media de un genotipo en una población, nunca en un individuo concreto. Aunque no vamos a entrar en ello, para la mate matización de esta cuestión se ha recurrido a la **eficacia biológica independiente de la**

frecuencia. En la realidad, sin embargo, un número muy alto de procesos selectivos depende de las frecuencias génicas, de modo que esto se debe tener en cuenta y "no confundir la conveniencia con la realidad".

Podemos ver cómo los numerosos **errores congénitos del metabolismo** se dan porque un alelo recesivo interfiere una ruta metabólica y causa la letalidad de los homocigotos. Son casos que sirven para ilustrar las diferencias en eficacias biológicas provocadas por la sustitución de un gen. Citaremos la **fenilcetonuria**, y la **enfermedad de Wilson** (en la que la muerte resulta por intoxicación con cobre, debido a que la ruta de destoxificación está interrumpida).

Un caso que ilustra la relación entre la eficacia biológica y el ambiente es el de la **anemia falciforme**. Una sustitución alélica en el locus del gen estructural de la cadena α de la hemoglobina (la hemoglobina, Hb, está formada por cuatro polipéptidos, dos de ellos reciben el nombre de cadenas α y los otros dos, β), provoca la sustitución por valina del ácido glutámico normal en posición 6. La hemoglobina anormal cristaliza a bajas presiones de oxígeno, y los glóbulos rojos se deforman y se hemolizan. Los homocigotos $Hb^S Hb^S$ presentan una anemia grave con supervivencia baja; los heterocigotos $Hb^A Hb^S$ presentan una anemia leve y, bajo circunstancias normales, presentan la misma eficacia biológica que los homocigotos normales $Hb^A Hb^A$. Sin embargo, en las regiones de África con una incidencia alta de paludismo, los heterocigotos presentan una eficacia biológica mayor que los homocigotos normales, porque la presencia de alguna cantidad de hemoglobina falciforme protege de alguna manera frente al protozoo del paludismo. Donde no hay paludismo, se pierde eficacia biológica.

2.4.3- Estudio poblacional aplicado a la identificación genética, ejemplo:

A la hora de seleccionar un STR para uso forense se requiere que éste cumpla una serie de características como son:

- una alta heterozigosidad: la heterozigosidad es un parámetro estadístico que está relacionado con el polimorfismo de un determinado marcador. Un valor alto de heterozigosidad es indicativo de un alto grado de polimorfismo.
- una tasa de mutación baja, ya que marcadores con una tasa de mutación alta podrían presentar variaciones de una generación a otra y, en el caso de un estudio biológico de paternidad originar una falsa exclusión
- fácilmente amplificable mediante PCR
- de pequeño tamaño y,
- fácilmente coamplificable junto a otros STR en una misma reacción de PCR. Esto es lo que se denomina "múltiple PCR". Actualmente existen

kits comerciales que proporcionan los reactivos necesarios para la amplificación conjunta de un número determinado de STRs. Por ejemplo uno de los más utilizados en los laboratorios de Genética Forense es el llamado PowerPlex de la casa Promega y que permite amplificar en una sola reacción de PCR 15 loci tipo STR más otro locus (llamado amelogenina) que no es un STR pero es muy utilizado para el diagnóstico del sexo.

Según lo expuesto puede deducirse que cualquier STR del genoma no puede ser utilizado para la identificación genética.

Un requisito fundamental para poder utilizar nuevos polimorfismos de ADN con fines identificativos y obtener resultados altamente fiables es el estudio y caracterización de dichos polimorfismos en la población que posteriormente se utilizará como referencia, esto es lo que en Genética Forense se denominan **Estudios Poblacionales**.

ESTUDIOS POBLACIONALES

En primer lugar es necesario un grupo de individuos (o muestra) de la población a la que pertenezca el laboratorio ya que sería imposible realizar un estudio de todos y cada uno de los individuos. Los estadísticos recomiendan que para que los resultados sean significativos el tamaño de la muestra debe ser como mínimo de 200 individuos. Además es importante que los diferentes individuos que van a analizarse no tengan ninguna relación de parentesco entre si, ya que la consanguinidad puede alterar las frecuencias génicas.

Son varios los objetivos de un estudio poblacional:

1. Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los marcadores que se esté estudiando.
2. Confirmar que el locus o los loci estudiados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.
3. Estudio de la independencia del marcador analizado con respecto al grupo de marcadores utilizados en el laboratorio para la identificación.
4. Comparación de los resultados obtenidos en nuestra población con los obtenidos para otras poblaciones.

Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas

Para determinar las frecuencias genotípicas debemos establecer los distintos genotipos encontrados en nuestra muestra poblacional y contar el número de individuos que tienen cada uno de esos genotipos. La frecuencia

para cada genotipo se calculará dividiendo el número de individuos que tienen ese genotipo entre el número total de individuos analizados.

Para el cálculo de las frecuencias alélicas el procedimiento es el mismo. En este caso se hace un recuento de todos los alelos encontrados en la población y se divide el número de veces que se repite cada alelo entre el número total de alelos.

Demostración del equilibrio de Hardy-Weinberg

Esta ley es el principio básico de la Genética de Poblaciones y fue postulada en 1908 de manera independiente por dos científicos: George Hardy, matemático inglés, y Wilhelm Weinberg, médico alemán.

Según esta ley en *toda población de gran tamaño en la que los apareamientos se dan al azar (población panmíctica) y en la que hay ausencia de fuerzas evolutivas como la mutación, selección y migración, las frecuencias génicas (o alélicas) y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación*. Una población que cumpla dichas características se dice que está en equilibrio de Hardy-Weinberg y sus frecuencias genotípicas estarán determinadas por sus frecuencias génicas según la fórmula siguiente:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Lo que se hace en un estudio poblacional es calcular las frecuencias alélicas que debería tener nuestra población si siguiese la ley de Hardy-Weinberg, es lo que se denomina frecuencias alélicas esperadas. Las frecuencias alélicas esperadas se comparan mediante un test estadístico con las frecuencias alélicas observadas en nuestra población.

Si el resultado de dicho test no es significativo podremos afirmar que para ese locus nuestra población cumple la ley de Hardy-Weinberg, se encuentra en equilibrio y por lo tanto las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes de generación en generación (en ausencia de fuerzas evolutivas como son la mutación, la migración y la deriva genética). En este caso nuestro marcador cumpliría uno de los requisitos más importantes para poder ser aplicado en el estudio biológico de paternidad, en casos de criminalística y en casos de identificación humana.

Estudio de la independencia de los marcadores STR

Para poder calcular la probabilidad de un perfil genético a partir de un determinado número de marcadores STR, es necesario que dichos marcadores sean independientes, es decir que no exista ligamiento entre ellos. Esto quiere decir que la presencia de un determinado alelo no debe llevar aparejada la de otro determinado o, por el contrario, que el que aparezca ese alelo implique que otro no lo haga.

Para este estudio se suele aplicar un test estadístico (test de Karlin) que compara todas las frecuencias alélicas de los marcadores STR que estemos utilizando y establece si hay o no relación entre ellas.

Comparaciones Poblacionales

Otro objetivo de los estudios poblacionales es la comparación entre poblaciones o entre subpoblaciones (población que muestra subestructura) de la distribución de frecuencias alélicas. Desde el punto de vista genético-forense, la existencia de subpoblaciones se debe a la existencia de grupos con características identificadoras específicas que los diferencian del grupo general en el que habitualmente se les incluye.

Por lo tanto, las diferencias entre frecuencias alélicas y genotípicas entre diferentes grupos hace que, según la población que se tome de referencia la probabilidad con que se incluye a un determinado sospechoso sea más o menos elevada. No obstante, parece que no podemos hablar de diferencias significativas en las distribuciones alélicas y genotípicas entre subpoblaciones de un mismo grupo racial, ya que diversos estudios poblacionales a lo largo de los últimos años lo han ido demostrando.

Sin embargo, si puede hablarse de cierta variación (que incluso en algunos casos no es altamente significativa) entre razas en cuanto a distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de algunos marcadores utilizados con fines identificativos.

APLICACIONES DEL ESTUDIO DE MICROSATÉLITES

La espectacular evolución de las técnicas de análisis de ADN han permitido un amplio conocimiento y descubrimiento de nuevos microsatélites.

Este amplio conocimiento ha llevado a la aplicación de este tipo de secuencias de ADN no codificante a diversos campos de la Biología y Medicina como son: el estudio biológico de la paternidad, la criminalística, estudios filogenéticos tanto animales como vegetales, diagnóstico de enfermedades de origen genético, etc. Nos centraremos en las aplicaciones dentro del campo de la Genética Forense.

Estudio biológico de la paternidad

Los estudios biológicos de paternidad basados en el ADN o pruebas de paternidad (como se conocen vulgarmente), tienen su fundamento en que el ADN de cada individuo procede tanto del padre como de la madre, es decir la mitad del ADN es de origen materno y la otra mitad de origen paterno.

Actualmente los estudios de paternidad se realizan analizando un número suficientes de STRs de manera que la certeza y la fiabilidad de la prueba está muy cercana al 100%.

Los casos más habituales son aquellos en los que se dispone de material genético de la madre, del padre y del hijo. No obstante, también es

posible llevar a cabo estudios de paternidad en ausencia de la madre, o del padre.

Resolución de casos en Criminalística

Las ventajas aportadas por el análisis de marcadores tipo STR (sobre todo con los sistemas actuales) ha permitido evolucionar de manera considerable en la resolución de casos criminales. Frecuentemente los indicios biológicos de interés en criminalística se encuentran en cantidades muy pequeñas, a veces ínfimas, y además en muchos casos dichos indicios han estado sometidos a condiciones extremas de calor y humedad (lo cual, como ya sabemos afecta considerablemente a la calidad del ADN).

Las primeras técnicas utilizadas en el análisis de los primeros polimorfismos, presentaban la desventaja de que necesitaban un ADN de alta calidad y en gran cantidad. Sin embargo, desde el descubrimiento de la técnica de la PCR y, sobre todo, con la aplicación del análisis de marcadores microsatélite, las posibilidades de obtener resultados en muestras biológicas mínimas y/o degradadas son mucho más esperanzadoras.

La complejidad del análisis como la calidad de los resultados en estos casos va a depender de varios factores:

- **Cantidad de ADN:** esto dependerá del número de células nucleadas que contenga el vestigio biológico. En principio, la dificultad de un caso en el que el único material biológico encontrado en la escena del crimen sea un pelo será mucho mayor que en el caso de encontrar varias manchas de sangre.
- **Calidad del ADN:** Si el ADN está altamente degradado o contaminado puede llegar a no ser útil para el estudio de identificación o presentar serias dificultades para la obtención de resultados. Por ello es de gran importancia la recogida, el transporte y las condiciones de conservación de los vestigios biológicos en las etapas previas a su llegada al laboratorio, así como en el mismo laboratorio.
- Las **técnicas** utilizadas: en la mayoría de los casos forenses los vestigios biológicos son escasos y se encuentran degradados. Por ello es importante disponer de la mejor y más moderna tecnología. Los sistemas actuales de amplificación y posterior detección en equipos de electroforesis capilar, permiten la obtención de resultados a partir de cantidades mínimas de ADN (entre 0.5 y 1 ng).

En la investigación de un hecho criminal la prueba del ADN consiste básicamente en la comparación del perfil genético obtenido a partir de la evidencia con el perfil genético del sospechoso/s.

Si no existe coincidencia entre los dos perfiles genéticos analizados (evidencia y sospechoso) podrá asegurarse que la evidencia no procede del sospechoso. En este caso la exclusión del sospechoso como fuente de la evidencia es absoluta, y no es necesario realizar cálculos estadísticos.

En cambio, si existe coincidencia entre los dos perfiles genéticos, habrá que valorar la probabilidad de que la evidencia proceda del sospechoso, lo cual dependerá de la frecuencia obtenida para ese determinado perfil en la población. Para ello se calculan las frecuencias genotípicas de cada uno de los marcadores analizados y se multiplican entre sí.

2.5- BASES DE DATOS

Las ventajas aportadas por el ADN son:

1. Aumento de la probabilidad de discriminación.
2. Posibilidad de estudiar indicios mínimos.
3. Capacidad de estudiar cualquier célula y/o tejido.
4. Permite estudiar muestras antiguas y/o degradadas.
5. No hay intromisión en el código genético.
6. Permite el estudio de indicios atípicos.
7. Posibilita la creación de bases de datos muy efectivas.

Es cierto que en los últimos años, el desarrollo de técnicas de análisis de todo tipo se ha visto directamente beneficiado por el paralelo avance en el diseño e implementación de máquinas y aparatos que son capaces de automatizar los procesos de trabajo, de tal modo que en cortos períodos de tiempo se genera gran cantidad de resultados.

Esta cantidad de información extraordinaria ha de almacenarse de modo racional y ordenada para su posterior uso. Surge así la necesidad de las denominadas bases de datos como aquellos lugares donde se almacena de modo ordenado y coherente cualquier tipo de información (usualmente en ordenadores o computadores, por tanto informatizada), que luego es rescatada de modo automático de acuerdo a parámetros previamente establecidos.

El acceso a las bases de datos es restringido, dependiendo de la trascendencia de los datos almacenados, siendo los más protegidos aquellos que contienen información sobre la 'intimidad' de las personas. La gran mayoría de los países tiene legislación al respecto en esta materia, y la misma ha de ser conocida y debe cumplirse en el momento de su creación y durante toda la existencia de la misma.

Paralelamente, en el ámbito científico nadie duda que una de las más importantes vías de conocimiento surge del manejo apropiado de los datos acumulados que se van generando en diversas investigaciones, algunas de ellas inicialmente ni siquiera relacionadas entre sí. Campos enteros del saber, como la epidemiología y la bioestadística, aposentán sus raíces en el estudio matemático de los datos acumulados por los investigadores, con el simple objeto de obtener resultados sólidos y objetivos.

Por todo ello, nadie puede dudar que acumular datos es necesario, y nadie puede acotar la libre generación de los mismos, en tanto en cuanto sean útiles a la sociedad en general y a las personas en particular. Ahora bien, es imprescindible que las bases de datos de ADN estén perfectamente reguladas y que ofrezcan las máximas garantías a los ciudadanos, y por ello conviene conocer perfectamente lo

que son y lo que contienen, así como importante es conocer lo que no son y lo que no contienen.

2.5.1- Clasificación de las bases de datos en genética forense.

En el área genética forense, donde lo que nos ocupa es la identificación, existe una gran confusión por parte del público en general a la hora de hablar de bases de datos y de definirlos. El problema sería sólo semántico de no ser que, si no se define y se conoce bien la materia de la que se está hablando, se sienta con ello la base de futuras legislaciones que serán incompletas o ineficaces.

Y es que normalmente se confunden con extremada frecuencia lo que son simplemente **datos** con lo que son **materiales biológicos** de los cuales se obtienen los datos.

-A efectos de identificación genética, los datos son números y letras que representan un conocimiento restringido obtenido previamente desde materiales biológicos a través de un método científico. En algunos lugares es habitual usar el término “perfil de ADN” para referirse a ese conjunto de datos. Los datos contienen una información, más o menos completa, pero de los mismos no se puede obtener más conocimiento del previamente estipulado.

-Los materiales biológicos son los tejidos humanos, sólidos o líquidos (secos o húmedos) que contienen células con núcleo y/o mitocondrias a partir de las cuales y a través de un método científico se obtienen datos de interés forense.

No se deben, pues, confundir estos conceptos, ya que son el equivalente al “todo y la parte”. Desde el material biológico se puede obtener todo tipo de datos (no sólo los de interés forense), mientras que de los datos forenses no se puede obtener material biológico, pero tampoco (pese a que todos los datos sean interpretables) se pueden obtener de modo general conclusiones diferentes a las relacionadas con la mera identificación.

2.5.2- Clasificación de las bases de datos.

Básicamente, son dos los criterios que pueden usarse para clasificar las bases de datos: según su contenido o según su finalidad.

2.5.2.1- Clasificación según el contenido

Las bases de datos pueden contener sólo datos alfanuméricos, ADN

extraído o material biológico. Como tales, bases de datos son sólo las primeras, es decir, aquellas que en un soporte de papel o informático, contienen letras y números que identifican a una persona de entre todas las demás. Las agrupaciones de muestras biológicas y de ADN ya extraídos son realmente "archivos biológicos".

- **Datos de identificación genética:** corresponden al primer grupo y contienen números y letras asociados al código de identificación de una persona. Son bases virtuales, o sea, datos que existen simplemente en archivos informáticos o impresos en papeles. El acceso a los datos debe estar perfectamente controlado, y las conclusiones que se pueden obtener de los mismos van a depender de los programas informáticos que se autoricen por las diferentes legislaciones.

- **Archivos de ADN :** ya no son bases de datos como tales, en tanto en cuanto no acumulan 'datos' a los que se puede acceder de modo automatizado, sino que contienen muestras de ADN ya extraído del núcleo celular y de las mitocondrias, dispuesto para ser analizado (en sus regiones codificantes y no codificantes) con la técnica o técnicas adecuadas.

Como ya advertimos, suele confundirse, por parte de personas inexpertas este tipo de archivos con las bases de datos, y se advierte de la espacialísima y restrictiva regulación que las bases de datos necesitan porque, suele argumentarse, podrían obtenerse datos críticos de las mismas.

Por lo que pudiere afectar a los laboratorios forenses, querríamos destacar que la gran mayoría de las veces la cantidad y calidad de las muestras de ADN que se almacenan son tan mínimas, que no permitirían los análisis de ciertos fragmentos de ADN, especialmente de los grandes fragmentos que habitualmente conforman los exones. Esto es especialmente cierto si nos referimos a los indicios biológicos criminales.

- **Archivos de muestras biológicas:** tampoco son 'bases de datos' en sí, ya que representan una especie de escalafón inferior en comparación con los archivos de ADN. En cualquier laboratorio forense, pero también en laboratorios de análisis clínicos, en hospitales, clínicas, sanatorios, etc., almacenan muestras biológicas (sangre, semen, orina, biopsias) de modo más o menos controlado. A las mismas se puede o podría acceder y proceder a obtener ADN para realizar posteriores análisis de uno u otro tipo.

2.5.2.2- Clasificación según finalidad

Según su Finalidad, las bases de datos pueden ser generales, profesionales y judiciales o forenses.

- **Generales:** comprenderían a toda una población o país, y en este

momento no hay ninguna en marcha en el mundo. La más amplia corresponde a la población de Islandia, y es con consentimiento de los donantes y con fines médicos de investigación de características de interés genético biomédico, al tratarse de una población peculiar.

- **Profesionales:** incluyen a profesionales de riesgo, siendo el principal y mayor de los ejemplos el repositorio de material biológico de las fuerzas armadas de los Estados Unidos. Realmente es un archivo biológico de muestras de sangre que han sido obtenidas con consentimiento y sólo se analizan en caso de necesidad.

Fue creado en el año 1993 y comenzó a funcionar en 1994, teniendo como objetivo el guardar material biológico de referencia de profesionales militares (y también de civiles que trabajan para el Ministerio de Defensa). Este material se usará exclusivamente en caso de necesidad para identificar a los restos del donante en caso de que haya fallecido en trágicas circunstancias o haya sido dado por desaparecido.

La posibilidad de acceder a un material directo de la persona facilita enormemente el análisis comparativo de ADN, ya que no es necesario acudir a materiales de familiares de referencia, que si bien puede ser útil en el caso de los linajes mitocondriales y del cromosoma Y (en varones), se complica para el análisis del ADN autosómico.

De igual modo y a título meramente privado o particular, hay diferentes compañías civiles y personas que han archivado muestras biológicas de sus empleados (especialmente los que están expuestos a riesgos especiales por su profesión) con fines similares a los de las Fuerzas Armadas de Estados Unidos.

- **Judiciales o Forenses:** son las que realmente nos ocupan, y a su vez pueden ser de tipo criminal y de tipo civil. Las analizaremos con detalle en el apartado siguiente, pero resumimos sus características básicas a continuación.

-Bases de datos forenses criminales: de modo general, almacenan datos procedentes de personas que han sido procesadas o condenadas, así como de indicios biológicos encontrados en la escena del crimen; en algunos casos pueden considerarse perfiles de víctimas conocidas, con objeto de facilitar la resolución de delitos. Su característica principal es que algunas de las muestras y datos considerados se obtienen sin el consentimiento de las personas implicadas. *LEY ORGÁNICA 10/2007, de 8 de octubre, reguladora de la base de datos policial sobre identificadores obtenidos a partir del ADN.*

-Bases de datos forenses civiles: su único fin es la identificación de personas (niños y adultos) desaparecidos, lo cual se hace comparando el ADN de las personas no identificadas (normalmente restos óseos) con el de los familiares.

Por sus características humanitarias, es requerimiento ético que los familiares colaboren voluntariamente y tras firmar un consentimiento informado, hecho éste que las diferencia de las bases de datos criminales.

Por lo tanto, las bases de datos de utilidad en el área forense o judicial son bases de datos de criminales identificación genética (BDCIG), que contienen sólo datos alfanuméricos de identificación y cuya finalidad es ayudar a la Justicia en la resolución de casos criminales o en identificaciones civiles.

2.5.3- Generación de bases de datos de identificación genética.

Crear una base de datos de identificación genética se reduce a introducir números y letras en un programa informático que permita establecer comparaciones para buscar datos idénticos o similares.

Sin embargo, el proceso es mucho más complejo y lento, y es necesario mencionar en este momento que el proceso para generar una buena base de datos comienza realmente con un buen análisis de las muestras y, a su vez, un buen análisis estriba en unas muestras que hayan sido identificadas, recolectadas y trasladadas adecuadamente desde el lugar de aparición o escena del crimen hasta el laboratorio.

Es de destacar que las computadoras u ordenadores no necesitan ser especiales, siendo válidos la mayoría de los computadores modernos actuales, o sea, aquellos que en el momento de su uso sean de 'última generación'. El modelo exacto vendrá determinando por el programa informático, que es el que marca los requerimientos. Lo que sí es imprescindible en todo caso y en cualquier momento son las siguientes características.

- **Acceso restringido y bajo códigos de protección:** implica que sólo un número limitado de personas y usando unos códigos o claves secretas pueden tener acceso a estos ordenadores. De este modo, sólo personas expresamente autorizadas pueden usarlos, y además, queda constancia de la persona que lo usó, el día, la hora y las consultas o cambios que hizo.

- **Ningún tipo de conexión a la red de Internet o correo electrónico:** de este modo se evitan dos graves problemas. En primer lugar, la posible infección o afectación del ordenador por un virus informático, y en segundo lugar la posibilidad de que se introduzcan los denominados "hackers" o piratas informáticos que puedan acceder y manipular (o simplemente consultar) una información sensible y confidencial. Esto no impide que estos ordenadores puedan estar conectados a redes internas de alta seguridad (intranet) con las características de encriptación y control adecuadas.

- **Disociación de los datos que contienen:** esta es una de las claves de

este tipo de bases de datos, de tal modo que en un mismo ordenador no se puedan llegar a ver todos los datos que identifiquen por completo a un caso o a una persona. Normalmente un perfil de ADN va asociado a un número o código alfanumérico, y para establecer la identidad es necesario acudir a otro segundo ordenador, con las medidas de control adecuadas.

2.5.4-Bases de datos de identificación genética civiles: programa Fénix.

Las bases de datos de identificación genética civiles pretenden colaborar en la resolución de casos judiciales donde el interés primordial es la identificación de los cadáveres y osamentas, deber fundamental y obligación no sólo derivada de la legislación vigente, sino como acto de responsabilidad moral y humana.

El problema de las personas desaparecidas y de los cadáveres y osamentas no identificados es un problema universal, propio de la dinámica de la vida social cualquier país, pero que puede verse agravada por situaciones de especial violencia o por problemas socio-políticos. En este contexto, no cabe duda de que en la historia reciente, muchos países de Latinoamérica ocupan una triste privilegiada posición en la lista de lugares donde han desaparecido miles de personas por las circunstancias antes descritas.

Es por tanto un asunto judicial (por originar una investigación tutelada más o menos directamente por el poder judicial), un asunto policial (porque los cuerpos policiales de seguridad inician unas investigaciones), un asunto familiar (por la afectación que supone en familiares, amigos y compañeros). Todo esto lo convierte en un asunto o tema de trascendencia social, pero, más aún, y más allá de la trascendencia social, es un asunto humano, que nos afecta a todos como personas, como seres humanos, por la obligación genérica que como personas tenemos de tratar de identificar y dar sepultura a cualquier otro ser humano, como así se ha venido haciendo desde los más remotos tiempos en la historia de la humanidad (muchas de las grandes investigaciones que se hacen y han hecho se han basado en el estudio de lugares de enterramiento o cementerios prehistóricos).

Entendemos que, por ello, sería de especial interés la progresiva implantación de bases de datos de personas desaparecidas, desarrolladas de acuerdo a las posibilidades y circunstancias de cada país, pero con la posibilidad de intercambiar de modo automatizado los datos, permitiendo búsquedas internacionales.

PROGRAMA FENIX:

España fue pionera en el mundo en la creación de una base de datos genética de personas desaparecidas. Dicho proyecto ha sido bautizado con el nombre de 'Programa Fénix' (Programa Fénix de Identificación Genética de

Personas Desaparecidas y surgió en 1997 como consecuencia de un convenio de colaboración entre la Guardia Civil (Ministerio del Interior) y la Universidad de Granada. Las máximas autoridades de las dos instituciones eran entonces el Ilmo. Sr. D. Santiago Valdivieso (Director General de la Guardia Civil, con el Excmo. Sr. D. Jaime Mayor Oreja como Ministro del Interior), y el Excmo. Sr. D. Lorenzo Morillas Cueva (Rector Magnífico de la Universidad de Granada).

Los objetivos primordiales del Proyecto Fénix son la **creación de dos bases de datos**: una en la que se incluyan los perfiles genéticos de los familiares de los desaparecidos y otra con los perfiles de los restos óseos encontrados en cualquier punto de España y que no hayan sido identificados (en España se estima que existen casi 2000 restos óseos no identificados). Estas cifras son "normales", proporcionales, si se comparan con las de países del entorno europeo, aunque España tiene un problema especial debido a que es la frontera sur de la Unión Europea (UE).

PROTOCOLO DE TRABAJO

El protocolo de trabajo y actuación del Programa Fénix contempla dos vías paralelas de trabajo, independientes entre sí:

- La de **muestras sin identificar**, que forma la Base de datos Q (del inglés, questioned).
- La de **muestras de referencia de familiares**, que forma la Base de datos R (de referencia).

La **base de datos cuestionada o dubitada (Q)** está compuesta por perfiles de ADN mitocondrial obtenido de los huesos, dientes y otros restos biológicos (según la data) de cadáveres que no han podido ser identificados por las técnicas médico-legales, antropológicas y odontológicas clásicas. Las muestras se obtienen con autorización judicial, y una vez obtenidas a cada pieza se le asigna un código de barras y una numeración que permite disociar o separar los datos del resto biológico de los de la información referente al caso. Estas muestras son analizadas mayoritariamente por el Laboratorio de ADN de la Guardia Civil.

La **base de datos de referencia o indubitada (R)** está compuesta por ADN mitocondrial obtenido de muestras biológicas (en España, de saliva) obtenidas de familiares genéticamente relacionados con la persona desaparecida y que han querido colaborar voluntariamente.

Estas personas firman un protocolo de consentimiento informado antes de donar la muestra. Los familiares disponen de un teléfono gratuito de llamada, y tras dar su dirección postal se les envía información completa por escrito sobre lo que es el programa Fénix, lo que se puede esperar del mismo y lo que no se puede alcanzar. Posteriormente, los familiares rellenan una solicitud por escrito

que envían para solicitar que se tomen las muestras, lo que se hace cuándo y dónde los familiares quieren, sin coste alguno para los mismos.

Los datos obtenidos de los huesos se comparan con los de los familiares por medio de un programa denominado **MitoSearch** (cedido por el Dr. Bruce Budowle, FBI). Cuando existe una posible identificación positiva, se trata de hacer un estudio con ADN nuclear para confirmar o descartar los hallazgos. El ADN mitocondrial es menos informativo que el nuclear, pero se prefiere su uso en la primera fase del análisis porque las posibilidades de obtener resultados con el mismo son, en general, mayores que las que se obtienen con el ADN nuclear.

Paralelamente, cada vez que se sospecha la identidad del cadáver, sobre el mismo se aplican todas las otras técnicas de identificación existentes (odontología, antropología, datos policiales), siempre que las condiciones de los restos lo permitan.

En la actualidad, en los **Estados Unidos**, el FBI tiene en marcha un programa muy similar al español denominado National DNA Database on Missing Persons que comenzó su singladura práctica en 2001-2002.

En **Latinoamérica**, Colombia, tomando como modelo el sistema español, se está implementando el Programa Fénix -Colombia, al igual que en México, en el Estado de Chihuahua y a nivel federal, por parte de la Procuraduría General de la República.

2.5.5- Bases de datos de identificación criminal

Las bases de datos criminales pretenden ayudar en la identificación de los autores de delitos en los que hayan quedado como indicios restos biológicos. De este modo muchos de los delitos que quedan sin resolver porque, en un momento determinado, no haya un sospechoso podrán ser resueltos con posterioridad, incluso años después de que se hayan cometido.

Las mismas pretenden colaborar en la resolución de casos judiciales criminales permitiendo a las fuerzas investigadoras la comparación automatizada de perfiles de ADN procedentes de diversas fuentes: indicios no identificados de la escena del crimen, muestras de referencia de sospechosos o convictos y muestras de referencia de víctimas.

Tras las comparaciones pertinentes y con un número suficiente de muestras analizadas, se puede comprobar si una persona (imputado, procesado o condenado) ha dejado indicios biológicos en más de una escena criminal o sobre más de una víctima. Este es uno de los medios más eficaces de controlar a los criminales en serie y a los delincuentes reincidentes, muy típico en casos de violaciones. Cuando la búsqueda en las bases de datos pone en relación a un presunto criminal con unos indicios (por ende, con un delito), aparece lo que se

denomina '**identificación en frío**'. Del mismo modo, se puede encontrar que una serie de violaciones han sido cometidas por la misma persona, porque el ADN del esperma coincide en todos los casos, pese a que aún no se haya podido detener a ningún responsable.

FUNCIONAMIENTO

Para ello se almacenan básicamente datos procedentes de los resultados del análisis de los indicios y de los sospechosos o condenados. En algunos casos se contempla la posibilidad de guardar datos de las víctimas, con las correspondientes autorizaciones legales o consentimiento, sobre todo en casos de indicios de personas que han podido ser víctimas de un ataque muy grave pero cuyo cuerpo, herido o sin vida, no aparece.

En la práctica y para su uso, las bases de datos de identificación genética están **ubicadas en un ordenador** o computador que permite la comparación automatizada a gran velocidad de los denominados '**perfiles de ADN**', perfiles que no son sino los números y letras que identifican a los fragmentos de ADN, y cuya cadencia exacta es única para cada persona (en el caso del ADN nuclear, excepto gemelos univitelinos), y única por linajes de común ancestro en el caso del ADN mitocondrial (vía materna en todas las personas) y del cromosoma 'Y' (vía paterna en varones).

EL SISTEMA CODIS

Como se mencionó con anterioridad, existen diferentes bases de datos en marcha en este momento, y entre todas ellas, la que nos parece que tiene más capacidad de aplicación para el área Latinoamericana es el **sistema CODIS** (Combined DNA Index System) desarrollado en Estados Unidos por el FBI, y de aplicación positiva en la práctica. Las ventajas que hacen de CODIS un gran instrumento de trabajo pueden resumirse en las siguientes:

1. Diseñado para permitir la compatibilidad y el trabajo independiente de diferentes laboratorios.
2. Posibilidad de acúmulo e intercambio de datos a diferentes niveles: local (L -DIS), Estatal (S-DIS) y Nacional (N-DIS); el conjunto es lo que conforma el sistema CODIS.
3. Contiene diferentes apartados o índices, incluyendo los criminales (indicios, sospechosos,...) y civiles de personas desaparecidas (cadáveres y huesos sin identificar y familiares de referencia).
4. Instalación y asesoramiento gratis por parte de los Estados Unidos a través del FBI a los laboratorios oficiales de los diferentes países, siempre que haya una petición oficial y se den una serie de circunstancias favorables.

2.5.6- Problemas legales y éticos en la recogida de muestras en las bases de datos criminales (BDGIC)

Sin duda alguna, el principal problema surge ante la posibilidad de una negativa del consentimiento para la toma de muestras del sospechoso, procesado o condenado. Si este tipo de personas se niega a que se le tome una muestra biológica que sirva de referencia indubitada para comparar, la capacidad de resolver casos puede verse afectada.

Esto no sólo afecta a las bases de datos, sino que es capaz de interferir con las investigaciones criminales rutinarias. Sería el caso de un presunto homicida que se niega a ceder material biológico para comparar su ADN con el encontrado en restos de sangre hallados sobre la víctima.

Las especiales circunstancias de la prueba en el campo del derecho penal implican por un lado, el supuesto de la falta de colaboración y por otro, la necesidad de informar de las consecuencias jurídicas que puedan derivarse de su realización. Así, este tipo de pruebas que se llevan a cabo dentro de una investigación judicial y que en muchas ocasiones son imprescindibles para averiguar la identidad del autor de los hechos, conlleva necesariamente la existencia de otras pruebas o indicios que indiquen la relación del encausado con los hechos, pudiendo por tanto el Juez sustituir el consentimiento del encausado por medio de una resolución motivada para que el acto médico sea lícito.

Siendo conscientes de que las regulaciones jurídicas y las leyes varían según el país que se considere, de modo genérico y basados en la Constitución Española de 1978, nos atrevemos a señalar los que serían, en la mayoría de los países, derechos que, en caso de ausencia de legislación específica, se violarían si se pretendiese forzar a una persona a dar una muestra biológica sin su consentimiento.

1. Derecho a la libertad de movimientos.
2. Derecho a la integridad física.
3. Derecho a no declarar contra si mismo.
4. Derecho a no declararse culpable.
5. Derecho a la presunción de inocencia.

Queda totalmente fuera del ámbito de este trabajo el valorar los anteriores puntos, que han de servir básicamente como referencia ante los parlamentos de los diferentes países que han de valorar cómo una legislación específica sobre bases de datos podría interferir con estos derechos fundamentales, donde allí estuvieren reconocidos.

2.5.7-Estrategias y aspectos técnicos legislativos a considerar en la creación de bases de datos criminales (BDGIC).

Diversas son las cuestiones técnicas que han de observarse en todos los países para tener bases de datos criminales de identificación genética realmente operativas. Son cuestiones meramente técnicas, aunque de mucha trascendencia. Por sus características, no suelen afectar directamente derechos fundamentales y pueden cambiarse con relativa facilidad en caso de que el poder legislativo así lo decida.

Cada estado y país tiene absoluta libertad para emitir disposiciones al respecto, y las comparaciones que iremos analizando nos muestra hasta qué punto es cierto esta afirmación. Por ello, estratégicamente, cada país debería hacer un estudio previo sobre el **'estado de la criminalidad'** en los últimos diez años, sus tendencias y las medidas que se han puesto en marcha o se pretenden poner en marcha para su control y disminución.

Estimamos, por ello, que sería aconsejable, por tanto, que tras conocer los datos mencionados anteriormente, cada país hiciese un **borrador o anteproyecto de legislación** adaptado a sus necesidades, y que luego buscarse las comparaciones con las legislaciones vigentes, ya que el considerar en exceso legislaciones existentes en otros países que pudieren no ser de aplicación en el país que pretende legislar, puede complicar técnicamente la elaboración del articulado sin beneficio final alguno.

Digamos, finalmente, que la gran mayoría de estas consideraciones no tienen un soporte científico-técnico, en otras palabras, a los científicos y expertos en genética forense no les afecta directamente (salvo los aspectos meramente técnicos). Por lo tanto, estarán exclusivamente animadas por el espíritu que impregne a los legisladores en cada país y en cada momento. Estos aspectos a considerar serían:

1. Tipo de personas consideradas e incluídas
2. Tipo de delitos
3. Duración de los datos en la base
4. Almacenamiento de indicios y muestras de referencia
5. Datos técnicos y operativos

TIPOS DE PERSONAS CONSIDERADAS E INCLUIDAS

Se trata de uno de los puntos más importantes, junto con el siguiente, ya

que va a reflejar en parte la filosofía o el espíritu subyacente en cada país o estado respecto a cómo se lucha contra el crimen y dónde están los límites.

Determinar en qué momento del proceso penal se toman las muestras puede ser tarea ardua. Siempre hay que partir de la base de que el instructor del proceso (juez, fiscal o equivalente) debería tener la potestad de ordenar la toma de muestras, y para ello debe haber una legislación previa que lo permita, pese a que la persona donante se pudiese negar. Sin embargo, este es un tema que necesita un tratamiento legal muy especial al afectar derechos fundamentales de las personas.

Respecto a qué personas se les puede tomar una muestra biológica, los diversos países con bases ya operativas han resuelto el tema de diversos modos (ref. Peter). Hay países que se decantan por considerar que la obligación de ceder una muestra se debe aplicar a personas ya condenadas (Holanda, Noruega, Bélgica, Suecia); otros países -la mayoría- incluyen en esta obligación a los sospechosos de haber cometido crímenes de cierta gravedad (Reino Unido, Alemania, Austria, Finlandia, Dinamarca, Suiza). Hay que tener en cuenta que si existe una colaboración voluntaria por parte de la persona imputada o procesada en el hecho, esta legislación no sería de aplicación.

Lo que aquí trata el legislador de prever es la posibilidad de que una persona procesada por un delito, por ejemplo, de violación, se niegue a ceder una muestra biológica de referencia que pueda servir en la investigación de un caso (o de varios casos) de los que se les acusa.

Otro aspecto a considerar es **quién puede ordenar el que se tome la muestra**. En el Reino Unido, por ejemplo, lo puede ordenar el oficial a cargo de la investigación, mientras que en la mayoría de los países es necesaria una orden judicial al efecto, lo que ya afectaría exclusivamente a personas que estén siendo procesadas por existir una acusación o imputación formal, un cargo criminal contra ellos.

TIPOS DE DELITOS

Este es el otro gran apartado que merece especial consideración, pues refleja, al igual que el anterior, una filosofía por parte del poder legislativo y ejecutivo.

La regulación de este apartado y del anterior tiene una **trascendencia práctica** especial, pues los mismos serán responsables del número de individuos que estarán en la base de datos. Si se aumenta el espectro de las personas a las que se les pueden tomar muestras biológicas de referencia (desde sospechosos a los ya condenados), y si se amplía el abanico de delitos a considerar (desde robos hasta homicidios y delitos contra la libertad sexual), el número de personas será mucho mayor que si existen fuertes limitaciones en estos aspectos.

En cualquier caso, es obvio que a mayor cantidad de individuos incluidos en la base de datos, mayores éxitos se obtendrán en la resolución de los casos criminales. Hay individuos que nunca han sido sospechosos de haber cometido delitos graves (violación, por ejemplo) y que al ser introducidos en base de datos por un delito 'menor', como puede ser un robo sin violencia contra las personas, aparecen como donantes de los indicios biológicos de un delito no resuelto.

Paralelamente, se ha venido observando y poniendo de manifiesto que en muchos casos existe lo que se puede denominar '**carrera profesional criminal**'; personas que comienzan cometiendo hurtos y robos de escasa calificación penal, continúan con robos de mayor trascendencia (violencia contra las personas, graves daños a las propiedades) y aún continúan cometiendo delitos que atacan ya contra la integridad física (homicidio) y la libertad sexual de las personas. Es obvio que este tipo de situaciones incita hacia una legislación amplia sin restricciones, en el sentido de incluir a delincuentes de todo tipo o considerar de modo especial a las personas que hayan reincidido.

Al igual que en el apartado anterior, los países con bases de datos ya en marcha muestran una absoluta dispersión de criterios, que hemos de entender como sano ejercicio de su libertad de legislar de acuerdo a las necesidades de cada país.

El **Reino Unido** es el país con menores restricciones, ya que cualquier delito que quede archivado en los antecedentes criminales de una persona ('any recordable offense') capacita a la policía a tomar una muestra de saliva del sospechoso de haberlo cometido. La gran mayoría de países sienta criterios más restrictivos al efecto, utilizando dos criterios diferentes: el tipo de delito o el tiempo de condena.

Países como **Austria, Alemania, Noruega y Suiza** restringen el tipo delictivo para el que se pueden tomar muestras de personas y los indicios. El factor clave es el delito (o el presunto delito en fase de instrucción), y no los años a los que pueda ser condenado. Puede haber delitos de cierta gravedad que, si no están recogidos en esta lista, queden exentos de este análisis. Normalmente, al ser delitos de gravedad (violación, homicidio, etc.) hay una asociación casi directa con el tiempo de posible condena, ya que la gran mayoría van a tener penas superiores a los 5 años.

Pero otros países como **Holanda, Finlandia, Dinamarca, Suecia y Bélgica** optan por un criterio puramente cronológico: a partir de cierto tiempo de condena (que es bastante variable, desde 1 año de cárcel en Finlandia o Alemania hasta 8 años en Holanda) se toman muestras de las personas implicadas. Este criterio da cabida a todo tipo de delitos en tanto en cuanto superen el límite mínimo establecido, y puede tener ventajas, ya que permite obtener muestras de personas que comienzan su carrera criminal con delitos menores (usualmente robo y robo con violencia). Por otra parte, puede sobrecargar la base de datos con muestras

de personas que estén implicadas en delitos de cierta gravedad, pero que no tengan relación con indicios biológicos. Así, grandes estafas o delitos a través de Internet, cuya gravedad no menospreciamos, raramente van a dejar indicios biológicos, pero las muestras de referencia de las personas analizadas se considerarían si se aplican criterios cronológicos de tiempo de condena.

TIPOS DE MUESTRAS

Pese a que casi siempre se habla de **tipo de delitos a considerar** y se hace pensando en las personas a incluir en la base de datos, no hay que olvidar que existen las muestras o indicios criminales dubitados o cuestionados, cuya regulación debe de ser exhaustiva igualmente. El análisis de las muestras se hará toda vez se hayan recogido y se cuente con la autorización pertinente del instructor de la investigación, ahora el límite hay que ponerlo en qué **tipo de muestras** incluir.

Es obvio que hay ciertos tipos de muestras biológicas (sangre y semen) que suelen estar asociadas a delitos de gravedad; pero hay otras muestras biológicas que no es tan fácil prever su asociación a los mismos: saliva en un cigarrillo, pelos y cabellos, etc. El conjunto de la escena del crimen ayuda a establecer el tipo de delito que se puede haber cometido, pero la calificación final depende muchas veces de una ardua investigación.

Cabe advertir del alto costo económico, en tiempo y materiales, que tiene la generación de resultados genéticos de calidad cuando el material de trabajo son los indicios, especialmente si existen mezclas (típicas, que no exclusivas, en delitos contra la libertad sexual), o si los especímenes están degradados o contaminados. Por ello se hace necesario el otorgar a los especialistas policiales y a los del laboratorio una cierta libertad para que puedan considerar, siempre de acuerdo al marco de referencia establecido por la ley, las muestras que deben incluirse en las bases de datos de indicios.

DURACION DE LOS DATOS EN LA BASE

El **tiempo** es también un factor a decidir, ya que se puede atentar contra ciertos preceptos básicos al mantener los antecedentes y datos de una persona indefinidamente en una base de tipo criminal. Este es un problema técnico del derecho de cada país, y no científico o informático, ya que los potentes equipos de computación de los que se dispone hoy en día son capaces de almacenar prácticamente cantidades infinitas de datos de este tipo. Paralelamente, hay que considerar que los datos necesarios para la identificación genética de una persona o de un indicio biológico son realmente muy limitados (pequeños), ya que de 60 a 70 caracteres (números y letras) pueden definir a una persona y a su genotipo. Por ello, los datos pueden estar almacenados indefinidamente o con limitaciones, que van a depender de la precedencia de los datos: personas o indicios.

Los **datos de las personas** pueden estar archivados indefinidamente o mientras viva la persona de la que proceden, mientras la persona esté en la cárcel, mientras el delito no prescriba, mientras la persona no cumpla una edad determinada o por un plazo marcado que se puede fijar para los diferentes tipos de delitos.

La única unanimidad que existe en todas las bases de datos es la de eliminar inmediatamente todos los datos procedentes de una persona que ha sido declarada inocente tras un juicio o tras una investigación preliminar, aunque en algunos países esto se hace de modo automático y en otros necesita un requerimiento específico.

Los **datos de los indicios** pueden estar almacenados también de acuerdo a diferentes criterios: mientras no se resuelva el caso (lo que equivale a indefinidamente), hasta que no prescriba el delito de cuya escena del crimen se obtuvieron o según unos plazos fijados de modo específico.

La legislación existente en los países europeos es extremadamente variable de unos a otros, pero siempre hay una característica común: **cualquier decisión es buena y válida**. Hay países donde los datos permanecen indefinidamente, salvo exculpación o veredicto de inocencia (ej. Austria, Noruega), mientras que otros marcan plazos variables, dependiendo del tipo de muestra (de personas o de indicios), del tipo de delitos, de la edad del delincuente, etc.

Finalmente, merece mención especial el tratamiento que se les da a las muestras originales, a los indicios que se recogen en la escena del crimen o a las muestras de referencia de víctimas o implicados, muestras que, por su diferente origen, hay que considerar separadamente.

Tratándose de los **indicios**, ha de afirmarse que, en general, la investigación genética debe tratar de conservar la máxima cantidad posible del producto original, ya que ello garantiza la posibilidad de realizar nuevos estudios cuando sea necesario (porque el análisis original no da resultados positivos, o a solicitud de la defensa o del fiscal, o sea, una contrapericia). Cuando los indicios son muy pequeños pueden ser consumidos para el análisis, pero no es esto lo normal, con lo que suelen quedar muestras biológicas (indicios) almacenadas en los laboratorios. Es costumbre, o incluso imperativo legal, devolver esas muestras al responsable de la investigación, como piezas de convicción que pueden ser necesarias en el juicio, pero otras veces no existe legislación al efecto, y las muestras quedan almacenadas en los laboratorios creando lo que pueden ser archivos de muestras biológicas.

Las **muestras biológicas de referencia** (de víctimas o normalmente de personas acusadas) se caracterizan porque tienen ADN de gran calidad y en gran cantidad.

GESTION DE LA BASE DE DATOS

Es importante diseñar de modo claro y específico **quién gestiona y cómo se gestiona la BDGIC**. Al contener datos sensibles, las bases de datos deben de estar perfectamente gestionadas y deben tener mecanismos de control y seguridad que impidan su manipulación o uso indebido.

En este sentido, es imprescindible que el equipo informático (ordenador) que soporta la base de datos tenga un acceso totalmente restringido, a personas autorizadas, con claves autorizadas y en momentos limitados. Deberían ser ordenadores dedicados exclusivamente a este fin, sin conexión externa a través de Internet o de correo electrónico.

El uso de los mismos debería de exigir la autorización de al menos dos personas diferentes, el operador y un supervisor, de tal modo que quedase registro impreso de las horas de operación, el personal que lo ha autorizado, los datos que se han consultado, los que se han introducido, los que se han borrado, etc.

Dependiendo del tamaño del país o estado, **la base de datos debería de ser única** o, en todo caso, tener el número mínimo posible de ordenadores trabajando con fines similares. Siempre es preferible generar los resultados y grabarlos en soportes informáticos tipo disco de 3.5 pulgadas o CD y enviarlos al laboratorio o centro que controle la base de datos para que los introduzca, a tener una serie de laboratorios accediendo a distancia a la base de datos central para introducir, consultar o eliminar resultados. El sistema CODIS dispone de soluciones muy buenas al efecto que además se pueden adaptar a las realidades de los diferentes países.

Otro tema a considerar es determinar qué **organismo o institución es responsable** del mantenimiento y gestión de la base de datos. No cabe respuesta genérica alguna, salvo el consejo de que ha de ser una institución pública o semi-pública que garantice, por la pericia y conocimientos de sus expertos, el perfecto funcionamiento de la misma.

En este sentido, los países del entorno europeo han ido adoptando soluciones variables, y la base de datos puede estar gestionada por una Universidad pública concertada con el estado (Austria, Dinamarca, Suiza), por las fuerzas policiales (Alemania, Noruega, Finlandia) o por laboratorios estatales de ciencias forenses (Reino Unido, Bélgica, Suecia, Holanda). En Estados Unidos es el FBI quien controla la base de datos a nivel nacional (NDIS de CODIS), y son laboratorios estatales los que disponen del control local (L-DIS) y estatal (S-DIS), siendo la Policía Montada (RCMP) la encargada de la gestión en Canadá.

Cuestión diferente, pero igualmente interesante, es determinar **qué laboratorios pueden generar perfiles de ADN** que se incluyan en la base de datos. En países pequeños es lógico pensar que un solo laboratorio bien equipado puede ser el suficiente. En países mayores o con estructura federal o con diversos laboratorios ya funcionantes de gran calidad, puede ser necesario o imprescindible una coordinación entre varios laboratorios. A este respecto, cada país habrá de revisar su situación y optar por la mejor solución posible. Cabría destacar a modo de reflexión dos aspectos.

El primero es, sin duda alguna el de la **máxima calidad**, el de la perfección y excelencia como medio de generar resultados de este tipo. Este aspecto es tratado en el siguiente apartado, por lo que nos remitimos al mismo, pero conste aquí su extraordinaria importancia como requisito sine qua non para el funcionamiento de las mismas.

El segundo aspecto importante de la gestión es **conocer el funcionamiento**. Generar resultados, o sea, analizar muestras de ADN de personas y de indicios criminales no significa controlar la base de datos, no significa gestionarla. En un país determinado, un laboratorio central puede gestionar la base de datos (laboratorio u organismo gestor), pero puede haber otros laboratorios en el país que se limiten a analizar muestras y enviar los resultados codificados al laboratorio gestor (laboratorios u organismos de análisis). Esto requiere una perfecta **coordinación entre los diferentes laboratorios**, que no es especialmente difícil, pero requiere una total y absoluta compatibilidad en todos los procesos y protocolos científicos y técnicos que conllevan el análisis: códigos compatibles en la identificación de las muestras (códigos de barras y marcadores alfa-numéricos), técnicas de laboratorio similares, coordinación en cuanto a casos que se analizan, etc.

La **disociación** consiste en separar en dos soportes (ordenadores) diferentes los datos que identifican a las personas (nombre, número de cédula de identificación, pasaporte, carné de identidad o similar) de los datos genéticos que se generen del análisis de las muestras. Ello se hace asignando un número (y código de barras equivalente) a cada persona, de modo que en el ordenador donde aparecen los datos genéticos estos no lo hacen al lado de un nombre, sino al lado de un código alfanumérico. De este modo, cuando se quiere saber qué persona se halla tras el código alfanumérico, hay que acudir a otro ordenador que empareja números y nombres. Así se evita que el acceso a un único ordenador o computador permita acceder a todos los datos de un caso o de una persona en particular.

De igual modo se opera con las muestras dubitadas o evidencias criminales, donde al lado del genotipo del ADN que se ha extraído de la misma nos aparece otro código alfanumérico junto a los números que representan el genotipo del ADN de una evidencia.

Caben aún otras medidas de seguridad, como el trabajar con **datos encriptados** o codificados, de modo que, por ejemplo, los números que aparecen como genotipo no correspondan realmente a los alelos de una muestra, sino que se obtienen por medio de un programa de encriptación, aunque hay que exigir las máximas garantías a este tipo de alternativas, ya que algunas veces un exceso de prevención con medios no adecuados puede conducirnos a errores graves que hacen perder efectividad a la base.

Finalmente debe contemplarse siempre la posibilidad de **cooperaciones internacionales**, lo cual debe hacerse siguiendo todas las garantías, igual que si se tratase de casos nacionales. En este momento las tendencias existentes son las de solicitudes escritas de consulta, es decir, la posibilidad de que un experto de un país consulte a los responsables de la base de datos de otro país si un determinado genotipo está presente en sus datos.

En el futuro podría darse la circunstancia, ya que la técnica lo permite, de que las consultas se realizasen en la distancia, aunque esto podría abrir la posibilidad de manipulaciones o de sabotajes por parte de 'hackers' y similares, por lo que nuestro consejo es que este tipo de bases de datos residan en soportes informáticos aislados que no estén nunca conectados a la red de Internet.

ALMACENAMIENTO DE LOS INDICIOS Y MUESTRAS DE REFERENCIA

Este es un apartado que puede pasar desapercibido pero que tiene gran importancia operativa, e incluso legal. Estaríamos considerando dos tipos de muestras biológicas paralelamente, que en ambos casos constituyen plenamente archivos biológicos, siendo las características de las personas de las que proceden conocidas en un caso (el de las **muestras de referencia**) y desconocidas en el otro (el de los **indicios**).

En primer lugar, tendremos un archivo biológico de muestras en forma de manchas de saliva o de sangre, y que proceden de las personas de referencia (sospechosos o condenados). El análisis del ADN para obtener un perfil de ADN (datos de identificación genética) que se introduce en la base de datos no requiere el uso ni la destrucción de toda la muestra biológica, por lo que la misma queda en el soporte donde fue recogida, a ser posible un soporte especial que garantice su conservación.

En este caso particular, podemos anticipar que el 95% de la muestra biológica original (sangre o saliva) va a quedar intacta tras un primer análisis. Ante estas muestras biológicas sobrantes, que conforman verdaderos archivos biológicos, existen dos alternativas: destruirlas o guardarlas.

La **destrucción** disminuye posibles costes de almacenamiento y custodia, y evita el posible extravío y uso del material biológico con fines ajenos al que fue obtenido, incluso ajenos a la esfera judicial (ejemplo, diagnóstico clínico).

. La **conservación** permite el nuevo análisis de las muestras en caso necesario; este reanálisis puede ser útil especialmente en dos circunstancias. En primer lugar, en caso de duda o de querer obtener una doble garantía de confirmación de identidad en caso de identificación criminal, y en segundo lugar en caso de que cambie la tecnología en el futuro y se apliquen nuevos marcadores (loci) de ADN, donde puede ser útil el que una serie de muestras ya analizadas se vuelvan a analizar en un determinado momento.

Es obvio que en casos como el que nos ocupa, donde se pueden dar casos de '**identificación en frío**', es necesario garantizar al máximo el derecho a la contrapericia y al análisis de novo de las muestras. Consideramos necesario que, de modo específico, se legisle o se emitan normas técnicas al respecto en el sentido de garantizar el archivo, durante los plazos que se estimen pertinentes (por ejemplo, hasta la prescripción de los delitos), de las muestras biológicas recogidas de la escena del crimen y que hayan sido analizadas y sus resultados incluidos en la base de datos.

El cómo y dónde se almacenan, de modo centralizado o en las dependencias de origen, es una solución que cada país debe dar de acuerdo a la legislación vigente al efecto, del modo que, con las máximas garantías, sea operativamente más fácil y económico.

CUESTIONES TÉCNICAS Y OPERATIVAS

La calidad y la perfección dependen de múltiples circunstancias, que básicamente se resumen en:

- . Disponer de los medios adecuados (instalaciones, aparatos reactivos).
- .
- . Disponer del personal adecuado, de técnicos superiores e intermedios perfectamente formados, capacitados y con actualización de conocimientos.

Todo lo anterior exige un presupuesto económico adecuado, unos fondos y unas inversiones que, si no se van a contemplar, es mejor no comenzar con la base de datos.

LIMITACIONES DE LAS BASES DE DATOS

La utilidad y el beneficio práctico que en la lucha contra el crimen suponen las bases de datos criminales genéticas no debe, nunca y en ningún caso, hacernos perder la perspectiva de lo que realmente son y donde encajan dentro del proceso penal. Esto hay que valorarlo proporcionalmente frente a los problemas legales y éticos que pudieren derivarse de la existencia de bases de datos excesivamente amplias o incluso universales por las que a veces se ha abogado.

En este principio del siglo XXI, con la tecnología actual no habría ninguna limitación técnica para poder realizar una "**base de datos universal**", incluyendo a todas las personas en el momento del nacimiento y posteriormente ampliando las actuales bases de datos criminales progresivamente e incluyendo a todos los ciudadanos de un país en el momento de obtener la cédula o documento de identidad, en el momento de ingresar al sistema educativo, etc.

Sólo las limitaciones económicas (posiblemente no despreciables), pero sobre todo las legales y éticas son las que pueden y deben hacernos reflexionar globalmente, como seres humanos, como personas, y no como simples técnicos y científicos.

Habría que considerar, de entrada, que la base de datos debe de ser un **instrumento más de ayuda a la investigación policial**, nunca al revés. La investigación policial completa ha de llevar a un sospechoso o grupo de sospechosos, que los análisis criminalísticos se encargarán de confirmar o excluir. Obviamente, las limitaciones de las bases de datos forenses han de ser, en cualquier caso, las que marque la soberanía popular a través de los parlamentos de cada país. Hay que notar que una legislación sobre materias técnicas es fácilmente cambiable, pero ello no implica que la misma deba ser hecha sin una profunda reflexión sobre la situación del país y las necesidades que se pretenden cubrir. Por ello es necesario escuchar la opinión de los expertos en genética forense de cada país y ser conscientes de las aplicaciones presupuestarias necesarias para cada caso.

El ADN posibilita el estudio de los **casos antiguos**, o sea, de aquellos casos a los que en su momento no se pudo hacer análisis genético (normalmente por una falta de implementación de las técnicas). Esto es especialmente útil para incluir datos genéticos de delitos que han acontecido en los últimos años, especialmente de aquellos que quedaron sin resolver.

El análisis de indicios criminales de casos como violaciones y delitos contra la libertad sexual en general, homicidios y asesinatos, etc. puede ser llevado a cabo fácilmente, teniendo muy en cuenta que es necesario que las evidencias hayan sido conservadas con todas las **garantías de custodia** que anulen la posibilidad de un cambio o manipulación (dolosa o culposa) de las mismas a lo largo del periodo de almacenamiento.

2.6- CASOS ESPECIALES EN EL ANALISIS GENETICO FORENSE.

El uso del ADN no queda limitado a la resolución de los típicos casos criminales o de filiación, como ya hemos analizado, sino que la creación de bases de datos permite la resolución de los casos más complejos, o sea, aquellos en los que los datos y las pesquisas iniciales no rinden los resultados esperados, o aquellos otros en los que no hay 'pistas' iniciales que permitan la investigación policial.

2.6.1- Identificación de recién nacidos.

En general, la buena praxis en los servicios de pediatría (neonatología) hospitalaria queda reflejado en la existencia de un número mínimo de denuncias o reclamaciones sobre posibles cambios de RR.NN. Sin embargo, en la actualidad, los métodos utilizados habitualmente (pulsera, huella plantar, huella dactilar) difícilmente garantizan la identificación inequívoca, ya que lo único que demuestran es una relación circunstancial y, por lo tanto, manipulable intencional o culposamente, por lo que han sufrido críticas que los desaconsejan y que incluso los califican de antieconómicas.

Asociaciones profesionales americanas pusieron ya de manifiesto la necesidad de abandonar todo tipo de prácticas identificadoras clásicas para centrarse en la toma de muestras de material biológico (sangre) del niño y de la madre que garantizase el establecimiento de lo que podemos denominar verdad biológica.

Los protocolos de análisis del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten establecer identificaciones rápidas, fiables y económicas a partir de muestras mínimas de sangre o de otros materiales biológicos. Su efectividad en la determinación de la relación materno-filial ha sido también demostrada incluso en muestras de cierta antigüedad almacenadas en condiciones estándar.

El Hospital Torrecárdenas de Almería, en colaboración con el Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Granada, puso en marcha el denominado Programa Andaluz de Identificación Genética Materno-Infantil (PRAIGMI) destinado a la toma de muestras que garanticen la identificación biológica en cualquier supuesto habitual en perinatología: partos con R.N. vivo (vía vaginal o cesárea), partos con fetos muertos y R.N. fallecidos antes de ser dados de alta hospitalaria.

La experiencia ha permitido la creación de una base de muestras biológicas que se destruye 1 año después de su recolección, ya que la misión es ayudar en la identificación en los primeros días o meses tras el nacimiento, en caso de que

se sospeche una confusión.

2.6.2- Trafico de menores

El secuestro, tráfico y explotación de menores es un complejo problema en la actualidad de difícil solución, donde la conjunción de problemas sociales, económicos, educacionales se unen a los intereses económicos hasta llegar un momento, como el actual, en que sólo una intervención firme y coordinada por parte de las autoridades puede traer una solución.

El ADN podría ayudar en estos casos ofreciendo una serie de muestras con las que comparar a los hijos con la madre o con otro tipo de familiares.

2.6.3- Profesiones de riesgo

La experiencia más importante es la de las Fuerzas Armadas de Estados Unidos. El Laboratorio de Identificación por ADN de las Fuerzas Armadas (AFDIL), perteneciente al Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (AFIP) creó un archivo de muestras biológicas (sangre o saliva) de todos los soldados profesionales. En Febrero de 2004 (según datos actualizados presentados en el Meeting de la AAFS), había unas 4.200.000 muestras tomadas, a un ritmo de toma de 7.000 a la semana.

Estas muestras se guardan y se usan para comparar en casos de ser necesaria la identificación de un militar profesional muerto en acto de servicio, y se ha usado desde 1995 en más de 4.000 casos.

De este modo se evita el tener que establecer comparaciones con los familiares, obteniendo una serie de ventajas:

1. Probabilidad mayor en la identificación: se compara la muestra de referencia del individuo con la del cadáver que se supone del mismo, con lo que la probabilidad estadística es mucho mayor.

2. Rapidez: no es necesario esperar a muestras de los familiares.

3. Seguridad: se evitan sorpresas de paternidades que no son biológicas, o de ausencia de familiares con los que comparar.

4. Economía: el uso de todos los tipos de ADN en comparación directa evita el tener que analizar múltiples familiares de referencia (necesario si no se dispone del padre y de la madre biológicos, o en caso de resultados no esperados, como cuando el padre se excluye pero la madre no).

Del mismo modo, compañías aéreas civiles y otras empresas de riesgo

(minería, petroleras) están ofreciendo esta posibilidad a sus empleados. Si se hace voluntariamente y se custodian adecuadamente las muestras, no hay problemas legales o éticos que alegar.

2.6.4- Identificación de alta seguridad

No hay mucha información aún al respecto sobre lo que sería un uso sistemático del ADN como medio rápido de identificación, básicamente por las limitaciones de la técnica.

En todo caso, en el momento en que una prueba de ADN se pueda hacer en un tiempo de 30 a 60 minutos, con equipos portátiles o pequeños y siguiendo procedimientos muy estandarizados, no cabe duda de que se podrá establecer este método no como habitual, pero sí como complementario de seguridad.

En este momento hay varias compañías trabajando en la materia y personal de algunas agencias de alta seguridad o trabajos especiales se sabe que están analizados con ADN por si es necesaria una identificación del máximo nivel.

Es, igualmente, un campo a desarrollar en el futuro.

2.6.5- Resolución de enigmas y casos históricos

Es preciso mencionar que la historia es una ciencia propia que posee su metodología, que tiene sus materiales o fuentes de trabajo (textos, grabados, materiales de interés arqueológico) así como un cuerpo de conocimientos sólido y asentado a lo largo de los tiempos.

Sin embargo, en ciertas ocasiones, como en todas las ciencias, surge la necesidad de acudir a otros cuerpos del conocimiento para comprobar hipótesis, a veces contrapuestas, que pueden existir para los diferentes autores. Ha sido muy típico el uso de técnicas como la del carbono catorce (C14) para datar piezas que permitan recomponer los datos independientes que pueden existir, o al estudio de documentos para comprobar su autenticidad, incluidas las determinaciones de originalidad de pinturas y obras de arte, etc.

En los últimos años se ha añadido un nuevo instrumento auxiliar: el análisis de ADN, que puede ayudar ofreciendo en algunos casos datos objetivos que permiten identificar a las personas por medio del establecimiento de las relaciones biológicas a través del material genético.

Sin embargo, hemos de ser conscientes de que el uso del ADN tiene ciertas, por no decir muchas, limitaciones en los casos históricos, que pueden ser mayores o menores dependiendo de las circunstancias. Es extremadamente importante tenerlos en cuenta porque, como veremos, pueden matizar la interpretación de los resultados, hasta tal punto que, toda identificación **positiva**

(inclusión o presencia de la relación biológica que se sospechaba) habrá de ser interpretada de acuerdo con las circunstancias y el valor estadístico de la misma, pero todo resultado **negativo** (exclusión o ausencia de la relación biológica que se sospechaba) ha de ser valorado con mucha cautela considerando los problemas que pueden existir, y que son incontrolables para los historiadores y para los expertos en el análisis genético.

Principales problemas

Los principales problemas, que no los únicos, son los siguientes:

1. Muestras antiguas y degradadas: si hablamos de historia, el material de trabajo va a ser mayoritariamente huesos, pudiendo usar en otros casos pelos, dientes, tejidos momificados o muestras biológicas conservadas (manchas de sangre o tejidos). Esto implica que en mayor o menor medida el ADN va a sufrir de todos los inconvenientes típicos del área forense: va a haber poca cantidad, va a estar degradado y vamos a encontrar contaminantes químicos (que pueden inhibir la amplificación) o biológicos (que pueden originar errores de interpretación).

2. Identificación no adecuada: algunas veces se accede a muestras en una tumba o sepulcro, o en un lugar previamente identificado, pero donde la identificación era errónea. A lo largo del tiempo puede haber habido una pérdida de documentos históricos o un cambio de los restos de una persona que no fue adecuadamente documentado, de modo que cuando se obtienen los huesos, por ejemplo, no son los de la persona que se cree, sino los de cualquier otra, por lo que los resultados que se obtengan pueden ser técnicamente perfectos, pero inadecuados "históricamente".

También acontece con frecuencia que, como es lógico, se analizan los huesos tras haber sido analizados por los antropólogos, de modo que si en un caso particular hay un error al identificar y clasificar las muestras por estos especialistas (sobre todo en casos especialmente difíciles, como aquellos donde hay restos mezclados de varias personas), los resultados de ADN pueden conducir a equívocos.

3. Posibilidad de ilegítimos: en algunos casos, las identificaciones se basan en el establecimiento de relaciones entre una persona y sus progenitores u otros familiares más o menos lejanos. Podrían obtenerse casos de "exclusión" en una relación determinada que se está tratando de establecer no porque las personas a identificar no fuesen las correctas, sino porque en su momento hubiese habido un hijo o hija ilegítima que, obviamente, no presenta ninguna relación biológica.

Esta circunstancia sería realmente atípica si se usa el ADN mitocondrial (que es la técnica más habitual en los casos históricos), pues la posibilidad de que una persona no sea hijo de una mujer determinada que se asume como la madre

es mucho más difícil que la versión paterna. Ahora bien, si la comparación es por medio de mitocondrial pero no es directa madre vs. Hijo, sino que se usan familiares más lejanos, es un hecho a considerar.

Por supuesto, toda comparación y exclusión por vía paterna o patrilineal (ADN nuclear, autonómico o cromosoma Y) ha de interpretarse siempre muy conservadoramente, pues la posibilidad de hijos ilegítimos era antes, como lo es ahora, un hecho estadísticamente posible, y la historia está llena de personajes que ya en su época se les conocía como ilegítimos y se les llamaba bastardos.

4. **Cambios y manipulaciones:** muy relacionado con el punto 2 antes tratado, hay que considerar que a lo largo de la historia puede haber habido cambios no conocidos o incluso manipulaciones intencionadas con objeto, por ejemplo, de preservar los restos originales frente a posibles agresores o salteadores de ejércitos enemigos, de revolucionarios o de simples bandas de bandoleros. Ello depende de la historia de cada país, pero en Europa, con las muchas convulsiones habidas en la Edad Media, siempre ha de tenerse presente esta posibilidad.

Ventajas e inconvenientes de los diferentes tipos de ADN en los estudios históricos.

Entendemos por "diferentes tipos" de ADN la diferencia existente en el modo en que se heredan, ya que ello nos limita o facilita su uso, dependiendo del caso y las muestras de referencia. Hemos de distinguir claramente el ADN mitocondrial (herencia exclusivamente materna), el cromosoma Y (herencia exclusivamente paterna y sólo presente en varones), y ADN autonómico (herencia mixta en los cromosomas 1 al 22).

Éstos son los distintos tipos de ADN según el modo en que se heredan, dato de gran importancia en los casos de identificación de personajes históricos, donde no siempre se cuenta con familiares cercanos ni directos para la identificación.

ADN MITOCONDRIAL

A pesar de la mayor información que puede aportar el estudio del ADN nuclear, en ocasiones su estudio es imposible cuando la muestra de la que se dispone es insuficiente o tiene excesiva degradación. Es en estos casos cuando el ADNmt puede desplegar todo su potencial.

Por sus características, que ya conocemos en profundidad, las muestras más idóneas para aplicar el análisis por ADNmt son aquellas que están en cantidad mínima y/o degradada, destacando:

1. **Pelos sin bulbo:** un vestigio bastante común en pericia forense y que, de

hecho, es posible obtener resultados a partir de una muestra tan pequeña como 1-2 cm. de pelo carente de raíz.

2. **Muestras muy degradadas:** como por ejemplo restos óseos antiguos. La estructura circular de la molécula de ADNmt hace que sea menos susceptible a la degradación por exonucleasas, y además, el elevado número de copias existentes en cada célula (como si la naturaleza hubiese realizado ya una amplificación por PCR).
3. **Análisis de restos de personas desaparecidas:** donde familiares relacionados por vía materna (incluso ascendientes o descendientes separados por alguna generación, como el caso de las Abuelas de la Plaza de Mayo, en Argentina) pueden suministrar muestras de referencia que puedan compararse y verificar la identidad de los restos analizados. En este sentido, el ya conocido Programa FÉNIX de identificación de personas desaparecidas viene desarrollando esta labor desde 1998.
4. **Identificación de especies no humanas:** el análisis de ADNmt puede también ser usado para análisis de identificación de especies estudiando zonas como el extremo 5' del gen del Citocromo b.

El ADN mitocondrial tiene, pues, la ventaja de la mayor resistencia ante el paso del tiempo, ya que siempre es probable que alguna de los cientos de moléculas de ADN se mantenga intacta dentro de una célula. Esta es la clave de su uso masivo en los estudios de tipo histórico y antropológico-genético. De hecho, son muchos los casos en los que no se puede analizar otro tipo de ADN que no sea el mitocondrial, y con estos datos hemos de conformarnos.

Al ser de herencia por vía materna, sin recombinación, permanece intacto a lo largo de diferentes generaciones, lo cual facilita comparaciones entre muestras que están alejadas en el tiempo, por ejemplo unos huesos determinados y las descendientes directas de la persona varias generaciones después.

Los **inconvenientes** derivan de la dificultad de su análisis, y de la gran facilidad que tiene para contaminarse biológicamente, que exige que el trabajo sea desarrollado por personas con una gran experiencia y prudencia. Finalmente, otro gran inconveniente en algunos casos puede ser la herencia por vía exclusivamente materna, que limita las muestras de referencia a lo matrilineal impidiendo las comparaciones de paternidad.

CROMOSOMA Y

Tiene interés para determinar las relaciones paterno-filiales, y en general para explorar linajes paternos. Su uso en identificación humana es relativamente reciente, de modo que aún se están describiendo polimorfismos de tipo *short tandem repeat* ó STR de utilidad. En la práctica forense habitual su mayor utilidad

aparece en casos de **agresiones sexuales**, donde el ADN del semen o espermatozoides del agresor queda fácilmente identificado frente al de la víctima (en más de un 95% de los casos una mujer, por tanto, sin cromosoma Y).

Todos los varones hijos de un mismo padre, o descendientes directamente de un mismo varón, van a poseer un mismo tipo (haplotipo) de ADN, por lo que su variabilidad no es tan grande como si hubiese recombinación. Esto es paralelamente una ventaja, porque permite el estudio saltando generaciones, sin que haya una relación directa, y una desventaja, porque en caso de familiares cercanos es imposible realizar una identificación con base en este tipo de molécula.

La mayor desventaja, sin embargo, estriba en la **dificultad de su análisis en muestras antiguas**, con ADN escaso y degradado, por lo que hay que centrar los estudios en STRs de tamaño muy reducido y en SNPs.

ADN NUCLEAR AUTOSOMICO

En la actualidad cada vez se investiga y se trabaja más con la posibilidad de estudiar fragmentos tipo STR más cortos de los cromosomas 1 al 22, de modo que las posibilidades de que estos permanezcan estables (sin degradación) a lo largo del tiempo aumentan. Los polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs) son buenos candidatos para ser aplicados en este tipo de muestras, siempre que se diseñen los elementos adecuados que permitan su estudio.

En casos históricos el ADN autosómico nuclear es capaz de ofrecer información útil sobre la maternidad y paternidad biológica de unos restos, buscando relaciones dentro de determinados linajes.

Su principal **inconveniente** es sin duda alguna la dificultad de trabajar con el mismo en muestras antiguas.

Una vez superado este problema, no es menor inconveniente el requerir muestras para comparar que pertenezcan a familiares directos (padre, madre, hijos), ya que de no contar con estos, las posibles combinaciones por efectos de la recombinación en cada generación hacen estadísticamente muy difícil establecer unas relaciones de parentesco apropiadas, que es posible resolver con el uso de múltiples loci y no sin dificultad en personas vivas, pero que al tratarse de huesos se complica enormemente.

2.6.6- Identificación genética en grandes catástrofes.

La muerte de un elevado número de personas en un evento puntual es lo que se denomina gran catástrofe. Estos eventos pueden ser **naturales** (terremotos, volcanes, inundaciones) o **artificiales** (incendios, accidentes de medios de transporte, explosiones), y del mismo modo pueden ser clasificados

como **accidentales** (por falta de prevención, mantenimiento o precaución) o **intencionales** (ataques o atentados terroristas).

Independientemente de los múltiples problemas urgentes que surgen, básicamente la atención médica sanitaria a los heridos supervivientes, aparece enseguida la necesidad de identificar apropiadamente a las víctimas.

El paradigma de la identificación en grandes catástrofes es el de '**identificar correctamente lo antes posible**', lo cual a veces no es posible hacer porque las presiones de los medios de comunicación, de los familiares, de las autoridades, etc. inducen a los profesionales a olvidar esta máxima y, en estos casos, se pueden cometer errores.

La magnitud sanitaria y forense de una gran catástrofe no puede medirse nunca en términos absolutos por el número de víctimas, ya que hay otras variables que influyen. Por ejemplo, la muerte de 30 personas en una pequeña ciudad o en una zona rural no bien equipada es, en esas circunstancias, una gran catástrofe. En una gran ciudad con los servicios adecuados, 30 cadáveres podrían ser tratados casi rutinariamente.

Por ello, lo más importante es ser conscientes y conocer la relación entre el número de víctimas y los medios humanos y técnicos disponibles, ya que esto será la clave para poder responder adecuadamente a todos los problemas que se plantean.

Organización en casos de gran catástrofe:

1. Asistencia a supervivientes:
 - Heridos graves
 - Heridos menos graves
2. Ubicación de víctimas mortales
3. Toma de datos accesorios
4. Cuidado con peligros secundarios: explosiones, intoxicaciones, derrumbes.

Estos son algunos de los extremos a controlar en los casos de grandes catástrofes. Toda la información debe coordinarse adecuadamente por profesionales.

Tipos de catástrofes:

Desde una perspectiva forense, centrados ya en las víctimas, hay que considerar que podemos encontrarnos con una catástrofe cerrada o abierta.

1. Catástrofe cerrada: aquella en la que se conoce el número muy aproximado de víctimas. El ejemplo más típico son los accidentes de aviación, pero pueden ser los de autobús, tren, etc., donde se sabe el número de pasajeros

y profesionales, e incluso hasta los nombres.

2. Catástrofe abierta: cuando no se sabe el número de víctimas a priori, siendo posible estimarlas más o menos fácilmente. Ejemplo suelen ser las catástrofes naturales, incendios en edificios, o los tristemente famosos por sus siglas 11-S (Nueva York) o 11-M (Madrid).

En cualquier caso, a la ciencia forense le compete determinar el número de víctimas y su identidad.

Determinación del numero de victimas e identificación de las mismas.

Preguntas básicas a responder en los casos de grandes catástrofes:

- Número de víctimas:
- Identificación de las víctimas

El **número de víctimas** se determina de modos diferentes, todos coordinados, siendo el más evidente el de contabilizar el número de ciertas piezas anatómicas idénticas, cuando ello sea posible, hasta aquel que en último extremo emplea el análisis de ADN para determinar el origen de todos y cada uno de los diferentes fragmentos.

Una vez determinado el número de víctimas, exacto o aproximado, procede la **identificación** de las mismas, lo cual se hace por medio de diversas técnicas existentes.

Métodos de identificación: ventajas e inconvenientes:

Métodos de identificación en grandes catástrofes:

- Patología forense
- Huellas dactilares
- Odontología
- Antropología
- ADN

Todas estas técnicas son complementarias entre sí, conjuntivas, ninguna mejor que otra en términos absolutos, todas ellas con sus ventajas e inconvenientes.

Ventajas e inconvenientes básicos de los métodos de identificación disponibles

	Ventajas	Inconvenientes
1. Patología forense	Económica	Muy limitada-Subjetiva
2. Huellas dactilares	Económica - Fiable	Limitada-Adultos
3. Odontología	Fiable	Limitada-Lenta (referencia)
4. Antropología	Económica - Fiable	Muy limitada-Lenta
5. ADN	Fiable - FragmentosReferencia amplia Seguridad (socio-psicol)	Cara-Lenta-Operatividad

La **patología forense**, el examen externo e interno del cadáver en la autopsia, puede ofrecer una gran cantidad de información práctica útil para la identificación (descripción del cadáver o los restos, cicatrices, tatuajes, prendas de vestir y complementos, lesiones internas y prótesis, etc.) Es económica porque es parte del sistema establecido, basada en el trabajo de los forenses y especialistas en medicina legal, pero tiene el inconveniente de la lentitud, limitación a cuerpos enteros o no muy dañados y la subjetividad al describir algunos de los datos, muchas veces muy difícil de pasar a parámetros objetivos.

Las **huellas dactilares**, cuando se pueden obtener por medio de la denominada 'necrodactilar' son un método ideal de identificación, útil sobre todo en aquellas catástrofes cerradas donde se conoce la identidad de las víctimas. Es rápida, totalmente fiable y económica, pero a veces está limitada hasta que no hay una sospecha de quién puede ser la víctima.

La **odontología forense** es otra gran rama de la identificación humana, de alta fiabilidad, relativamente económica, pero a veces limitada por la falta de material de referencia, por la falta de buenos especialistas (la Universidad de Granada cuenta con un gran equipo ya con amplia experiencia en catástrofes aéreas y de tráfico por carretera y ferroviario, liderado por las Profesoras Aurora Valenzuela y Stella Martín) y por la lentitud derivada de la necesidad de comparar todas las muestras una a una.

La **antropología forense** tiene una amplia experiencia contrastada en muchos casos a lo largo de la historia, y es muchas veces llevada a cabo en paralelo con la patología forense. Es económica y fiable, pero a veces es muy lenta por que las circunstancias impiden una mayor velocidad.

La **genética forense**, el ADN, presenta igualmente sus ventajas e inconvenientes.

Ventajas e inconvenientes básicos de la **identificación genética**:

Ventajas	Inconvenientes
Útil en +/- 95% de los casos	+/- 5% casos no es útil
Uso con fragmentos para reconstruir víctimas	Ausencia de laboratorios especializados
Alta fiabilidad (según referencia)	Relativa lentitud ?
Precios cada vez más baratos	Precios relativamente caros

El ADN tiene grandes y objetivas ventajas, como ser útil en casi todos los casos habituales, puede usarse en todo tipo de fragmentos, es muy fiable y el precio va en descenso.

Los inconvenientes deben también considerarse, ya que no es la panacea universal (o sea, hay casos en que no funciona), a veces faltan laboratorios especializados (no es el caso de España, pero sí de otros países), es relativamente lento (aunque se ha avanzado mucho en velocidad) y los precios, aunque disminuyen, son igualmente relativamente caros.

¿Es el ADN la panacea y la solución de todos los males y problemas? Es el instrumento más versátil si se usa apropiadamente. Tiene sus ventajas y sus inconvenientes, pero también tiene características únicas y exclusivas.

Las dos grandes ventajas, peculiares y únicas del ADN son las siguientes:

1. **Comparaciones no directas:** significa que no es necesario contar con muestras directas de referencia de la propia víctima o de sus familiares de primer grado (padres, hijos), sino que, dependiendo de los tipos de ADN a usar, se pueden usar muestras de familiares más lejanos, lo cual amplía el abanico de muestras de referencia, agilizando y dando rapidez. Otras técnicas (patología, dactiloscopia, antropología, odontología) requieren datos de comparación exactos procedentes de la víctima.

2. **Útil en fragmentos y alta degradación:** el ADN sirve lo mismo para

identificar un fragmento de piel que un cadáver completo, incluso aunque las muestras estén muy degradadas, sin que ello implique que sea efectivo en el 100% de los casos.

Otras técnicas (patología, dactiloscopia, antropología, odontología) sólo funcionan adecuadamente cuando se cuenta con el material de trabajo adecuado (ej., huellas dactilares, dientes, huesos o partes del cuerpo completas y no degradadas). Esta única característica que le hace útil en la identificación de fragmentos es especialmente importante en catástrofes donde hay una gran violencia y los restos de las víctimas se esparcen en múltiples fragmentos, ya que por medio del ADN se puede tratar de determinar el número de víctimas y además, identificar a las mismas, aunque sólo queden pequeñas partes del cuerpo.

Estas son características propias del ADN que no tienen otras técnicas, lo cual no implica que el ADN sea mejor ni peor, pero estas son dos peculiaridades que, obviamente, hay que aprovechar en todas las circunstancias en que puedan ser necesarias.

Muestras de referencia de las que se puede extraer ADN de la víctima, incluyendo a familiares de diverso grado:

1. **Objetos personales:** cepillo dientes, peine, cepillo pelo, máquinas de afeitar, prendas interiores, gorras y sombreros.

2. **Muestras de referencia previas:** hospitales, clínicas, bancos de donantes: muestras de sangre, semen, biopsias, etc.

3. **Familiares de diverso grado:** (según el “tipo” de ADN a utilizar).

En los casos en los que se puedan utilizar muestras de referencia directas de la víctima, siempre que sean fiables, son preferibles a las indirectas (familiares), ya que permiten un mayor rendimiento en el momento de establecer los cálculos estadísticos. Por ello, los objetos personales y las muestras de referencia previas, que se han citado anteriormente, han de ser consideradas en todos los casos.

En conclusión, la identificación en el caso de grandes catástrofes es un protocolo coordinado donde no hay técnicas más importantes o mejores que otras, ya que existe una conjunción de medios, de profesionales y de protocolos.

Las características peculiares del **ADN** lo hacen un **instrumento insustituible** cuando no existe posibilidad de comparaciones directas o cuando hay que identificar a numerosos fragmentos de diversas víctimas.

Finalmente, hemos de llamar la atención sobre la necesidad de que se

coordinen en todos los países, estados o regiones, equipos expertos en estas materias antes de que ocurran las catástrofes, pues cuando acontecen (y ojala que no aconteciesen nunca) es muy difícil soportar todas las presiones y trabajar adecuadamente a no ser que haya un perfecto diseño previo.

2.7- CONSIDERACIONES LEGALES Y ETICAS EN TORNO AL ANÁLISIS DE ADN

En este momento, **no existe** en España ni en ningún país de América Latina una legislación específica que regule el uso de las pruebas de ADN para la identificación criminal forense.

Sin pretender hacer un resumen exhaustivo del estado de la legislación internacional al efecto en los países de Iberoamérica, es cierto que Panamá dispone de una legislación al efecto pero que no se pone en práctica por la ausencia de laboratorios especializados en el país que permitan el estudio sistemático de los casos. Otros países como Chile tienen una completa ley a punto de ser aprobada, al igual que Uruguay. Del mismo modo hay avances significativos en Colombia y Perú.

Argentina, Brasil, Colombia y Costa Rica, entre otros, han aprobado leyes en relación a la identificación en casos de paternidad (filiación), donde de un modo u otro, más o menos extensamente, se regula la aplicación de las pruebas genéticas para dilucidar este problema, incluyendo la indispensable valoración estadística de los mismos.

En España, la Ley Orgánica 15/2003, de 25 de noviembre, por la que se modifica la Ley Orgánica 10/1995, de 23 de noviembre, del Código Penal, en su Disposición Adicional Tercera destaca la necesidad de que en el futuro se regule el estudio del ADN forense. El tenor literal del texto es el siguiente:

“El Gobierno, a propuesta conjunta de los Ministerios de Justicia y de Interior, y previos los informes legalmente procedentes, regulará mediante real decreto la estructura, composición, organización y funcionamiento de la Comisión nacional sobre el uso forense del ADN, a la que corresponderá la acreditación de los laboratorios facultados para contrastar perfiles genéticos en la investigación y persecución de delitos y la identificación de cadáveres, el establecimiento de criterios de coordinación entre ellos, la elaboración de los protocolos técnicos oficiales sobre la obtención, conservación y análisis de las muestras, la determinación de las condiciones de seguridad en su custodia y la fijación de todas aquellas medidas que garanticen la estricta confidencialidad y reserva de las muestras, los análisis y los datos que se obtengan de los mismos, de conformidad con lo establecido en las leyes”.

Del mismo modo, se introduce la siguiente redacción en el artículo 363:

363. *Los Juzgados y Tribunales ordenarán la práctica de los análisis químicos únicamente en los casos en que se consideren absolutamente indispensables para la necesaria investigación judicial y la recta administración de justicia.*

Siempre que concurran acreditadas razones que lo justifiquen, el Juez de

Instrucción podrá acordar, en resolución motivada, la obtención de muestras biológicas del sospechoso que resulten indispensables para la determinación de su perfil de ADN. A tal fin, podrá decidir la práctica de aquellos actos de inspección, reconocimiento o intervención corporal que resulten adecuados a los principios de proporcionalidad y razonabilidad.

Este párrafo segundo es de excepcional importancia, ya que permite, de manera proporcionada y razonada, y siempre por medio de resolución judicial motivada, la **obtención de muestras biológicas del sospechoso**, lo cual hará que se supere uno de los principales problemas de la investigación, que es la negativa del sospechoso o imputado a ceder una muestra biológica (saliva o células de la mucosa bucal, por ejemplo), imposibilitando análisis de ADN que son claves en el enfoque y resolución de la investigación criminal.

Anteriormente, en España, el Grupo Parlamentario Popular en el Congreso presentó una Toma en consideración para una Proposición de Ley que fue recogida en el Boletín Oficial de las Cortes Generales (Congreso de los Diputados) con fecha 03 de marzo de 1995 (**referencia número 122/000090**), proposición llamada "Uso y práctica de prueba del análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) dentro de la estructura del Derecho penal y en la investigación de la paternidad".

La mencionada toma en consideración de la proposición fue debatida y rechazada por el pleno del Congreso de los Diputados en Abril de 1995 (sobre un total de 288 votos, 154 en contra, 132 a favor y 2 abstenciones), basándose en la existencia de Leyes vigentes con contenidos similares o extrapolables (como la Ley 42/1988, art. 81), amén de lo regulado de modo más general en otra amplia serie de normas.

Paradójicamente, en el periodo de Gobierno del Partido Popular (1996-2004) no se ha aprobado ninguna ley que cubra todos estos aspectos, salvo la muy acertada modificación introducida en la Ley de Enjuiciamiento Criminal a finales de 2003, analizada en párrafos anteriores.

Por lo tanto, mientras se aprueba en España una ley específica (que ya en el presente, pero, sobre todo, cara al futuro consideramos imprescindible) todas las decisiones y actuaciones han de ser desarrolladas en base a las normas vigentes y, en todo caso y cuando ello sea posible, siguiendo la Recomendación No. R (92) 1 del Consejo de Ministros del Consejo de Europa (recomendación que **no es vinculante**), sobre "Uso del análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) dentro del marco del sistema judicial penal", que equivale a una declaración de principios general sobre cómo deberían legislar los diferentes países a este respecto.

En la actualidad la metodología más avanzada en este sentido, como hemos recogido es el **estudio de las regiones hipervariables del ADN** con diferentes tecnologías: estudios de regiones hipervariables tipo STRs del ADN

autonómico y del cromosoma "Y", secuenciación del ADN mitocondrial y más recientemente el estudio por medio de polimorfismos nucleotídicos simples (SNPs).

Las características más importantes de este tipo de estudios es la posibilidad de analizar cualquier resto orgánico y la elevada probabilidad de identificación que proporciona, llegando a cifras (probabilidad, razón de verosimilitud) enormemente altas, cercanas a la certeza científica.

La consecuencia de esta situación en otros países donde estas técnicas vienen aplicándose desde hace años es que los inculpados no suelen dar su consentimiento para que le tomen alguna muestra con la que comparar su perfil genético con el encontrado en el indicio hallado en el lugar de los hechos.

Ante este problema debemos plantearnos si es lícito y ético tomarle una muestra en contra de su voluntad con vistas a determinar si realmente es o no la persona que dejó el indicio encontrado y cuales son las cuestiones que rodean a esta situación.

2.7.1- Problemas derivados de la negativa del consentimiento.

El problema del consentimiento para la realización de un determinado análisis en el sentido planteado, puede establecerse desde una doble perspectiva: Médico-legal y Jurídica. La primera hace referencia a la actuación médica dentro del ámbito de la investigación judicial, mientras que la segunda se centra en el estudio de la posible quiebra de los derechos del encausado al realizar las referidas pruebas.

El **consentimiento informado** constituye un requisito inexcusable para la práctica de cualquier actuación médica, tanto de tipo terapéutico, como exploratoria o diagnóstica, que signifique el más mínimo daño físico o moral para el sujeto. Al emplear el término "informado" nos referimos a la obligación que tiene el médico de informar con sencillez, de modo que sea comprendido por el enfermo, pero con objetividad y de forma completa, de los fines que tiene su actuación, su naturaleza, riesgos y posibles opciones alternativas.

Las circunstancias especiales de la prueba en el campo del derecho penal implican por una parte el supuesto de la falta de colaboración y por otra la necesidad de informar también de las consecuencias jurídicas que se pueden derivar de su realización.

El desarrollo de la ciencia ha conseguido que hayamos profundizado en los métodos empleados para el diagnóstico de la identidad de un criminal, pasando desde los estudios antropométricos de tipo descriptivo (bertillonaje), seguidos de los citológicos y genético moleculares, hasta el nivel más desarrollado en la

actualidad, ya mencionado, el génico o estudio del ADN.

Los argumentos jurídicos sobre estas pruebas serán discutidos con posterioridad; desde el punto de vista médico-legal destacan dos cuestiones:

1. No necesitamos producir una lesión ni someter al individuo a ninguna situación especial para tomar una muestra útil para el estudio, ya que con la tecnología de la PCR podemos amplificar diversos loci a partir de muestras mínimas procedentes de la saliva, pelos tomados con un simple cepillado, sudor, ... etc.

2. Necesidad del CONSENTIMIENTO. La jurisprudencia del Tribunal Supremo (TS) define el acto médico como "Toda actividad lícita desarrollada por un profesional legítimamente capacitado y conducente a la curación de una enfermedad o a la promoción de la salud".

Para que dicha actividad sea lícita se exige que cumpla tres ítems:

- Fin: **curativo** o promoción de la salud.
- Realizada de acuerdo con la **Lex artis**, es decir, con profesionalidad, o sea, con pericia, prudencia y diligencia.
- Por **consenso**, es decir, con el consentimiento del enfermo o sujeto sobre el que se va a hacer la actuación.

En esta situación, si bien no vamos a producir una lesión sobre el sospechoso, ni a realizar maniobras especialmente violentas, tampoco parece muy lícito llevar a cabo la recogida de una muestra de manera coactiva, simplemente por su interés social o médico-legal.

En el terreno de la medicina clínica, cuando surge algún conflicto entre derechos o entre una obligación y un derecho (obligación de curar o derecho del médico a ejercer su profesión con libertad y seguridad jurídica y el derecho del enfermo a rechazar un determinado tratamiento), lo correcto es poner el problema en conocimiento de la autoridad judicial, la cual decidirá en base a las características del caso.

La prueba médico-legal se realiza en el contexto de una investigación judicial y en los casos que estamos planteando se presume como necesaria e imprescindible para tratar de averiguar la identidad del autor de un hecho criminal. En estas circunstancias deben existir otras pruebas o indicios suficientes que nos indiquen la relación del encausado con los hechos y la necesidad de llegar a su esclarecimiento, pudiendo el Juez sustituir el consentimiento del encausado por medio de una resolución motivada para que el acto médico se desarrolle dentro de la licitud. De forma independiente habrá que estudiar los posibles problemas jurídicos.

2.7.2- Cuestiones jurídicas.

Los derechos recogidos en la Constitución Española (CE) -y de modo similar en las constituciones de otros países- que pueden lesionarse al realizar una prueba de este tipo sin el consentimiento serían, fundamentalmente:

- Derecho a la libertad de movimientos (art.17.1.)
- Derecho a la integridad física (art.15)
- Derecho a no declarar contra sí mismo (art.17.3.)
- Derecho a no declararse culpable (art.24.2.)
- Derecho a la presunción de inocencia (art.24.2.)

Derecho a la libertad de movimientos

La Comisión Europea (D. 8278/78 de 13-12-79) se pronunció en este sentido afirmando que *"la ejecución forzosa de exámenes de sangre a una persona constituye una privación de libertad, incluso en el caso de que dicha privación sea de corta duración"*.

El Tribunal Constitucional español (TC) ha afirmado sobre este tema refiriéndose a los controles de alcoholemia, que no inciden en el derecho a la libertad.

En el caso de la investigación criminal el problema de la libertad de movimientos podría pasar a un segundo plano, ya que si existen los indicios y elementos suficientes como para plantearnos la realización de una prueba en contra de la voluntad del sospechoso, estos serán suficientes para poder establecer una privación de libertad como fase previa a la recogida de la muestra.

Derecho a la integridad física.

Los análisis sanguíneos, de orina u otros para la determinación de la alcoholemia suponen una intervención corporal coactiva de carácter leve, aunque afecta al derecho a la integridad física, no parece vulnerar su contenido esencial.

En el supuesto en que nos encontramos esta cuestión es una de las más delicadas. La Declaración Universal de los Derechos Humanos recoge que nadie puede sufrir una lesión en contra de su voluntad, por leve que esta sea. Esta situación ha pesado enormemente a la hora de aceptar la realización de cualquier prueba que llevara implícita la producción de una lesión.

Sin embargo, para la realización del estudio del ADN en medicina legal, no

es necesario partir de muestras que su toma implique la producción de lesión alguna, sino que **cualquier parte orgánica puede ser útil** para tal fin. Así encontramos muestras como la saliva, la toma de pelos por un cepillado, etc. que son suficientes y que para su recogida probablemente sea necesaria menos fuerza que para la toma de la huella dactilar.

En el derecho comparado, los análisis sanguíneos suelen ser obligatorios. Tales "intervenciones corporales" han provocado una prolija jurisprudencia en los distintos TC, cuyo común denominador ha sido reconocer *la legitimidad de tales actos de investigación coactivos siempre y cuando sean absolutamente respetuosos con el principio de proporcionalidad, de tal suerte que nunca pueda entrañar riesgo a la salud para su destinatario y sea confiada su ejecución a personal sanitario.*

Aunque nosotros no estamos planteando el tema de la extracción de sangre, sí resulta ilustrativo estudiar las disposiciones en relación a este tipo de análisis, ya que podemos sacar deducciones interesantes para otro tipo de muestras. La Comisión Europea de Derechos Humanos (CEDH) considera no incompatible con el artículo 2.1. De la citada comisión *"una intervención tan banal como el examen de sangre..."*.

Interpretando el artículo 15 de la CE con el 2.1. de la CEDH, resulta que una eventual resolución judicial ordenando un análisis de sangre no sería incompatible con las exigencias del derecho a la vida y a la integridad física del sujeto afectado.

De la decisión de la Comisión Europea se desprende también que el criterio a tener en cuenta en orden a determinar la incidencia de las intervenciones corporales en el derecho a la vida y a la integridad física es el de la gravedad de las consecuencias que la intervención tiene en relación con dichos bienes jurídicos: el análisis de sangre es admisible por tratarse de una "intervención banal"; otro tipo de intervenciones que no pudieran considerarse "banales", no serían admisibles, por mucha que fuera su trascendencia a los efectos del esclarecimiento de los hechos.

Nuestro TC se ha pronunciado sobre las **intervenciones corporales** en el ámbito de la persecución penal en la STC 37/89 de 15 de febrero considerándolas admisibles si son ordenadas por el Juez en resolución motivada y respetan el principio de proporcionalidad, incluso a pesar de la ausencia de regulación legal al respecto. No obstante, en la citada resolución se considera atentatoria contra la dignidad humana la ejecución coactiva de la medida, cuya efectividad se conseguiría mediante la conminación con la pena prevista para el delito de desobediencia.

Derecho a no declarar contra si mismo y a no confesarse culpable

Los problemas planteados ante nuestros Tribunales también han sido en su gran mayoría relacionados con las **pruebas alcoholométricas**.

En este sentido, la Audiencia Provincial (AP) de Vitoria (31-1-84) mantuvo que esas pruebas entrañaban una autoincriminación contraria a los artículos 17.3 y 24.2 de la CE, aunque finalmente se impuso la tesis sustentada entre otras por la AP de Albacete (14-3-83), la cual fue elevada a doctrina constitucional por el TC al afirmar que *"... el deber de someterse a control de la alcoholemia no puede considerarse contrario al derecho a no declarar, y declarar contra sí mismo y a no confesarse culpable, pues no se obliga al detectado a emitir una declaración que exteriorice su contenido admitiendo su culpabilidad, sino a tolerar que se le haga objeto de una especial modalidad de pericia, exigiéndole una colaboración no equiparable a la declaración comprendida en el ámbito de los derechos proclamados en los artículos 17.3 y 24.2 de la CE"*.

Lo mismo puede afirmarse en cuanto a un **eventual vulneración de la presunción de inocencia**, entendida como derecho autónomo. También la Comisión Europea ha tenido ocasión de pronunciarse al respecto: *"la posibilidad ofrecida al inculpado de probar un elemento que le disculpa no equivale a establecer una presunción de culpabilidad contraria a la presunción de inocencia, puesto que, si puede parecer evidente que, siendo positivo el resultado de la prueba, puede derivarse una sentencia condenatoria, tampoco lo es menos que este mismo examen, si fuere negativo, puede exculpar al imputado"* (D. 8239/78 de 4 de diciembre).

Como ha quedado recogido en las diferentes sentencias mencionadas, la mayoría de los problemas se han planteado en relación a las pruebas alcoholométricas, existiendo una tendencia clara hacia la admisibilidad de dichas pruebas cuando se cumplan una serie de requisitos (ordenadas por el Juez motivadamente, proporcionalidad, garantías de salud para el inculpado,...).

Bajo estas circunstancias su extrapolación hacia delitos más graves parece plenamente justificada, máxime si tenemos en cuenta que se trata de un delito grave que se ha cometido y que el fin de la prueba es determinar la autoría del mismo, elemento imprescindible para que realmente se pueda establecer Justicia determinando la culpabilidad y responsabilidad del autor. Por el contrario, en las pruebas alcoholométricas en la mayoría de las ocasiones sólo se trata de investigar si se ha producido un delito, el de conducción de vehículos de motor bajo la influencia de bebidas alcohólicas, recogido en el artículo 340 bis a) 1. del CP.

2.7.3- Consideraciones éticas.

El análisis de situaciones como la expuesta puede conducir a conclusiones muy diferentes dependiendo de la perspectiva desde la que se enfoque el problema, así como las convicciones personales del enjuiciador. La reflexión puede llegar a ser incluso más profunda y admitir dentro de la legalidad la realización de pruebas en las circunstancias que hemos expuesto, lo cual puede ocurrir perfectamente si se hace siguiendo las normas existentes en el momento actual, pero el problema trasciende a la legalidad y se centra más en el terreno de la moralidad.

El llevar a cabo una actuación dentro de los marcos legales sólo exige el que no se vulneren ninguno de los mandatos recogidos en las leyes y normativa existente, lo cual en ocasiones depende más de una política criminal que posibilita la promulgación de las leyes que de un análisis impretérito bajo una perspectiva ética.

La posible discrepancia entre la legalidad y la moralidad de la prueba puede darse en dos circunstancias fundamentales:

- En la realización de la prueba en sí.
- Manipulación de la información obtenida.

2.7.3.1- Aspectos éticos de la prueba

Tal y como afirma el malogrado Magistrado y Profesor RUIZ VADILLO, no es un principio absoluto que la verdad tenga que ser investigada a cualquier precio. En este sentido ROXIN afirma que *"una clarificación exhaustiva, ilimitada de los hechos penales podría suponer el peligro de lesión de muchos valores sociales y personales. Por ello la investigación de la verdad no es en el proceso penal un valor absoluto: antes bien, el proceso penal se halla inmerso en la jerarquía de valores éticos y jurídicos de nuestro Estado"*.

Ha quedado explicado que el sometimiento a la toma de una muestra en concreto que no cause lesión alguna puede ser perfectamente lícito, salvando mediante ciertas condiciones los posibles quebrantos de determinados derechos fundamentales. A pesar de ello quedaría por analizar el posible atentado contra la dignidad de la persona que se somete a una determinada acción en contra de su voluntad.

Si analizamos esta situación desde una moral individual probablemente llegaríamos a la conclusión de que no sería ético someter al sospechoso a tales condiciones, pero si lo hacemos entendiendo al hombre como un individuo de la sociedad, y por tanto sometido al orden moral, entendido como moral social, puede verse como ético el hecho que de forma proporcional y bajo la legalidad ayude a establecer uno de los valores superiores del ordenamiento jurídico del Estado, **la Justicia**, frente a la libertad individual.

Las garantías de proporcionalidad y legalidad, y el establecimiento de los límites de los derechos de la persona corresponden hacerlo al Juez, para lo cual valorará las circunstancias del caso y los elementos que indiquen la necesidad de llevar a cabo la toma de las muestras.

Esta situación sin duda se vería facilitada si existiera una regulación adecuada tanto en la forma (ha de ser una Ley Orgánica al regular el ejercicio de derechos fundamentales) como en el fondo (tratando las limitaciones, condiciones, tipo de muestras,...) de estas situaciones. Del mismo modo se evitarían las interpretaciones personales que en hechos de este tipo siempre conducen y despiertan cierto recelo en la sociedad.

La dignidad de la persona no se pierde simplemente porque se obre en contra de su voluntad, cuando dicha actuación tiene un determinado fin, cuando se cumplen unas determinadas condiciones, cuando no se le somete a ninguna maniobra violenta ni degradante, cuando se cumplen unas determinadas garantías, y cuando el origen de ese consentimiento en contra no tiene ninguna justificación ni argumentación, sólo el no por el no. Situaciones contrarias a la voluntad de un inculpado ocurren a diario en al práctica jurídica al someterlo a una rueda de reconocimiento, al tomarle las huellas dactilares... y no se plantea la lesión de ningún derecho.

Ahora bien, la investigación personal no podrá llevarse a efecto *"en ningún caso, mediante el empleo de la fuerza física, que sería en este caso degradante e incompatible con la prohibición contenida en el art. 15 de la CE"*, cabe, no obstante, el compelmiento *"mediante la advertencia de las consecuencias sancionatorias que pueden seguirse de su negativa, o de la valoración que de esta quepa hacer en relación con los indicios ya existentes"*.

No parece ético adoptar una "presunción de culpabilidad" o una valoración negativa del resultado de una prueba que no se ha hecho al no dar su consentimiento, ya que dicha actitud podría considerarse en cierto modo coactiva, manteniendo al mismo tiempo la duda en la resolución del caso, o al menos mayor grado de duda que si se hubiese realizado, lo cual, paradójicamente en contra de principios básicos, no actúa a favor del reo.

Gracias a la tecnología del ADN no creemos que sea necesario llegar a situaciones como las anteriormente referidas, ya que las muestras necesarias pueden obtenerse sin ningún medio coactivo o de fuerza física. No obstante, si el inculpado niega su colaboración habría que valorar si el Juez tendría que determinar que pasase a una situación que nos proporcionara indicios para estudiar el ADN por medio de la PCR a partir de mínimos componentes orgánicos, como restos de saliva en vasos, cepillo de dientes, boquillas de cigarrillos, pelos en el peine o cepillo, etc.

2.7.3.2- Manipulación de la información aportada por el análisis del ADN en medicina legal

La primera impresión que levanta un estudio genético es la de **temor**, pensando que se va a manipular la información genética o que se va a usar para fines distintos a los relacionados con el objetivo de la prueba.

La segunda de las posibilidades es un hecho que puede ocurrir en la actualidad y por tanto una realidad que debemos debatir, ya que de lo contrario podremos atentar contra el derecho a la intimidad de la persona objeto de nuestro estudio.

Como se ha afirmado en distintos capítulos de este trabajo, el ADN que estudiamos en Medicina Legal es parte del **no codificante**, cuya hipervariabilidad le confiere una gran poder individualizador sin que aporte información alguna sobre características fenotípicas del individuo. En esta situación sería imposible que del análisis genético se pudiera derivar alguna información distinta a la judicial.

A pesar de ello, parece que existen asociaciones de algunos alelos de ciertos loci con determinadas enfermedades o variaciones enzimáticas, siendo en la actualidad una de las vías de estudio en determinados campos. Este hecho puede hacer que dicha información sea extrapolada a otros campos con el consiguiente empleo de la misma para fines diferentes.

Así por ejemplo si se sabe que un determinado alelo va unido a un déficit enzimático que hace al individuo más sensible a sufrir una enfermedad en un ambiente laboral determinado, puede sufrir alguna discriminación por tal motivo.

Este hecho, que en el momento actual es muy difícil que ocurra, puede llegar a ser una situación frecuente, sobre todo si se consigue, como se pretende, hacer **bancos de información genética** de toda la población o de determinados grupos de delincuentes reincidentes, similares a los bancos de datos de las huellas dactilares para poder identificar a cualquier individuo.

Debemos de plantear el debate tanto en el seno científico como jurídico, en este sentido, para tratar de utilizar aquellos marcadores o loci cuyos alelos no vayan asociados a ningún tipo de información fenotípica, así como para adecuar la tecnología y legislación a la realidad social bajo unos planteamientos éticos actualizados.

2.7.4- Consideraciones jurídicas sobre la recogida de indicios y la prueba indiciaria pericial

A partir de 1978 el desarrollo jurisprudencial ha experimentado una evolución que ha afectado de forma significativa a la prueba penal, produciéndose una diferencia llamativa entre el antiguo sistema de prueba tasada y el actual de prueba libre.

El **modelo de la prueba libre**, expresado como libertad de medios de prueba y convencimiento, se caracteriza por dos hechos fundamentales:

1. Los medios de prueba han de utilizarse según lo previsto en la Ley de Enjuiciamiento Criminal (LECrim).

2. La sentencia únicamente puede fundarse en un auténtico medio de prueba (no atestado o acto de investigación) practicado con las garantías y principios procesales oportunos y siempre con el máximo respeto a los derechos que la Constitución anuncia como fundamentales.

Como consecuencia de lo anterior se le exigen una serie de requisitos y garantías a la prueba indiciaria:

- Probanza del indicio.
- Pluralidad de indicios.
- Carácter racional y lógico del razonamiento deductivo.
- Plasmación en la sentencia de todos los anteriores.

El análisis del ADN siempre se va llevar a cabo sobre una serie de indicios físicos tomados del lugar de los hechos, de la operación de autopsia o de las personas implicadas con aquellos (víctimas y sospechosos). En los textos de médico-legales y en este trabajo se insiste y se pone el acento, como debe ser, en las **cuestiones científicas y técnicas**.

No obstante, a pesar de haber llevado una investigación científicamente correcta, evitando los problemas de contaminación y degradación a posteriori, podríamos encontrarnos con una nulidad de prueba por defectos jurídicos formales en el cumplimiento de las garantías a la hora de la obtención de los indicios.

Evidentemente no es una cuestión puramente médico-legal ni es nuestra intención profundizar en este punto, pero sí creemos necesario hacer una serie de consideraciones y transmitir el espíritu de la Jurisprudencia del Tribunal Constitucional (TC) y del Tribunal Supremo (TS), para que en nuestra función procuremos y demandemos la correcta actuación que garantice en los primeros momentos de la investigación la aceptación de los El marco en el que debemos

gubernos está formado por tres aristas: la Jurisprudencia de los Tribunales Constitucional y Supremo y la LECrim. Sólo vamos a comentar aquellos requisitos que tienen una relación directa con nuestra función, limitándonos realmente al primero de ellos, **la probanza del indicio**, ya que los dos últimos son estrictamente jurídicos y basados en los anteriores, y el segundo, **la pluralidad de los indicios**, que no debe entenderse sólo en relación al número de indicios físicos, ya que pueden existir otros que no tengan relación alguna con el análisis del ADN, ni siquiera con la investigación médico-legal, se vería limitado por los hallazgos encontrados en el lugar de los hechos.

Evidentemente no es una cuestión puramente médico-legal ni es nuestra intención profundizar en este punto, pero si creemos necesario hacer una serie de consideraciones y transmitir el espíritu de la jurisprudencia del Tribunal constitucional (TC) y del Tribunal Supremo (TS), para que en nuestra función procuremos y demandemos la aceptación de los resultados en el momento final del proceso, en el juicio oral, evitando que surja un conflicto entre los aspectos médicos y los legales.

En relación a la PRUEBA DEL INDICIO, la sentencia del TC 174/85 de 17 de diciembre recoge que no es posible que puedan construirse certezas partiendo de simples probabilidades. Ellos significan, en nuestro terreno, que el indicio ha de estar plenamente probado, de manera que de existir duda alguna al respecto de su realidad, ha de quedar vedada la posibilidad mínima de la presunción.

Resulta así fundamental la **necesidad de la prueba del indicio** como requisito esencial de la prueba indiciaria. En este mismo sentido el TS ha sido suficientemente claro y ha afirmado tajantemente la necesidad del acreditamiento directo del indicio o *"por medios de prueba directa"*.

La forma de cumplir estos requisitos y de mantener las garantías necesarias en cuanto a la recogida de los indicios físicos nos la da la LECrim. En el Título V *"De la comprobación del delito y averiguación del delincuente"*, concretamente en los Capítulos I *"De la inspección ocular"* y II *"Del cuerpo del delito"* (artículos 326 y ss.) se hace referencia a la necesidad de llevar a cabo la descripción de cualquier elemento o detalle que pueda utilizarse en la investigación, así como a su recogida para su posterior estudio, **debiendo realizar una diligencia escrita de todo lo que se realice**.

En este último aspecto es donde debemos insistir para mantener las garantías y probar los indicios, para lo cual debe ser el Secretario Judicial quien de fe de todos los indicios encontrados y de su recogida para la remisión al laboratorio correspondiente con el fin de ser sometidos al análisis oportuno. De lo contrario, en momentos más avanzados del proceso se puede poner en duda la autenticidad de dichos indicios y, en consecuencia, la validez de la prueba, lo cual, aún siendo una garantía perfectamente exigible, no debe producirse por un error del equipo investigador o de la comisión judicial, ya que a fin de cuentas,

habremos fracasado en demostrar unos determinados hechos o circunstancias por una negligencia perfectamente evitable.

No se trata, por tanto, de tomar notas, fotos, etc. Para solventar una serie de cuestiones técnicas, sino de realizar una diligencia judicial que garantice los requisitos exigidos a la prueba indiciaria.

Esta situación es interpretada en muchas ocasiones como un exceso de diligencia por profesionales no muy cercanos al mundo jurídico, pero se puede entender perfectamente si comprendemos que la prueba indiciaria tiene por objeto probar directamente los hechos mediatos para deducir de estos aquellos que tienen una significación inmediata para la causa, es decir, como afirma PRIETO-CASTRO *"no tiene por objeto el mismo hecho que se pretende probar, sino otro que sirve para demostrar aquel por vía de deducción"*.

Bajo esta perspectiva jurídica se comprende que si el juzgador ha de basarse en algo (indicio) para deducir los hechos o algunas de sus circunstancias, aquel debe estar perfectamente acreditado. Es lógico, por otra parte, pensar que cuanto más rotundo sea el resultado y las deducciones que de él se puedan llevar a cabo, como ocurre habitualmente con el análisis del ADN, más se le va a exigir en relación a las garantías del indicio, y más se exija al equipo encargado en las diversas fases de la investigación.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- PROTOCOLO GENERAL DE TRABAJO: EXTRACCION, CUANTIFICACION, AMPLIFICACION Y ELECTROFORESIS.

Una vez conocidos los conceptos básicos del ADN y las características de los fragmentos del ADN que se utilizan en Genética Forense, vamos a dar una visión global del proceso de análisis que sufre una muestra biológica desde que llega al laboratorio hasta que se emiten los resultados. El procedimiento analítico siempre sigue unas pautas o pasos comunes que son los siguientes:

1. Proceso de **extracción del ADN** del interior de la célula
2. **Cuantificación** del ADN extraído
3. **Amplificación** del ADN
4. Proceso de **electroforesis**
5. **Interpretación** de los resultados

Estos pasos son comunes en el análisis de los distintos tipos de indicios biológicos: sangre, saliva, semen, cabellos, huesos, dientes, tejido epitelial, etc.

Pero tendremos que variar los protocolos utilizados en cada uno de los pasos en función de:

_ **Tipo de muestra.**

_ **Calidad de la muestra:** la calidad depende fundamentalmente de la data de la muestra y del estado de conservación.

_ **Cantidad de muestra:** si estamos ante lo que denominamos una muestra mínima como puede ser un pelo o una mancha minúscula de sangre, debemos seguir unas pautas especiales.

A continuación vamos a ver una breve descripción de las muestras biológicas analizadas en genética forense:

Aunque el ADN se puede extraer a partir de cualquier célula que contenga núcleo, los indicios biológicos que con más frecuencia se analizan en los laboratorios de Genética Forense son los siguientes:

SANGRE.

La sangre es el indicio biológico más habitual en la escena del crimen, así como el utilizado para las pruebas biológicas de paternidad por su facilidad de análisis. El ADN se extrae a partir de los leucocitos o glóbulos blancos ya que los glóbulos rojos son anucleados y, por tanto, carecen de ADN. Existen de 5.000 a 10.000 glóbulos blancos por mililitro de sangre, por lo que una mancha, por muy pequeña que parezca puede contener suficientes células como para

obtener la cantidad de ADN necesaria para el análisis.

SEMEN.

Es un indicio habitual en los crímenes con componente sexual. Es muy difícil encontrarlo en estado líquido, ya que tiende a secarse rápidamente. Cuando se ha secado, dependiendo de la cantidad y concentración de espermatozoides, suele aparecer una capa blanquecina que puede ser perfectamente identificada con la luz de Wood. La luz de Wood es luz ultravioleta a una determinada longitud de onda, cuando una mancha de esperma es iluminada en una habitación oscura con esta luz emite una fluorescencia verdosa.

El número de espermatozoides por mililitro de semen es aproximadamente de 100 millones, por lo que, por muy pequeña que sea la mancha o por muy diluida que esté, siempre será posible encontrar espermatozoides en un número suficiente.

SALIVA.

Aunque la saliva está compuesta básicamente por agua y sales minerales, tiene múltiples células en suspensión (de 100.000 a 400.000 células por mililitro).

Una pequeña parte de las células procede de las glándulas secretoras y de sus conductos de secreción, no obstante, la mayoría son leucocitos y células de descamación del epitelio bucal y lingual (células que mueren y se quedan en la boca, o células que son arrancadas por los movimientos realizados al hablar y al masticar).

En la escena de un crimen las manchas de saliva son invisibles, por lo que hay que considerar los soportes en los que puede encontrarse: boquillas de cigarrillos, sobres, sellos, vasos, copas, cubiertos y mordeduras, principalmente.

OTROS FLUIDOS.

Cualquier fluido de origen biológico humano es susceptible de ser analizado con técnicas de análisis genético siempre y cuando contenga células con núcleo de las que pueda extraerse el ADN.

Los fluidos más frecuentes son los vistos anteriormente (sangre, semen y saliva), no obstante, hay ocasiones en las que en el lugar de un crimen pueden encontrarse otros fluidos como orina, vómitos, líquido amniótico, etc.

PELOS.

Independientemente de su origen (cabeza, pubiano y otras partes de la anatomía), el pelo posee ADN en la raíz, que es el lugar donde se encuentran las células que dan origen al tallo.

La cantidad de ADN que hay en cada pelo es muy pequeña, por lo que a veces su análisis se dificulta enormemente.

En aquellos casos en los que los pelos han sido arrancados violentamente del cuerpo (por un tirón o porque se han enganchado en algún lugar), es posible encontrar más ADN ya que hay presentes células de la superficie de la piel que son arrancadas junto con la raíz capilar.

HUESOS.

Ante la identificación de restos cadavéricos o en avanzado estado de putrefacción, la extracción de sangre o músculo no es posible y, por lo tanto, se recurre a la extracción de ADN a partir de tejidos duros o resistentes en cuyo interior la agresión celular por parte de microorganismos es menor.

El tejido óseo compacto es el más utilizado en estos casos y, en concreto, es preferente utilizar un hueso compacto largo como es el fémur, ya que la probabilidad de que las células hayan sido atacadas por microorganismos y sustancias contaminantes es menor.

DIENTES.

Los dientes suponen una gran fuente de ADN. El ADN se extrae del interior de la cavidad dental, concretamente de la pulpa dental ya que las células de la pulpa están especialmente protegidas contra todo tipo de agresiones (físicas, químicas y biológicas), tales como el fuego, las altas temperaturas y la acción de microorganismos contaminantes que degradan el ADN.

3.1.1- Proceso extracción ADN.

Tanto si se trata de ADN nuclear (que se encuentra en el interior del núcleo celular) como si es ADN mitocondrial (localizado en las mitocondrias), el proceso de extracción consiste en la rotura de la membrana plasmática, envoltura nuclear y mitocondrial para posibilitar la liberación del ADN que se encuentra en su interior.

Existen diversos tipos de protocolos para extraer el ADN, pero todos deben cumplir una doble misión:

-Extraer el ADN, liberarlo del interior del núcleo o de la mitocondria.

-Purificar el ADN, es decir, conseguir eliminar la máxima cantidad

posible de sustancias contaminantes que puede posteriormente interferir en el estudio.

La extracción del ADN es el paso más importante dentro del análisis del mismo ya que del éxito en esta etapa depende que se obtenga finalmente un buen resultado.

Este proceso llega a ser crítico en cierto tipo de muestras en las que el ADN se encuentra en pequeña cantidad y/o degradado y/o contaminado.

Es el caso de indicios mínimos encontrados en la escena del crimen que, en la mayoría de los casos, suelen ser únicos e irrepetibles. También es el caso de restos óseos, sobre todo de aquellos que son antiguos o han estado sometidos a ciertas condiciones perjudiciales para el ADN.

Podemos diferenciar entre dos grupos básicos de protocolos de extracción:

- _ **Protocolos estándar**, entre los que se encuentra la extracción con **Chelex** y la extracción orgánica con **fenol-cloroformo**
- _ **Protocolos comerciales**, en los que todos los reactivos necesarios vienen en un kit.

A continuación veremos las ventajas e inconvenientes de los protocolos estándar de extracción puesto que uno de ellos ha sido el utilizado para las muestras del presente estudio (fenol-cloroformo).

Proceso de extracción del ADN con Chelex.

El "Chelex 100" es una resina quelante captadora de iones polivalentes que permite extraer el ADN a partir de diferentes sustratos de manera rápida y sencilla.

Además presenta la ventaja de poder extraer ADN a partir de muestras pequeñas puesto que, al ser el número de pasos reducido, la probabilidad de pérdida de ADN por manipulación es extremadamente baja.

Sin embargo, presenta el inconveniente de que el ADN obtenido está menos purificado que el obtenido en la extracción orgánica con fenol-cloroformo. No obstante es un método muy efectivo para extraer ADN a partir de muestras de sangre total o manchas que se encuentran en buen estado. En nuestro laboratorio es utilizado rutinariamente en casos de estudios de paternidad, ya que las muestras que se reciben para ello suelen ser muy recientes y están en buen estado.

Ventajas e inconvenientes de los protocolos de extracción con Chelex.

Es importante conocer cuales son las ventajas e inconvenientes de cada

uno de los protocolos para saber cual de ellos debemos aplicar en cada caso según el tipo de muestra a la que nos enfrentemos.

La extracción de ADN con Chelex presenta las siguientes **ventajas**:

- _ Rapidez: el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso completo es de aproximadamente 3 horas.
- _ Sencillez: la técnica es sencilla y no requiere un aparataje costoso.
- _ Menor toxicidad: los productos que se utilizan son menos contaminantes y tóxicos (para las personas y el medioambiente) que los utilizados en otros protocolos de extracción (como el fenol y el cloroformo).
- _ Económico: de los diversos protocolos de extracción que existen actualmente, el chelex es el más económico.
- _ Minimiza pérdidas de ADN: al ser protocolos con pocos pasos y realizarse en un mismo tubo, las pérdidas de ADN por errores de manipulación son mínimas.

En cuanto a los **inconvenientes o desventajas** son los siguientes:

- _ Su capacidad de purificación del ADN es mucho menor que la de otros protocolos ya que se limita a bloquear el exceso de iones y no elimina otro tipo de moléculas tipo proteínas que pueden interferir en el análisis.
- _ El rendimiento en cuanto a cantidad de ADN que logra extraer es también menor que el de otros métodos.

Según nuestra experiencia en el laboratorio, cuando tenemos sangre total o bien manchas de sangre recientes, el proceso de extracción con Chelex tiene una alta eficacia.

En este tipo de muestras el ADN se encuentra en bastante cantidad por lo que, aunque el Chelex no logre extraer todo el ADN, la cantidad que se obtiene es suficiente para el resto del análisis.

Además, como la cantidad de muestra de la que se parte suele ser pequeña (unos 10 μ l de sangre) y está en buenas condiciones, la concentración de moléculas contaminantes es pequeña y no suele interferir en la obtención de un buen resultado.

En nuestro laboratorio se aplica este protocolo en los casos de estudio biológico de paternidad cuando las muestras recibidas son sangre total o manchas de sangre y se encuentran en buen estado.

Proceso de extracción del ADN con fenol-cloroformo.

La extracción orgánica con fenol-cloroformo es el método más utilizado en todos los laboratorios de Genética Forense, sobre todo para aquellas muestras en las que se presume que el ADN:

- _ pueda estar parcialmente dañado,
- _ O en pequeña cantidad,
- _ O con una elevada concentración de sustancias contaminantes.

La mayoría de los indicios recibidos para la resolución de casos de criminalística o para estudios de identificación presentan alguno de estos problemas, por lo que siempre, ante este tipo de muestras el método de elección suele ser la extracción orgánica.

Al igual que en los protocolos de extracción con Chelex, existen diversos protocolos de extracción orgánica con fenol-cloroformo en función del tipo de muestra con el que se vaya a trabajar.

El fundamento de todos ellos es el siguiente:

- _ El primer paso consiste en la rotura de las membranas celulares mediante la incubación (en un baño a 56° C) con una enzima denominada proteinasa K, dicha enzima tiene la propiedad de romper las proteínas presentes en las membranas celulares, por lo que, tras este paso el ADN queda liberado del interior del núcleo de las células.
- _ Una vez libre, el ADN es purificado mediante una mezcla de solventes no miscibles, uno acuoso (cloroformo) y otro orgánico (fenol). Dada la fuerte hidrofiliidad que los grupos fosfato confieren a los ácidos nucleicos, estos son muy solubles en agua, por lo que tenderán a permanecer en la fase acuosa, en tanto que los lípidos y gran parte de las proteínas desnaturalizadas se encontrarán en la fase orgánica. De esta forma conseguimos obtener el ADN mucho más purificado que con los protocolos de Chelex.
- _ Tras separar la fase acuosa (la que contiene el ADN) ésta se hace pasar a través de unos filtros con un tamaño poro que permite el paso de moléculas de tamaño menor al ADN, quedando éste retenido en el filtro. Una vez retenido se hacen uno o dos lavados con agua estéril y se recupera el ADN en el volumen de agua que se desee.

Existen protocolos de extracción orgánica con fenol-cloroformo aplicables a diversos sustratos como son:

- _ Sangre (total o en manchas).
- _ Semen.
- _ Hisopos vaginales tomados a víctimas de una agresión sexual.
- _ Saliva (depositada en hisopos, tejidos de algodón, sellos, sobres,

cigarrillos, etc.).

- _ Pelos.
- _ Huesos.
- _ Diente.

Ventajas e inconvenientes de los protocolos de extracción con fenol-cloroformo.

Lo mismo que ocurre con el Chelex, estos protocolos presentan una serie de ventajas e inconvenientes que deben ser valorados por los analistas a la hora de trabajar con un determinado tipo de muestra.

Entre las **ventajas** se encuentran básicamente dos:

- _ La capacidad purificadora que tienen es mucho mayor que la de los protocolos con Chelex.
- _ El rendimiento en la extracción, en cuanto a cantidad de ADN extraído también es mayor.

Los **inconvenientes** son los siguientes:

- _ El método es más lento: mientras que la extracción con Chelex dura aproximadamente 3 horas, la extracción orgánica requiere dos días.
- _ Los reactivos utilizados son más caros que el Chelex.
- _ El fenol-cloroformo es tóxico y requiere trabajar en campana de protección.
- _ La manipulación es mayor, hay que trasvasar la muestra varias veces, con lo que la probabilidad de error y de pérdida de ADN (una vez extraído) es mayor.

Como ya hemos apuntado varias veces, la extracción orgánica permite obtener en todo tipo de muestras biológicas, un ADN de mejor calidad y en mayor cantidad que la extracción con Chelex o con algunos kits comerciales.

En aquellos casos en los que la cantidad de muestra así como la calidad sean idóneas, la extracción con Chelex ofrece más ventajas que inconvenientes y no será necesario utilizar un método de extracción orgánica.

Esto es lo que ocurre con las muestras que suelen tomarse para los estudios biológicos de paternidad.

Desgraciadamente, la mayoría de los indicios biológicos encontrados en la escena del crimen suelen ser mínimos o bien estar en malas condiciones, por lo que lo más apropiado ante este tipo de muestras es llevar a cabo un proceso de extracción orgánico.

3.1.2- Cuantificación del ADN extraído.

Una vez que se ha conseguido extraer el ADN, en mayor o menor cantidad y más o menos purificado, antes de proceder a analizarlo es necesario saber qué cantidad de ADN se tiene y, cuando se puede, cuál es la calidad del mismo.

Para el siguiente paso del análisis que es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es muy importante conocer esta información ya que, tanto el defecto como un exceso de ADN pueden dar lugar a resultados negativos o a problemas en la interpretación de los resultados.

Las muestras forenses tienen una peculiaridad más y es que, los indicios son tan variables, que nunca se sabe cuál es la cantidad de ADN que se puede obtener. Dos pelos o dos manchas de sangre que parezcan iguales pueden dar cantidades de ADN diferentes. Casi no existen términos medios generales, por lo que se impone el cuantificar el ADN en casi todas las ocasiones.

Existen distintas técnicas para cuantificar el ADN, algunas de ellas son:

- _ Cuantificación mediante electroforesis en geles de agarosa.
- _ Cuantificación mediante la técnica denominada "slot-blot".
- _ Espectrofotometría.

Cuantificación mediante electroforesis en geles de agarosa.

La agarosa es un polímero derivado de un polisacárido neutro, que gracias a su poder de gelificación y propiedades físico-químicas, lo han convertido en el soporte más común para electroforesis en el área de la Biología Molecular.

Cuando en este soporte se colocan moléculas de ADN y se aplica un campo eléctrico, el ADN migra a través del gel a una velocidad determinada en función del tamaño de la molécula.

Para visualizar el ADN se añade al gel una sustancia llamada bromuro de etidio que es un agente intercalante que se une específicamente al ADN y que emite una fluorescencia de color naranja cuando se expone a luz ultravioleta.

La cantidad de ADN extraído a partir de una determinada muestra se mide comparando la intensidad de fluorescencia emitida por dicho ADN con la de una muestra control de concentración conocida.

Esta técnica de cuantificación presenta las siguientes **ventajas**:

- _ es un método sencillo, rápido y económico.

Por el contrario, presenta una serie de **inconvenientes** como son:

- _ La utilización de productos cancerígenos (bromuro de etidio);
- _ Su nivel de sensibilidad es bajo, de manera que no detecta cantidades pequeñas de ADN (por debajo de 1 ng);
- _ no es específico de ADN humano, es decir, cualquier ADN (por ejemplo el ADN bacteriano) también daría fluorescencia.

Cuantificación mediante espectrofotometría.

Esta técnica está basada en la capacidad de las distintas sustancias para absorber luz.

Cada fracción celular absorbe un máximo de luz a una determinada longitud de onda, lo cual nos ayuda a diferenciar y cuantificar cada uno de los componentes celulares.

Un espectrofotómetro es un aparato que hace pasar un haz de luz de una única longitud de onda a través de una cubeta de dimensiones determinadas.

La cantidad de luz absorbida o absorbancia (DO), está en relación con la concentración de la sustancia.

Los ácidos nucleicos (ADN o ARN) tienen su máximo de absorción a 260 nm.

Un valor de absorbancia de 1 (a 260 nm), medida en una cubeta de cuarzo, equivale a 50 µg/ml de ADN y a 40 µg/ml de ARN.

Si hacemos el cociente entre la absorbancia de la muestra a 260 nm y a 280 nm (DO_{260} / DO_{280}) podremos obtener una estimación del grado de pureza del ácido nucleico ya que 280 nm es el máximo de absorbancia para las proteínas.

De esta manera, las preparaciones puras de ADN o ARN dan valores para este cociente de 1.8 y 2, respectivamente.

Si existe contaminación en la muestra por proteínas el valor de este cociente será significativamente menor que los valores obtenidos para muestras puras.

Cuantificación mediante la técnica denominada "slot-blot".

El Slot-Blot es una de las técnicas que existen para transferir e inmovilizar ADN y proteínas a una membrana de nylon o nitrocelulosa.

Una variante de esta técnica es el protocolo denominado Quantiblot y que

ha sido comercializado por la casa Applied Biosystems para su aplicación en cuantificación de ADN.

Este protocolo de cuantificación de ADN está basado en la hibridación de una sonda de ADN marcada con biotina a muestras de ADN previamente inmovilizadas en una membrana de nylon.

La sonda es un fragmento de la secuencia satélite alfa de primates que se encuentra localizado en el locus D17Z1.

Seguidamente, la unión de una enzima conjugada: HRP-SA (horseadish peroxidase streptavidin) a la biotina de la sonda permite una detección tanto colorimétrica (en función de la intensidad de color) como quimioluminiscente (según la intensidad de luminiscencia emitida).

En el caso de la detección colorimétrica, la oxidación del cromógeno (TMB), catalizada por la enzima HRP-SA, origina un precipitado de color azul directamente en la membrana.

En la detección quimioluminiscente, la oxidación de un luminol catalizada por la HRP-SA resulta en la emisión de fotones que son detectados por autorradiografía. En ambos casos la cantidad de ADN es determinada por comparación con unos patrones de ADN humano.

3.1.3- Amplificación del ADN por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR) permite amplificar más de un millón de veces el ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos.

La PCR es una forma simple y a la vez rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas. La técnica fue ideada tras observar el proceso natural de copia (o replicación) del ADN. Por tanto, la PCR es un proceso de síntesis de ADN "in vitro", utilizando como molde un ADN patrón.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-30 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar.

Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada Taq polimerasa. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C).

La reacción se lleva a cabo en una serie de ciclos, cada uno de los cuales incluye tres fases o pasos:

1.- Desnaturalización: Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla.

2.- Hibridación: Esta fase se denomina también fase de "annealing" o de emparejamiento.

3.- Extensión: Durante este paso la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada.

Estas 3 etapas se repiten un determinado número de veces, constituyendo cada etapa lo que se denomina un ciclo. En cada ciclo obtendremos dos copias por cada molécula de ADN, de manera que el número de copias va incrementándose de manera exponencial. Para hacernos una idea de la capacidad multiplicadora de la PCR, tras unos 30 ciclos y si partiéramos de una sola molécula de ADN, habrá generado unas 100.000 copias de la secuencia que se quiera amplificar.

Una vez mezclados todos los componentes en un tubo, para que la reacción tenga lugar, es necesario colocar el tubo de PCR en un equipo llamado Termociclador que no es más que un aparato con capacidad de subir y bajar la temperatura en poco tiempo y en el que se programa las diferentes temperaturas correspondientes a cada una de las fases de la PCR.

Ventajas de la PCR en Genética Forense.

La PCR ofrece una serie de ventajas, frente al uso de las técnicas de análisis genético utilizadas con anterioridad, como son:

- _ **Rapidez y sencillez** de la técnica: La PCR permite obtener copias de ADN en pocas horas, utilizando equipos relativamente poco sofisticados. Una reacción de PCR típica consiste en 30 ciclos de desnaturalización, hibridación y elongación. Cada ciclo dura típicamente unos 3-5 minutos, por lo que la media de duración de una reacción típica estaría comprendida entre 90 y 150 minutos.
- _ Elevada sensibilidad, es decir, su capacidad para obtener resultados en casos en los que la cantidad de ADN es **mínima**: actualmente es posible amplificar a partir de cantidades tan pequeñas de ADN como puede ser 1 ng.
- _ Su capacidad para obtener resultados en casos en los que el ADN esté parcialmente **degradado**: la PCR permite es idónea para amplificar fragmentos de ADN de pequeño tamaño (como son los STR, recordar tema 3). En el caso de indicios biológicos en los que el ADN está parcialmente degradado, es probable que muchos de los STR, al ser de pequeño tamaño, no se encuentren degradados en todas las moléculas de ADN y por lo tanto, puede obtenerse un resultado de amplificación positivo.

- _ Genera en un espacio corto de tiempo un **elevado número de copias** de la secuencia de ADN que es objeto de estudio, lo cual permite utilizar técnicas de visualización más sencillas y rápidas que el uso de sondas marcadas radiactivamente.

Paradójicamente, una de las grandes ventajas de la PCR que es su elevada sensibilidad puede, en ocasiones, convertirse en un gran problema ya que se podría coamplificar un ADN extraño o ajeno al que nos interesa aunque esté en pequeña cantidad.

No obstante, en los laboratorios de Genética Forense las medidas de precaución que se toman para evitar problemas de contaminación por manipulación son extremas; más aún cuando se trabaja con muestras mínimas (restos óseos, muestras antiguas, etc.) ya que en estos casos la presencia de ADN ajeno a la muestra podría interferir en la obtención del resultado, de tal manera que lo que se observe sea, bien el perfil del ADN contaminante o bien una mezcla de ambos perfiles (el de la muestra y el de la muestra o ADN contaminante).

3.1.4- Electroforesis.

Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes son separados en función de su tamaño por medio de un proceso de electroforesis.

Básicamente, la electroforesis es un proceso físico mediante el cual partículas cargadas migran a través de un determinado soporte cuando son sometidas a la fuerza de un campo eléctrico. El ADN, debido a la presencia de grupos fosfato, tiene carga negativa, por lo que, dentro de un campo eléctrico, tenderá a moverse hacia el polo positivo o ánodo. Todos los fragmentos de ADN migrarán hacia el ánodo, pero los fragmentos más pequeños lo harán de manera más rápida que los de mayor tamaño.

Existen diferentes métodos de electroforesis en función del medio en el que se lleve a cabo la separación. Los más utilizados actualmente en Genética Forense son tres:

- _ Electroforesis en geles de agarosa.
- _ Electroforesis en geles de acrilamida.
- _ Electroforesis capilar

Electroforesis en geles de agarosa.

El fundamento de este proceso es idéntico al descrito en el apartado de “cuantificación de ADN”. La única diferencia es que, en el proceso de electroforesis, tras la PCR lo que se mide no es la cantidad de ADN total, sino el tamaño del fragmento de ADN de interés. Para ello es necesario colocar en

el mismo gel una mezcla de fragmentos de ADN de tamaño conocido (estándar), los cuales sirven como referencia de peso molecular.

El inconveniente de este tipo de electroforesis es la baja resolución ya que no permite diferenciar entre fragmentos que difieran en pocas pares de bases.

Actualmente, en la mayoría de los laboratorios, debido a la rapidez y sencillez, ha quedado relegado como método de chequeo o comprobación de un resultado positivo o negativo de amplificación.

Electroforesis en geles de acrilamida.

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

Al igual que en los geles de agarosa, cuando se genera un campo eléctrico en el gel, los fragmentos se desplazan a través de los poros del gel hacia un electrodo (los fragmentos de DNA, con carga negativa, migran hacia el electrodo positivo o ánodo).

Una vez realizada la electroforesis la visualización se realiza mediante tinción con nitrato de plata, este reactivo se une específicamente al ADN de manera que, al final del proceso lo que se observan son 1 o 2 bandas (depende de que el individuo sea homocigoto o heterocigoto) de color marrón oscuro.

El empleo de estos geles permite la separación de fragmentos que difieren hasta en un nucleótido de longitud, por lo que la resolución es bastante mayor que en el caso de los geles de agarosa.

Además, este sistema presenta la ventaja de que es una técnica sencilla y que no requiere un equipamiento muy costoso y, por tanto, puede ser aplicado para la resolución tanto de casos de criminalística como de estudios de paternidad.

No obstante, como se verá en el siguiente apartado, las ventajas aportadas por la electroforesis capilar están haciendo que este método esté siendo sustituido en la mayoría de los laboratorios de Genética Forense.

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (normalmente representada por su acrónimo en inglés, CE) es un método alternativo para la separación de fragmentos y obtención de secuencias de ADN que suple, en parte, los inconvenientes de los sistemas convencionales.

En este caso el soporte o medio de separación es un polímero incluido en un capilar de silica de unos 50 μm y de longitud variable lo cual hace que la cantidad de calor generado sea menor y que puedan aplicarse voltajes mayores.

La gran ventaja en cuanto a rapidez de la técnica se debe a que la preparación del gel y la carga de muestras se hacen de manera automática.

Por otro lado se consigue una mayor sensibilidad, al poderse obtener resultados interpretables en los casos en los que el número de copias obtenidas por PCR es bastante bajo, y aumenta la capacidad para diferenciar alelos que se distinguen en un par de bases. Además, los resultados obtenidos son analizados por un software evitándose así problemas de interpretación y permitiendo que éstos queden almacenados para posibles futuros análisis.

Para que pueda llevarse a cabo el análisis por electroforesis capilar es necesario que el ADN sea amplificado utilizando un par de primers o más (en el caso de los múltiplex) marcados en el extremo 5' con unas moléculas llamadas fluorocromos los cuales emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda cuando son excitados por láser.

Además, se necesita disponer de un analizador genético, que es un equipo preparado para llevar a cabo la electroforesis y que lleva acoplado un equipo informático con los programas necesarios para la recogida de datos e interpretación de los mismos.

El capilar en el que se lleva a cabo la electroforesis se encuentra cubierto por poliamida opaca excepto por una pequeña zona denominada "ventana del capilar" la cual es atravesada por el láser y permite que las muestras sean excitadas a su paso por la misma y emitan su fluorescencia.

Estas emisiones de fluorescencia son recogidas en una parte del equipo denominada cámara CCD.

Un software de recogida de datos define ciertas áreas en la cámara CCD para recoger exclusivamente las emisiones procedentes del grupo de fluorocromos que estemos utilizando. Por tanto, solamente se recogerán las emisiones de los fluorocromos con los que hemos marcado los primers de los fragmentos de ADN que queremos amplificar.

Es posible utilizar más de un fluorocromo, lo cual es de gran utilidad en el caso de las PCR múltiplex, sobre todo para evitar el solapamiento en aquellos marcadores de ADN que tengan tamaños similares.

Ventajas aportadas por los sistemas de Electroforesis Capilar frente a los sistemas de Electroforesis en geles de acrilamida.

Aunque algunas de las ventajas ya han sido comentadas anteriormente, haremos un breve resumen para comprender por qué la electroforesis capilar está sustituyendo a la electroforesis convencional en geles de acrilamida:

1.-Rapidez de la técnica: Por un lado la preparación del gel y la carga de las muestras en el mismo se hace de manera automatizada, lo cual ahorra tiempo; y por el otro lado, permite el análisis simultáneo de varios loci aunque éstos posean alelos con tamaños solapantes, actualmente hay kits preparados para electroforesis capilar que permiten el análisis simultáneo de **15 loci tipo STR en una sola reacción de PCR**.

2.-Sensibilidad: hace posible detectar cantidades muy pequeñas de ADN amplificado debido a la sensibilidad de la fluorocromos utilizados para el marcaje de los primers. De esta manera, resultados apenas visibles y por lo tanto, difícilmente interpretables por el ojo humano en geles de acrilamida, pueden llegar a ser visualizados e interpretados en equipos de electroforesis capilar.

3.- La cuantificación del tamaño en pares de bases del fragmento amplificado se hace de una manera exacta ya que, en los sistemas de electroforesis capilar, en cada muestra se incorpora un estándar interno de movilidad que permite medir de manera automática el tamaño, eliminando las diferencias de movilidad electroforética que pueden existir entre las diferentes calles de un gel de acrilamida.

4.-Los resultados se obtienen de manera informatizada, lo cual evita errores de interpretación de los resultados y facilita el análisis y almacenaje de los mismos a través de programas informáticos.

3.2- EXTRACCION Y CUANTIFICACION DEL ADN PARA NUESTRO ESTUDIO POBLACIONAL.

Se han analizado un total de 168 individuos no emparentados de ambos sexos, escogidos aleatoriamente entre aquellos residentes en Paraguay. A cada uno de ellos se le extrajo por venipunción entre 5 y 10 mililitros de sangre periférica que fue depositada en tubos estériles con anticoagulante EDTA-K₃.

Los tubos fueron marcados con números por lo que se desconoce la identidad de cada uno de los donantes. Una vez recibidas las muestras se guardó 1 mililitro de cada una en forma de mancha de sangre sobre un soporte de algodón de 2 x 2 cm y se conservaron en sobres individuales correctamente identificados a 4°C. Para la extracción de ADN se tomaron unos 50 µl de la muestra original previamente depositada sobre un soporte de algodón de 2x2 cm.

3.2.1- Protocolo de extracción del ADN.

1. Se añade a la muestra (sangre total o si la sangre se depositó en un soporte de algodón, se corta con un bisturí estéril un trozo de aproximadamente 7 x 5 mm):

- * 300 μ l de buffer de extracción (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2%SDS),
- * 7.5 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y
- * 12 μ l de DTT (1M).

2. Agitar a baja velocidad durante un segundo y centrifugar en una nanofuga durante 2 segundos. A continuación incubar a 56° C toda la noche (18-24 horas).

3. Centrifugar en nanofuga 2 segundos y eliminar el trozo de tela.

4. En una campaña extractora, añadir 300 μ l de fenol/cloroformo/isoamilalcohol 24:25:1 (saturado con 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, Sigma) agitar hasta conseguir una emulsión lechosa y centrifugar en microcentrífuga 3 minutos a máximas revoluciones (13.000 rpm).

5. Una vez separada la fase fenólica y clorofórmica se recupera la fase acuosa o clorofórmica que es la que contiene el ADN y se transfiere a un tubo Microcon-100 (Microcon YM-100, Millipore) al cual previamente se le ha añadido 100 μ l de TE⁻⁴ buffer o agua estéril.

-Es muy importante no tocar con la punta de la pipeta el filtro Microcon-100 para evitar dañarlo

6. Centrifugar a 500 x g durante 10 minutos.

7. Eliminar el filtrado y añadir 200 μ l de TE⁻⁴ buffer o agua estéril para limpiar la membrana.

8. Centrifugar a 500 x g durante 10 minutos.

9. Añadir el volumen de recuperación deseado (entre 50 y 200 μ l), pipetear varias veces (Sin tocar el filtro con la punta de la pipeta) y en un tubo limpio invertir la membrana y centrifugar a 500 x g 5 minutos. Descartar la membrana y cerrar el tubo.

3.2.2- Cuantificación del ADN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa.

La agarosa es un polímero derivado de un polisacárido neutro, que gracias a su poder de gelificación y propiedades físico-químicas, lo han convertido en el soporte más común para electroforesis en el área de la Biología Molecular.

Los geles de agarosa se forman porque las cadenas del polímero se unen entre sí formando una red tridimensional rígida, que mantiene unidas las moléculas de agua mediante puentes de hidrógeno.

El gel se funde cuando la agitación térmica es suficientemente elevada para desorganizar esta estructura tridimensional, quedando una disolución viscosa de polímeros desorganizados. Los geles de agarosa son estructuras a la vez rígidas y con poros de gran tamaño, que permiten que el gel sea atravesado por moléculas grandes, tales como ácidos nucleicos, lipoproteínas, o partículas víricas.

El tamaño de los poros depende inversamente de la concentración de agarosa; es posible formar geles útiles para electroforesis empleando cantidades de agarosa comprendidas, aproximadamente, desde el 0,4% en peso hasta el 5%.

De esta manera, utilizaremos geles de concentración más elevada para fragmentos pequeños y para fragmentos de elevado peso molecular (como es el caso del ADN extraído) geles de baja concentración (suelen realizarse al 0.8%).

A continuación se muestra una tabla que relaciona rangos de tamaños en kilobases con la concentración de agarosa óptima para su separación:

CONCENTRACIÓN DE AGAROSA (%)	RANGO DE SEPARACIÓN (KB)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

Cuando en este soporte se colocan moléculas de ADN y se aplica un campo eléctrico, el ADN migra a través del gel a una velocidad determinada en función del tamaño de la molécula, de su conformación interna y del voltaje.

Para visualizar el ADN se añade al gel una sustancia llamada bromuro de etidio que es un agente intercalante que se une específicamente al ADN y que emite una fluorescencia de color naranja cuando se expone a luz ultravioleta.

La cantidad de ADN extraído a partir de una determinada muestra se mide comparando la intensidad de fluorescencia emitida por dicho ADN con la de una muestra control de concentración conocida.

PROCOLO

1. **Preparación de la agarosa:** Como indicamos anteriormente, para cuantificar ADN utilizaremos agarosa al 0.8%. Para su preparación debemos pesar en una balanza 0.8 gr. de agarosa y disolverlos en 100 ml de buffer TBE 1X. Entonces, introducimos el recipiente en el que se haya preparado la agarosa en el microondas para proceder a su cocción. NOTA: Es recomendable dejar la agarosa, una vez que la añadimos al buffer TBE, unos 10 minutos a temperatura ambiente para que ésta se hidrate y tarde menos tiempo en disolverse.
2. Una vez cocida y disuelta completamente la agarosa, el siguiente paso es verterla sobre un molde de metacrilato que previamente hemos preparado.

Preparación del molde (7.9 X 10.5 cm.): Sellamos los extremos con una cinta adhesiva y colocamos unos peines que nos servirán para que se formen los pocillos en los que se sembrarán las muestras.

3. Una vez preparado el molde se vierte sobre el 30 ml de la agarosa cocida a los que previamente hemos añadido 50 µl de bromuro de etidio (mezclando muy bien) y se deja gelificar a temperatura ambiente una media hora.
4. **Preparación de las muestras:** Mientras transcurre este tiempo preparamos las muestras que van a ser cuantificadas. Para ello debemos mezclar 2 µl de un buffer de carga (Ficoll-400® al 5% + azul de bromofenol 0.1% + xileno cianol 0.1% + EDTA 100 mM + Tris-HCl 10 mM a pH 7.5) con 5 µl de muestra.

Además de las muestras que queremos cuantificar debemos poner muestras control de ADN de concentración conocida y un marcador de peso molecular.

El control de ADN suele ser un control comercial de una concentración determinada, a partir de la cual podemos hacer diluciones para poder intercalar entre nuestras muestras varios controles con diferentes cantidades de ADN y poder así determinar con más fiabilidad la concentración de ADN de la muestra problema.

El marcador de peso molecular consiste en una mezcla de fragmentos de ADN de diferentes tamaños (pb) que nos servirá para comprobar el tamaño de los fragmentos que estamos visualizando.

- Retiramos los peines con mucho cuidado y, tras sumergir el gel en una cubeta de electroforesis con buffer TBE 1X, colocamos en cada pocillo la muestra correspondiente.
- Establecemos en la fuente de electroforesis las condiciones electroforéticas adecuadas:

Voltaje (V): unos 100 V
Intensidad (mA): 40 mA
Potencia (W): 10-12 W
Tiempo: 20-30 min

- Leer el gel en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories) con luz UV. Al ser excitado por la luz UV, el bromuro de etidio (que se habrá intercalado entre las cadenas del ADN) emitirá una fluorescencia de color naranja.

Si el ADN no está degradado, se observará una banda naranja cuya intensidad dependerá de la cantidad de ADN que haya.

En caso de muestras degradadas se observará una especie de mancha a lo largo de la calle como consecuencia de la existencia de fragmentos de ADN de diferente tamaño.

- Interpretación de los resultados:** Cuando el ADN está intacto y se observa una banda nítida podemos estimar por comparación de la intensidad de fluorescencia de los controles, la cantidad de ADN que hay.

Debemos puntualizar que esta cuantificación es una estimación, no es una cuantificación exacta ya que las comparaciones se hacen por visualización directa del analista.

3.3- Amplificación y comprobación del producto de PCR.

Hemos analizado un total de quince loci tipo STR y un locus indicador de sexo (amelogenina) incluidos en un kit tipo multiplex: **GenePrint® PowerPlex™ 16 System** de Promega, preparado para ser detectado por electroforesis capilar con emisión de fluorescencia. La amplificación de todos los loci se realizó en un termociclador de la casa Perkin- Elmer (Thermo Cyclor 2400).

Kit GenePrint® PowerPlex™ 16 System

Este kit permite el análisis simultáneo de 16 loci, 15 STR y el locus amilogenina. Uno de los primers de cada pareja está marcado con un fluorocromo que confiere a cada marcador un color (verde, amarillo o azul) cuando son analizados en el aparato de electroforesis capilar.

Componentes del kit de amplificación:

Reactivo	Composición	Volumen para PCR
Gold STR 10X Buffer	MgCl ₂ , deoxinucleósidos trifosfatos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), BSA, azida sódica (NaN ₃)	2.5ml
PowerPlex® 16, 10X Primer Pair Mix	Parejas de primers para los 15 loci STR más la amilogenina	2.5 ml
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Enzima polimerasa	0.8 ml (4u)
Control DNA	ADN de una línea celular humana a una concentración de 1 ng/ml.	1 ml

La cantidad de ADN de cada muestra osciló entre **0.5 y 1 ng** y el volumen final fue de **25 ml**.

Condiciones de amplificación:

95°C durante 11 minutos.

96°C durante 1 minuto.

Rampa del 100% hasta 94°C durante 30 segundos.

Rampa del 100% hasta 60°C durante 30 segundos.

Rampa del 23% hasta 70°C durante 45 segundos.

10 ciclos

Rampa del 100% hasta 90°C durante 30 segundos.

Rampa del 100% hasta 60°C durante 30 segundos.

Rampa del 23% hasta 70°C durante 45 segundos.

22 ciclos

60°C durante 30 minutos.

4°C pausa.

En las amplificaciones además de las muestras se amplificó sistemáticamente dos controles: Uno **positivo**, para comprobar que la reacción de amplificación ha transcurrido correctamente, y otro **negativo**, para descartar una posible contaminación por ADN extraño.

Una de las ventajas que ofrecen este tipo de **Múltiplex PCR** es que se añaden en un mismo tubo de amplificación los primers necesarios para amplificar 16 marcadores distintos. Para ello es necesario optimizar muy bien las condiciones de amplificación y obtener aquellas en las que todos los primers funcionen perfectamente. En caso contrario podríamos obtener muy

buen resultado para unos marcadores pero no para otros.

Actualmente todos los laboratorios de Genética Forense trabajan con kits comerciales que incluyen todos los reactivos necesarios para amplificar conjuntamente una serie de marcadores. Con respecto a lo que sería amplificar uno a uno cada uno de los marcadores que se suelen utilizar, la múltiplex PCR ofrece una serie de ventajas:

1. **Ahorro de tiempo:** en el tiempo que se lleva hacer una sola reacción estamos obteniendo resultados para múltiples marcadores.

2. **Ahorro económico:** la cantidad de reactivos que se necesitan es menor, con lo que se abarata el coste total del análisis.

3. **Ahorro de muestra:** la cantidad de muestra que se requiere es menor que si hiciéramos las amplificaciones por separado, al ser una sola reacción el ADN se añade una sola vez. Este punto es muy importante en casos de muestras mínimas en los que la cantidad de ADN obtenida es muy pequeña y no nos daría para hacer varias reacciones de PCR.

4. El hecho de amplificar en una sola reacción permite que se aumente el número de marcadores estudiados, con lo que se **aumenta el poder de discriminación** del sistema.

Comprobación de la amplificación.

Una vez finalizada la reacción de amplificación y antes de comenzar con el tipado de las muestras es recomendable, para ahorrar tiempo y reactivos, comprobar los productos de la amplificación mediante la migración electroforética de los mismos en geles de agarosa al 2% en solución TBE 1X y con 50 μ l de Bromuro de Etidio (0.3 mg/ml). En cada pocillo se depositan 5 μ l de producto amplificado más 2 μ l de un buffer de carga compuesto por glicerol y Azul de Bromofenol. Las condiciones electroforéticas que se aplican son: 10 Vatios, 100 mA y 100 voltios. Tras unos 30 min. Las muestras son visualizadas iluminando el gel con luz UV. De esta manera es posible saber si la amplificación ha sido positiva y, en caso afirmativo puede observarse la intensidad de amplificación indicándonos si debemos aumentar o disminuir la cantidad de producto amplificado que se va a utilizar para el tipado de las muestras (ya sea en gel vertical desnaturizante de poliacrilamida o en electroforesis capilar).

3.4- ELECTROFORESIS

Una vez amplificado el ADN, los fragmentos resultantes son separados en función de su tamaño por medio de un proceso de **electroforesis**.

Básicamente, la electroforesis es un proceso físico mediante el cual partículas cargadas migran a través de un determinado soporte cuando son sometidas a la fuerza de un campo eléctrico.

El ADN, debido a la presencia de grupos fosfato, tiene carga negativa, por lo que, dentro de un campo eléctrico, tenderá a moverse hacia el polo positivo o ánodo. Todos los fragmentos de ADN migrarán hacia el ánodo, pero los fragmentos más pequeños lo harán de manera más rápida que los de mayor tamaño.

Las muestras amplificadas con el kit fueron tipadas por electroforesis capilar en un analizador genético ABI Prism 310 de Applied Biosystem.

Antes de cargar las muestras en el 310 son necesarios una serie de pasos para prepararlo adecuadamente y que las muestras puedan ser analizadas sin problema.

La **electroforesis capilar** (normalmente representada por su acrónimo en inglés, CE) es un método alternativo para la separación de fragmentos y obtención de secuencias de ADN que suple, en parte, los inconvenientes de los sistemas convencionales.

En este caso el soporte o medio de separación es un polímero incluido en un capilar de silica de unos 50 μm y de longitud variable lo cual hace que la cantidad de calor generado sea menor y que puedan aplicarse voltajes mayores.

La gran ventaja en cuanto a rapidez de la técnica se debe a que la preparación del gel y la carga de muestras se hacen de manera automática.

Por otro lado, se consigue una mayor sensibilidad, al poderse obtener resultados interpretables en los casos en los que el número de copias obtenidas por PCR es bastante bajo, y aumenta la capacidad para diferenciar alelos que se distinguen en un par de bases.

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

Para que pueda llevarse a cabo el análisis por electroforesis capilar es necesario que el ADN sea amplificado utilizando un par de primers o más (en el caso de los múltiplex) marcados en el extremo 5' con unas moléculas llamadas *fluorocromos* los cuales emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda cuando son excitados por láser.

Además, se necesita disponer de un analizador genético, que es un equipo preparado para llevar a cabo la electroforesis y que lleva acoplado un equipo informático con los programas necesarios para la recogida de datos e interpretación de los mismos. En el mercado existen diferentes tipos de analizadores genéticos para electroforesis capilar, uno de ellos es el ABI Prism® 310 de Applied Biosystem.

3.4.1- Descripción del analizador ABI Prism® 310

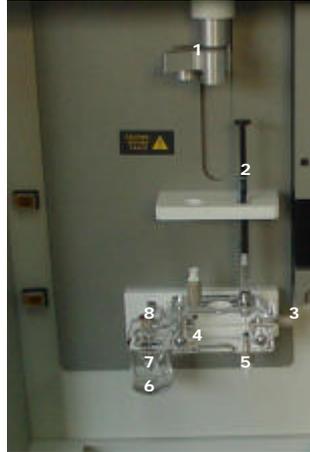
Fundamentalmente el analizador genético consta de dos partes:

1. Una en la que se lleva a cabo todo el proceso de inyección de polímero hacia el capilar, electroforesis y detección de la fluorescencia,
 2. y el sistema informático acoplado al analizador.
1. **Zona de la jeringa y del bloque de metacrilato:** esta zona es la encargada de bombear el polímero hacia el capilar. Consta de una jeringa que se rellena de polímero (que es el medio en el que se llevará a cabo el proceso de electroforesis) y un bloque de metacrilato con conductos internos al que va conectado el capilar.

En el bloque de metacrilato, además de una serie de válvulas, se encuentra el electrodo positivo o ánodo al cual va acoplado el reservorio de buffer (el buffer es necesario para crear la diferencia de potencial entre los electrodos y que se lleva a cabo la electroforesis).

Entre las válvulas del bloque se encuentran:

- Válvula del buffer del ánodo: se mantiene cerrada mientras se realiza el relleno del capilar y se abre para contactar el polímero con el buffer durante la electroforesis.
- Válvula de deshecho: permite la salida de exceso de polímero.

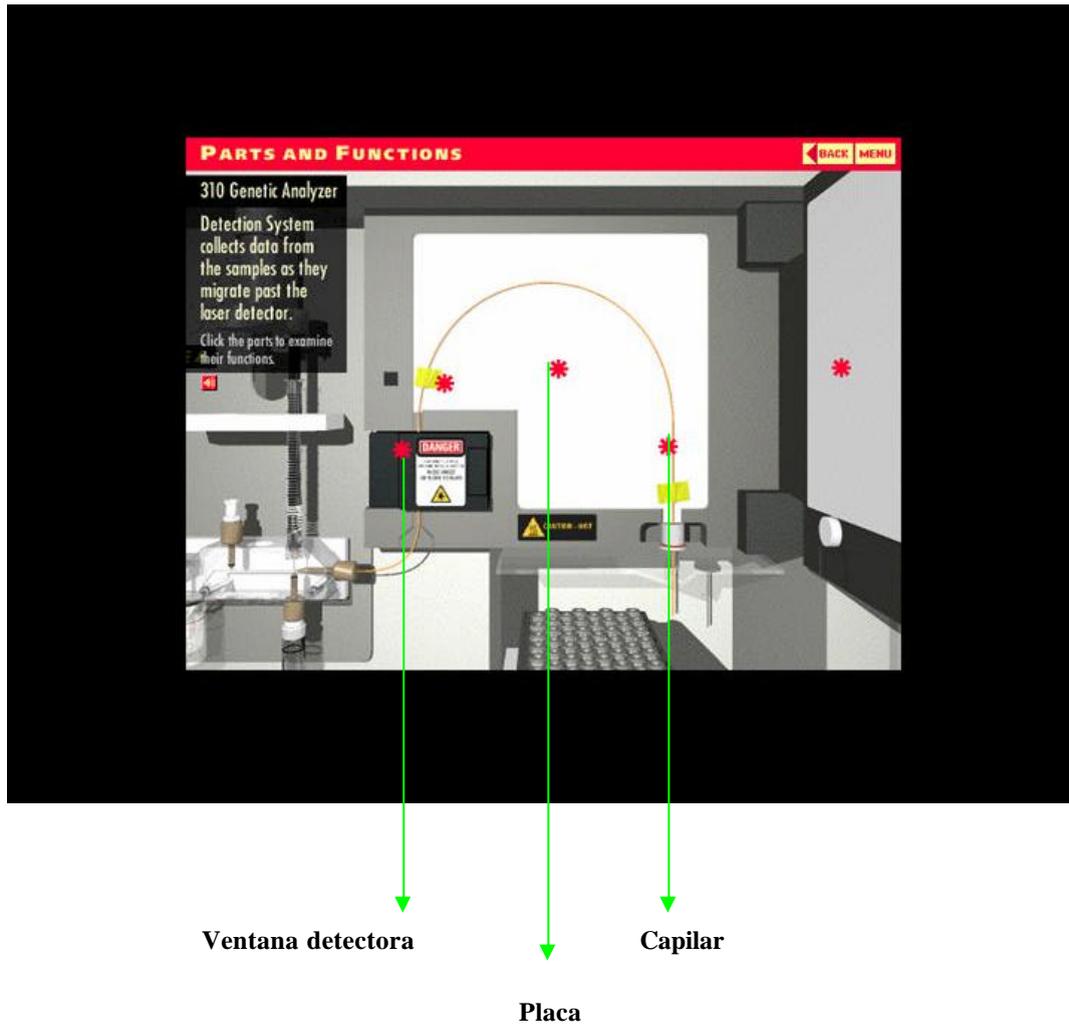


Diferentes componentes de la zona de inyección de polímero: **1. Brazo impulsor:** ejerce sobre la jeringa la presión necesaria para inyectar el polímero en el capilar. **2. Jeringa:** la cual va rellena de polímero. **3. Válvula del capilar:** une el bloque de metacrilato con el capilar. **4. Bloque de metacrilato:** Compuesto por una serie de conductos internos a través de los cuales fluye el polímero y por los que los dos electrodos quedan unidos durante la electroforesis. **5. Válvula de deshecho:** Sirve para eliminar el exceso de polímero. **6. Reservorio de buffer:** en el que queda inmerso el electrodo positivo (**7**) o ánodo. **8. Válvula del buffer:** sólo permanece abierta durante la electroforesis.

2. Zona de Electroforesis y detección de la fluorescencia

Esta zona consta de las siguientes partes:

- Una **placa o plato** que proporciona al capilar la temperatura adecuada para la electroforesis (60° C en análisis de fragmentos y 50° C en secuenciación)
- El **capilar de silica** relleno de polímero: es el soporte de la electroforesis.
- Un **láser de argón**.
- Una **cámara CCD** que recoge la fluorescencia emitida por los fluorocromos. Un software de recogida de datos define ciertas áreas en la cámara CCD para recoger exclusivamente las emisiones procedentes del grupo de fluorocromos que estemos utilizando. Por tanto, solamente se recogerán las emisiones de los fluorocromos con los que hemos marcado los primers de los fragmentos de ADN que queremos amplificar.
- Una **ventana detectora** a la cual va acoplada la ventana del capilar y que es atravesada por el láser para excitar a los fluorocromos a su paso por ésta.



Una vez que las muestras amplificadas han sido preparadas y desnaturalizadas se colocan en un soporte con capacidad para 48 o 96 tubos y que encaja en la parte del analizador destinada a la **carga de muestras** (conocida como distribuidor de muestras o *autosampler* que es su denominación inglesa). El autosampler se encarga de mover el soporte y, por lo tanto, los tubos de manera que el capilar pueda ser introducido en los mismos.

Además dispone de **2 viales** de 4 ml: uno en el que se añade el buffer y otro que es el vial de deshecho; y un tubo eppendorf de 1.5 ml en el que se coloca agua destilada que se utiliza para lavar el electrodo negativo y el capilar entre unos análisis y otros.

Encima del autosampler se encuentra el **electrodo negativo** que está conectado a una fuente de alto voltaje y proporciona la corriente necesaria para la electroforesis.

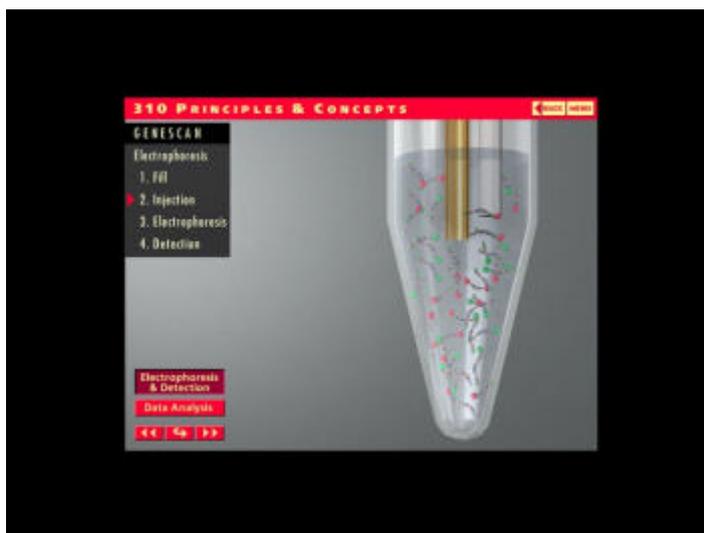
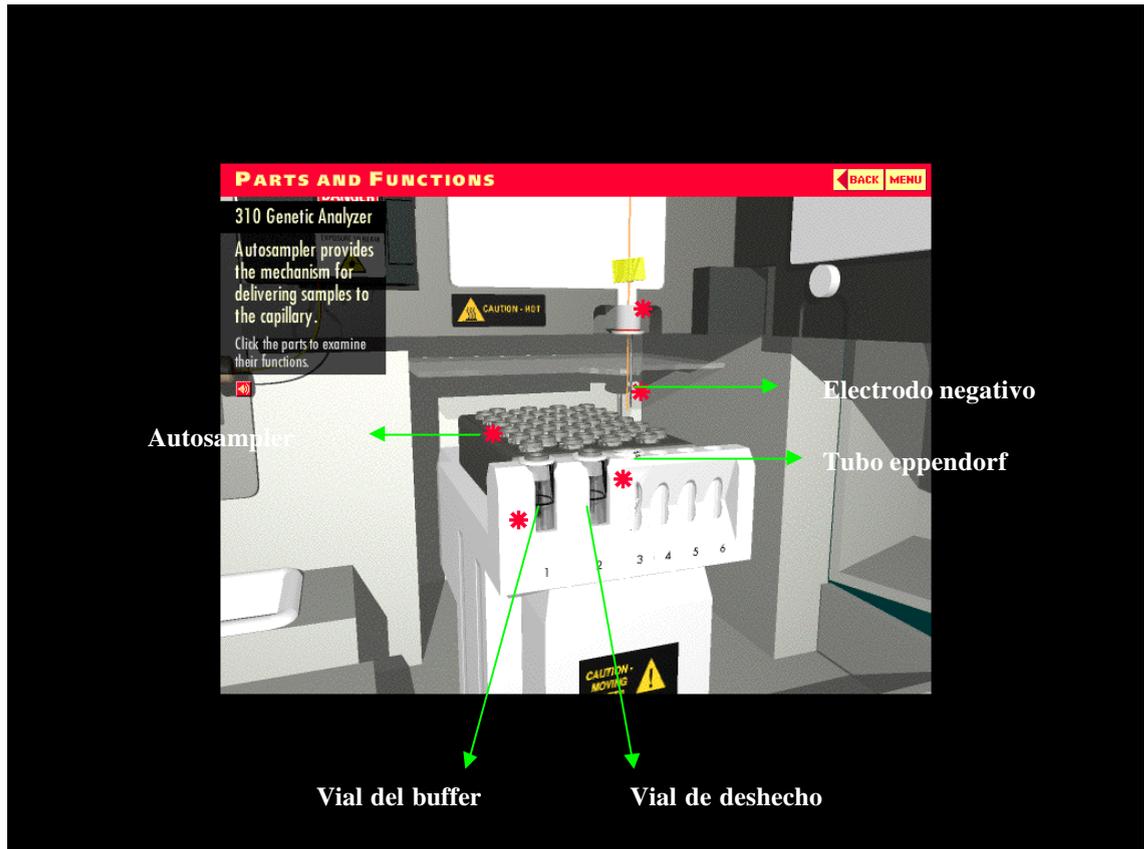


Imagen del proceso de **inyección electrocinética** de la muestra de ADN amplificada en el capilar. El electrodo (en color amarillo) emite una descarga de 15000 V de manera que las moléculas de ADN cargadas son atraídas hacia el capilar (en color blanco). De esta forma lo que se consume en la electroforesis son directamente las moléculas del ADN amplificado y el volumen de la reacción permanece prácticamente constante.

Una vez que las muestras han sido analizadas los datos generados son recogidos por el *ordenador*.

El ordenador acoplado al secuenciador ABI Prism 310 es un Macintosh el cual permite la instalación de diversos programas informáticos con diferentes funciones.

El ABI Prism 310 Data Collection Software es el programa que recoge lo que se denomina el dato bruto o raw data y que es la fluorescencia detectada en la cámara CCD cuando los fragmentos marcados, separados por electroforesis y excitados por el láser pasan por la ventana de detección.

Existen dos programas que analizan el dato bruto y lo convierten en secuencia de ADN o en fragmentos de un determinado tamaño:

- ABI Prism®DNA Sequencing analysis: para secuenciación.
- GeneScan® Analysis: para análisis de fragmentos.

Veremos cómo analizar fragmentos con el GeneScan® Análisis y su posterior asignación de alelos mediante otro programa informático llamado Genotyper®2.0.

3.4.2- Descripción del proceso de electroforesis y detección de fluorescencia en el ABI Prism® 310

Dividiremos el proceso en varias etapas:

- Montaje del bloque y del capilar
- Preparación de las muestras y del ladder
- Preparación de la hoja de muestras
- Preparación de la lista de inyección
- Interpretación de los resultados

Montaje del bloque de metacrilato y del capilar

Debemos seguir los siguientes pasos en el orden que se indican:

1. Establecer comunicación entre el ordenador y el 310: este paso sólo es necesario cuando el equipo no se va a utilizar en un período de tiempo mínimo de unos diez días y ha sido por tanto apagado. Si se utiliza de manera rutinaria lo normal es que esté siempre encendido.
2. Abrir el software de recogida de datos "ABI PRISM™ 310 Collection" y permitir a través de dicho programa que el 310 reconozca la posición del distribuidor de muestras ("autosampler") y de la bomba ("syringe").

3. Colocar el bloque de metacrilato que ha de estar limpio y seco, y ajustar cada una de las válvulas.

4. Colocar el capilar. Antes de colocarlo se limpia la ventana del capilar con un papel embebido en etanol absoluto, a continuación con otro embebido en agua destilada y seguidamente se seca. Tras limpiar la ventana se introduce el capilar en la válvula que le conecta con el bloque de metacrilato hasta llegar a la primera intersección y se aprieta bien la válvula; es importante no rebasar esta primera intersección ya que si no se sitúa el extremo del capilar correctamente puede impedirse que el polímero penetre en él. A continuación se sitúa la zona de lectura del capilar en la ventana del láser y se cierra la puerta del láser, se introduce el otro extremo en el bloque que contiene el electrodo negativo o cátodo y se desliza hasta que queden a la misma altura y separados 2 mm. Por último se sujeta el capilar con una cinta adhesiva contra la placa termoestabilizadora.

5. Preparar el buffer 1X. Hacer una dilución 1:10 con agua bidestilada del buffer 10X (310 Genetic Analyzer buffer) con un volumen final de 15 ml (11ml para el vial del ánodo y 4 ml para el vial del buffer).

6. Relleno del capilar y del bloque de metacrilato con el polímero. El polímero utilizado para el análisis de fragmentos es el POP-4 (Performance Optimized Polymer 4, Perkin Elmer) y debe sacarse media hora antes de su uso del frigorífico para que se atempere. Con la jeringa bien limpia se toma el volumen de polímero necesario en función del número de muestras, se enrosca bien para evitar pérdidas de polímero y se llenan los conductos del bloque de metacrilato con mucho cuidado de que no se formen burbujas de aire.

Por último, se hace contactar el brazo impulsor con el émbolo de la jeringa utilizando la orden "syringe down" (en "manual control") dentro del programa ABI Prism 310 Collection.

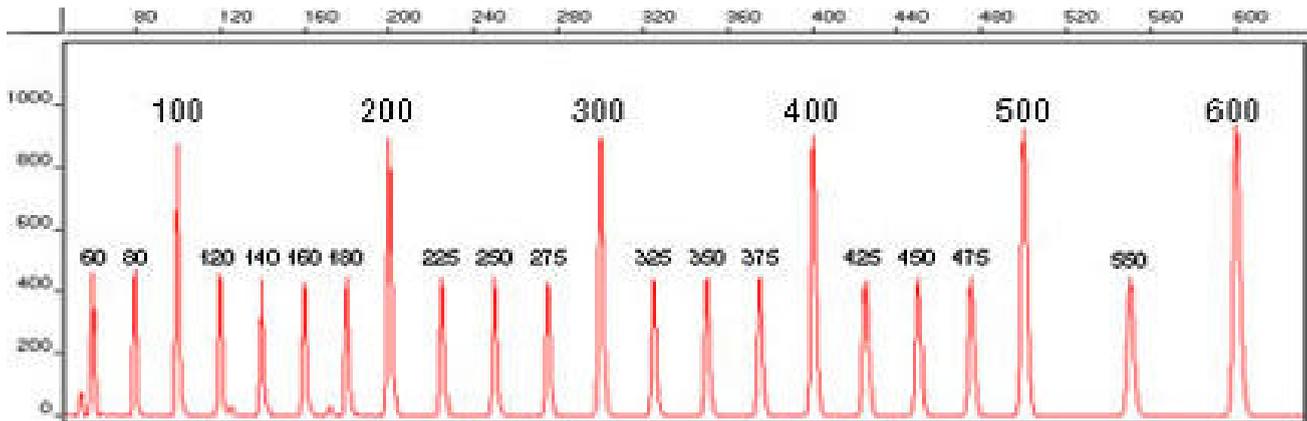
Una vez colocado el capilar y relleno el bloque de metacrilato con el polímero, lo cual equivaldría a la preparación del gel en los métodos convencionales de electroforesis, el siguiente paso es la preparación de las muestras.

Preparación de muestras y ladder

Para preparar las muestras añadiremos en un tubo de 0.5 ml los siguientes volúmenes por muestra:

- **24 ml de formamida desionizada** (Ultra Pure Grade, Amresco)
- **1 ml del estándar de tamaño** (el estándar a utilizar depende del kit que se haya utilizado para amplificar; así, para muestras amplificadas con nuestro Kit el estándar utilizado es el de 600 [ROX] Size Standard). El estándar contiene fragmentos de ADN de tamaños determinados de manera que como

los fragmentos de la muestra deben estar entre esos tamaños, el ordenador asigna el tamaño exacto a través de una interpolación con los picos del estándar. Es importante señalar que como cada muestra lleva su propio estándar, la asignación del tamaño en pares de bases se hace de manera exacta aun en el caso en que hubiese diferencias de movilidad electroforética entre unas muestras y otras. Con el estándar utilizado es posible analizar fragmentos de entre 60 y 600 pares de bases. En total consta de 22 fragmentos de las siguientes longitudes:



- **1.5 ml de producto amplificado o de ladder.** El ladder será el específico para el marcador que se haya amplificado y, como regla general, se suelen preparar dos tubos con ladder por carrera (o run).

Una vez preparadas las muestras éstas se desnaturalizan a 96° C durante 3 min., se ponen en hielo y se coloca cada tubo en su posición adecuada dentro del soporte que va acoplado al distribuidor de muestras.

Hoja de muestras ("Sample Sheet")

1. Para preparar la hoja de muestras es necesario abrir el programa *ABIPrism 310 Collection*.
2. Una vez abierto, se procede a rellenar una nueva hoja con el nombre de las muestras en función de su colocación en el autosampler. Para ello elegimos la opción File y después New (elegimos GeneScan Sample Sheet 48 tubes, y si tenemos más de 48 muestras la opción de 96 tubes). Una vez abierto el nuevo documento completamos cada una de las columnas. En la primera, el nombre de la muestra y el número de la amplificación. Para cada muestra se requiere especificar el color del estándar, en la columna "Std" de la hoja aparecerá un rombo junto al color elegido para el estándar. A continuación se completa la columna "Sample Info" en la que se anota la información referente al nombre de la muestra.

- Una vez completa la hoja de muestras la guardamos en la carpeta "Sample Sheets" mediante la opción "Save as" (por defecto el ordenador nos salva la hoja con la fecha y hora del momento en que se salva la misma).

Hoja de inyección

En esta lista se incorpora la hoja de muestras creada y grabada anteriormente y en ella es posible modificar el orden de análisis de las muestras e incluso repetir algunas de las muestras cambiando alguno de los parámetros de análisis como el tiempo de inyección.

- Para **abrir una nueva lista** de inyección abrimos de nuevo el programa *ABIPrism 310 Collection*. Buscamos la opción File y en New seleccionamos GeneScan Injection List.
- Una vez abierto el documento en blanco incorporamos la Hoja de Muestras que vayan a ser analizadas. Para ello, pinchamos en el cuadro donde pone "**Sample Sheet**" y aparecerán ordenadas todas las hojas de muestras realizadas hasta el momento según la fecha. Seleccionamos la que corresponda y, automáticamente aparecerá la lista de las muestras en la columna "Tube and Sample Name".
- Selección del módulo:** El módulo contiene las funciones específicas ejecutadas para el proceso de análisis de las muestras. En el caso de análisis de fragmentos el módulo seleccionado es el *GS STR POP-4 A (1ml)*. Este módulo implica una serie de parámetros de análisis:

Tiempo de inyección (Inj. Secs):	3 sg
Voltaje de inyección (Inj.KV):	15 KV
Voltaje de electroforesis (Run KV):	15 KV
Temperatura de electroforesis (Run ° C):	60° C
Tiempo de electroforesis (Run Time):	24 min.

A continuación se explica cómo influiría una modificación en cada uno de los parámetros.

- **Voltaje y tiempo de inyección** (para inyección electrocinética): ambos parámetros pueden ser variados para regular la cantidad de ADN que entra en el capilar. Así, en el caso de obtener una señal débil en una muestra es posible aumentar el tiempo de inyección para permitir que se inyecte más cantidad de producto amplificado al capilar y que aumente la señal de fluorescencia. No obstante, un tiempo de inyección excesivo puede originar una pérdida de resolución.

- **Voltaje de electroforesis:** para fragmentos analizados utilizando el polímero POP-4 el voltaje estándar es de 319 V/cm. Para un capilar de 47 cm esto supone un voltaje total de 15000 V y la corriente a este voltaje es de 8-9 μ A. Bajo estas condiciones electroforéticas el tiempo necesario para que un fragmento de 400 pb llegue a la ventana detectora es de unos 25 min. Si se aumenta el voltaje el tiempo necesario es menor pero se pierde resolución.

- **Temperatura de electroforesis:** para secuenciación esta temperatura debe ser de 50° C y para fragmentos de 60° C.

- **Tiempo de electroforesis:** puede acortarse cuando sólo se necesite información de productos de amplificación de pequeño tamaño. Normalmente el tiempo de electroforesis programado es un 10% superior a la media del tiempo necesario para que el fragmento de mayor tamaño migre lo suficiente.

En la primera fila de la lista de inyección se inserta siempre una línea en la que se programa el **test de los cuatro colores** ("Test CCD 4-Color") cuya función es comprobar que la ventana del capilar está limpia y colocada correctamente. Este test obtiene una lectura con el capilar vacío, tiene una duración de 5 min. Y en el debemos comprobar que la línea basal de los cuatro colores (correspondiente a la emisión de los 4 fluorocromos) esté entre 800 y 2500 en escala vertical (Intensidad de fluorescencia).

4. **Selección de la matriz (Matrix File):** A pesar de que existe cierto solapamiento entre los diferentes rangos de emisiones de los 4 fluorocromos utilizados, este problema es minimizado gracias a la creación en el ordenador de una **matriz** matemática. Dicha matriz consta de cuatro filas y cuatro columnas y los números indican el grado de solapamiento entre las longitudes de onda emitidas por los cuatro fluorocromos. Los valores de la matriz varían según el analizador, el filtro virtual y las condiciones de electroforesis por lo que ésta debe ser creada para cada analizador y para unas determinadas condiciones electroforéticas.

5. Una vez completada la lista de inyección y tras comprobar que el equipo y las muestras están montadas correctamente, pulsamos el comando "run" para que se inicie el análisis.

Análisis de los resultados

A) Análisis de los resultados con el software GeneScan

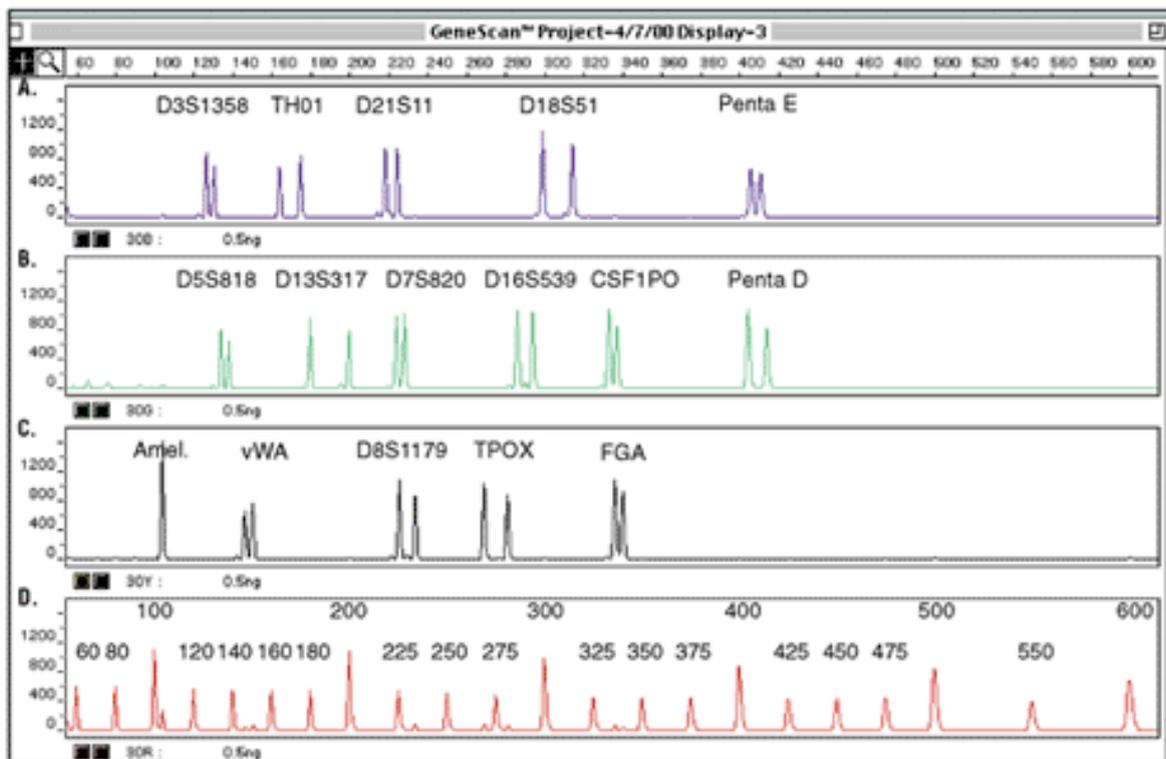
Una vez recogido el dato bruto o "raw data", el software **GeneScan** procesa la información para proporcionar una cuantificación en pares de bases de todos los picos. Como cada muestra lleva un estándar interno éste migra a la vez que el ADN amplificado y bajo las mismas condiciones, con lo que se evita el problema de las variaciones entre muestras.

El estándar de tamaño se define una vez que la electroforesis ha terminado y antes de que el programa GeneScan comience el análisis de las muestras. Para dicha definición existen dos posibilidades: definir un estándar nuevo o bien utilizar un estándar utilizado previamente en otros análisis. Una vez definido el estándar se comprueba que en todas las muestras coincidan los picos del mismo, lo cual se hace solapando todos los estándares. Si en alguna muestra los picos no coinciden se define uno nuevo.

Tras la definición del estándar es necesario definir los parámetros de análisis, que son los que el programa tiene asignados automáticamente para nuestro Kit y se procede al análisis de las muestras. El método por el que el programa determina los tamaños de los fragmentos se denomina Southern Local ("Local Southern Method").

Dicho método utiliza tres puntos de la curva generada con los puntos del estándar: los dos que están por debajo en tamaño del fragmento a determinar y uno por encima, con dichos valores realiza una interpolación y asigna el valor del tamaño.

Los datos analizados pueden ser visualizados de forma gráfica (electroferograma), de forma numérica o bien de ambas formas. Estos datos son posteriormente exportados al programa **Genotyper**.

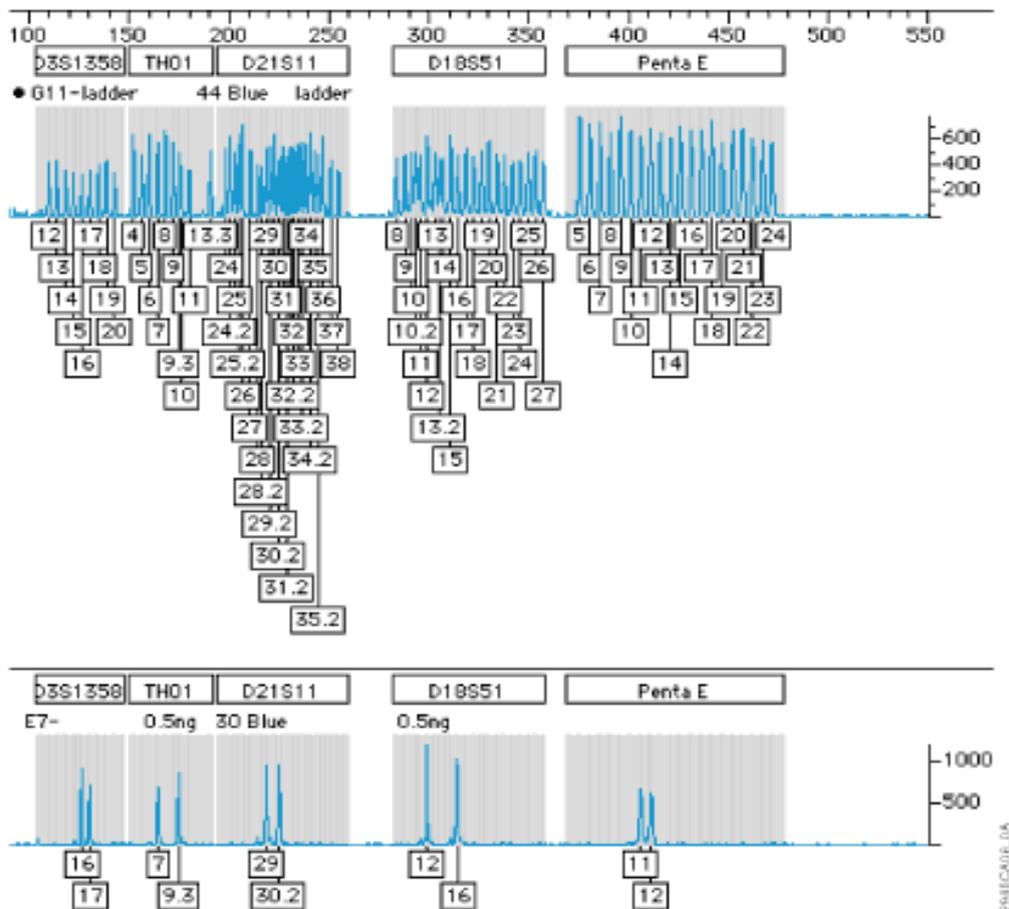


B) Asignación de alelos

El programa **Genotyper** es el encargado de asignar los alelos a los fragmentos analizados en GeneScan por comparación con los alelos del ladder. Cuando se importa un archivo desde GeneScan a Genotyper éste último genera una línea (dye/lane list) para cada fluorocromo en la que están incluidos el tamaño, la cantidad y la información de todos los fragmentos marcados con un mismo fluorocromo.

Según la aplicación, Genotyper contiene una serie de “macros” que son secuencias de comandos predefinidos necesarios para un determinado tipo de análisis. Para fragmentos amplificados con nuestro Kit el macro seleccionado es uno denominado “Power”.

Una vez ejecutado dicho macro aparecen las muestras con los correspondientes alelos asignados de manera automática. Aquellos alelos que se encuentran por encima o por debajo de los alelos del ladder en un rango de 0.5 pares de bases no son designados por el programa.



3.4.3- Interpretación de resultados: problemas y soluciones en ADN nuclear.

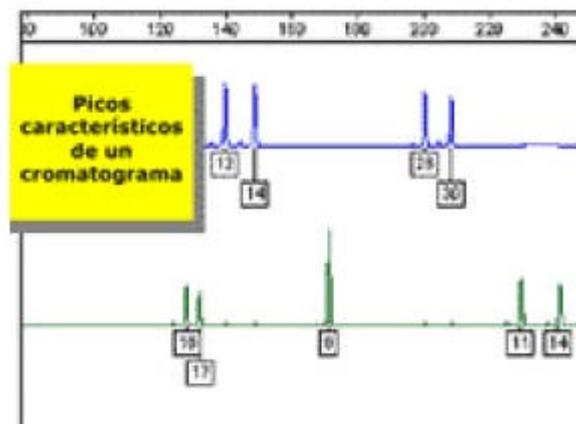
Parece que después de haber observado todos los procedimientos analíticos, con todas sus complejidades, esta última etapa podría pensarse que no plantea dificultad. Por un lado, hay software que realiza este proceso y aunque se hiciese manualmente bastaría con dar un número o una letra a un pico de un color determinado (en el caso de equipos automáticos). En realidad es así si todo ha transcurrido correctamente y partimos de una **buena cantidad y calidad de ADN** de una muestra de referencia (que incluso hemos tomado nosotros mismos) y todo el proceso ha ido bien.

No obstante, ¿qué ocurre si hay un problema?, ¿qué ocurre si tenemos una muestra y observamos mas de dos picos?, ¿qué ocurre si el equipo falla en su interpretación?.....

La interpretación de los resultados, aunque es muy parecida, dependerá de donde hemos obtenido tales resultados. No es lo mismo la forma de interpretar un resultado ADN nuclear visualizados en forma de picos o en forma de bandas. No obstante el resultado será el mismo (no así la sensibilidad, rapidez...)

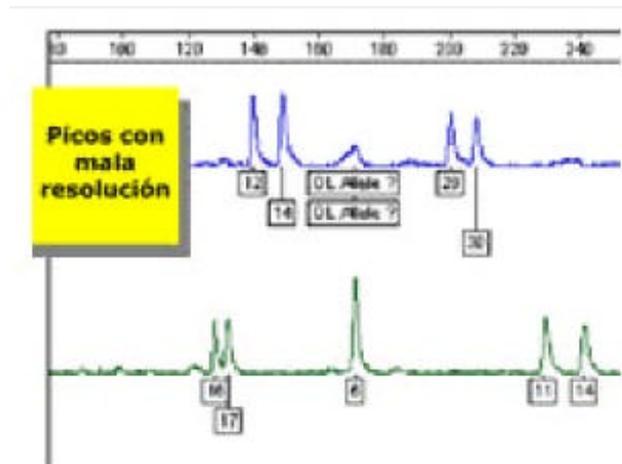
Podemos a continuación hacer mención de los principales problemas o dificultades con las que nos podemos encontrar al interpretar los datos procedentes de un análisis de ADN nuclear centrándonos principalmente en el estudio del cromatograma.

La forma con la que se visualizan los picos en un cromatograma debe ser como en la siguiente figura, en la que se observan dichos picos con esa forma característica y donde se puede apreciar que existe un equilibrio no sólo entre marcadores sino entre los alelos de un mismo marcador.



No obstante, en ocasiones la forma de estos picos se hace más abierta e incluso aparece un fenómeno típico de arrastre en los picos. Esto obedece a una mala resolución en la electroforesis motivada por un fallo en el capilar o en

el medio de separación.



El problema se soluciona en gran parte de las ocasiones cambiando el capilar.

Variantes alélicas.

Uno de los fenómenos más conocidos son las "**microvariantes**" o "**variantes alélicas**" que ocurren cuando se obtiene un alelo que no coincide exactamente con ningún alelo del ladder. Este fenómeno puede ser causado por inserciones, deleciones o cambios de los nucleótidos en las distintas unidades de repetición que conforman los STRs.

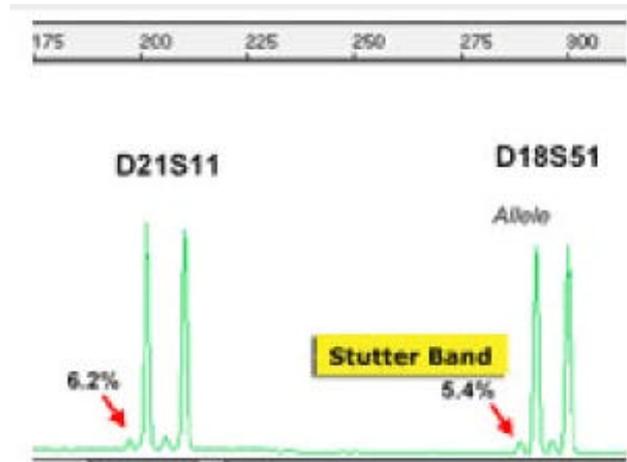
Debido a que es un fenómeno no muy frecuente (aunque dependiente de cada marcador) el hecho de que por ejemplo un supuesto padre posea un alelo de este tipo y coincida con uno que posea el hijo dará mucha fuerza a la hipótesis de la paternidad ya que la frecuencia de este alelo en la población suele ser muy baja.



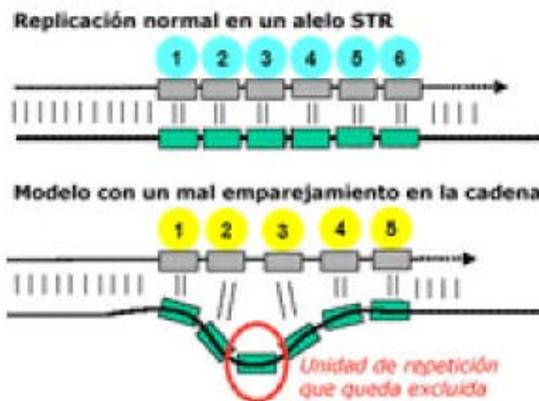
Stutter band.

Otro fenómeno, no menos conocido, es la formación de las "**stutter**

band", también conocidas como "**Productos Slippage de la Polimerasa**" que son artefactos de la PCR que en algunos casos pueden llegar a confundir la interpretación de los alelos reales. Aparecen como un pico menor justo antes del alelo real y corresponden a una repetición menos.

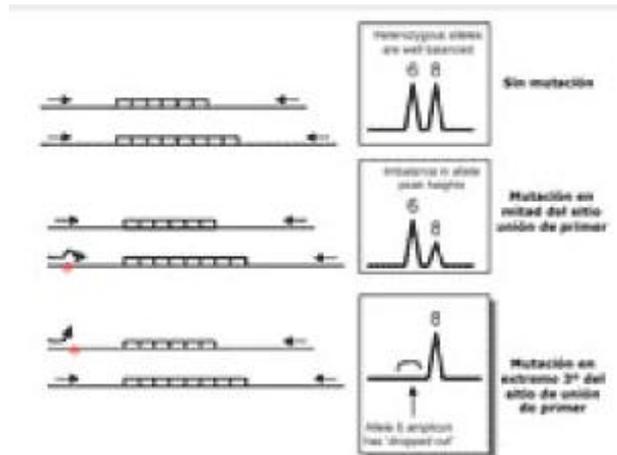


El proceso de formación de las "sttuter band" ocurre cuando una unidad de repetición queda mal emparejada y no interviene en la formación de la nueva cadena, generándose así picos minoritarios con esta pérdida.



Pérdidas alélicas.

En ocasiones lo que ocurre son fenómenos de "**pérdidas alélicas**" o "**dropout**" que ocurren principalmente cuando se producen cambios en los nucleótidos donde hibridan los primers. Es por tanto un problema porque puede llegar a aparecer como homocigótica una muestra que es en realidad heterocigótica.



Cuando el cambio se produce en una zona intermedia al sitio de unión del primer suele visualizarse por una menor intensidad en dicho alelo. Pero cuando tal cambio es en el final del extremo 3' del sitio de unión del primer no se produce amplificación de tal alelo y en consecuencia pasa desapercibido.

Este fenómeno también depende de cada marcador e incluso de determinados grupos poblacionales "propensos" a mutaciones en tales sitios. La solución pasa por **diseñar nuevos primers** que hibriden en zonas más alejadas de estas.

Mutaciones

Otro fenómeno muy destacable es la formación de **mutaciones**. En ocasiones sucede que, por ejemplo, en un caso de paternidad hay compatibilidad absoluta entre el supuesto padre y el hijo para toda la batería de marcadores estudiados salvo en un único marcador. En estos casos podemos considerar que se ha producido una mutación.

Estas mutaciones están, igual que se comentaba con anterioridad, íntimamente relacionadas con cada marcador, e incluso hay estudios realizados donde se dan estas tasas de mutación para cada uno de ellos (el VWA, FGA y D18S51 son los que poseen la tasa más alta). No obstante, ocurren con una frecuencia relativamente baja, pero se han de tener en cuenta para realizar los cálculos estadísticos.

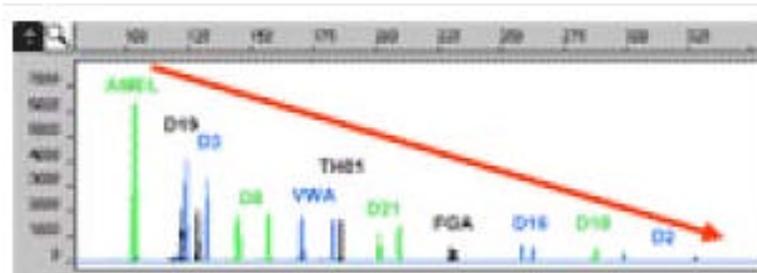
Amplificación diferencial.

En otras ocasiones lo que sucede es el fenómeno de la **amplificación diferencial**, proceso que ocurre fundamentalmente cuando la muestra está degradada o cuando incluso se añade demasiada concentración de ADN a la reacción de PCR. Este fenómeno se manifiesta en:

- Una mayor intensidad de los picos correspondientes a los marcadores menos pesados (los que aparecen antes en la electroforesis).

- Una menor intensidad en los marcadores más pesados ocurriendo de modo gradual, por lo que se obtiene un perfil de intensidad en línea descendente.

La explicación a este fenómeno es que los marcadores menos pesados son, en general, más fácilmente amplificables por la Taq polimerasa, y esto se agudiza cuando la muestra está muy degradada (puesto que los fragmentos más pesados y por tanto más largos están compuestos de más nucleótidos y por tanto es más factible que estén degradados que aquellos menos largos) y cuando se añade mucha cantidad de ADN.



3.4.4- Ventajas aportadas por los sistemas de Electroforesis Capilar frente a los sistemas de Electroforesis en geles de acrilamida

Aunque algunas de las ventajas ya han sido comentadas anteriormente, haremos un breve resumen para comprender por qué la electroforesis capilar está sustituyendo a la electroforesis convencional en geles de acrilamida:

1. Rapidez de la técnica: Por un lado la preparación del gel y la carga de las muestras en el mismo se hace de manera automatizada, lo cual ahorra tiempo; y por el otro lado, permite el análisis simultáneo de varios loci aunque éstos posean alelos con tamaños solapantes, actualmente hay kits preparados para electroforesis capilar que permiten el análisis simultáneo de 15 loci tipo STR en una sola reacción de PCR.
2. Sensibilidad: hace posible detectar cantidades muy pequeñas de ADN amplificado debido a la sensibilidad de la fluorocromos utilizados para el marcaje de los primers. De esta manera, resultados apenas visibles y por lo tanto, difícilmente interpretables por el ojo humano en geles de acrilamida, pueden llegar a ser visualizados e interpretados en equipos de electroforesis capilar.
3. La cuantificación del tamaño en pares de bases del fragmento amplificado se hace de una manera exacta ya que, en los sistemas de electroforesis capilar, en cada muestra se incorpora un estándar interno de movilidad que permite medir de manera automática el tamaño,

eliminado las diferencias de movilidad electroforética que pueden existir entre las diferentes calles de un gel de acrilamida.

4. Los resultados se obtienen de manera informatizada, lo cual evita errores de interpretación de los resultados y facilita el análisis y almacenaje de los mismos a través de programas informáticos.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

¡Error! Marcador no definido.

3.5.1- Cálculo de las frecuencias alélicas y genotípicas.

Puesto que todos los loci analizados en nuestro estudio poblacional son codominantes y distinguibles, la obtención de las frecuencias alélicas muestrales se realizó por el método clásico del recuento en base a los alelos observados (Li, 1976). Posteriormente, realizamos una agrupación de todos los genotipos observados, homo y heterocigóticos, así como el número esperado de estos genotipos calculado por medio de un estimador el cual, al ser el tamaño de muestra lo suficientemente grande (igual o mayor de 100), fue insesgado o centrado.

Además, el hecho de que nuestras estimas de frecuencias se basen en una muestra de la población, nos lleva a la asunción de un margen de error o un intervalo de confianza en el cual es probable que estén contenidos nuestros valores de frecuencias. El programa informático utilizado calculó los límites de confianza tanto superior como inferior con un valor de confianza del 95%.

Tests para demostrar el equilibrio de Hardy-Weinberg

Para comprobar si la muestra poblacional analizada se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg para los quince loci se aplicaron dos tipos de tests estadísticos:

- **Test de bondad de ajuste** (test de razón de verosimilitud o “likelihood test”, y test de homocigosidad).
- **Tests exactos** (Test exacto de Guo-Thompson).

Tests de bondad de ajuste

En general los tests de bondad de ajuste se emplean para comparar dos hipótesis mutuamente excluyentes, en el caso de los estudios poblacionales nos permiten comprobar si las frecuencias genotípicas observadas en la muestra se desvían de las esperadas bajo la hipótesis de equilibrio Hardy-Weinberg. Como lo que se compara es un número n de categorías o clases genotípicas, el estadístico (χ^2) que mide dichas discrepancias vendría dado por la expresión:

$$c^2_{ob} = \sum (O_i - E_i)^2/E_i$$

Siendo O_i los valores observados y E_i los esperados.

La hipótesis inicial planteada acerca de si las cantidades observadas se desvían de las esperadas bajo la hipótesis de equilibrio será cierta si el valor de χ^2_{ob} es lo suficientemente alto. El problema que plantea este tipo de tests es que la muestra debe tener un valor de n grande y los valores esperados no pueden ser inferiores a 1. En el caso de los STRs el alto grado de polimorfismo hace que algunas de las clases genotípicas tengan valores muy pequeños y por lo tanto estos tests no llegan a ser efectivos. El problema de utilizar una distribución continua como es la χ^2 para comprobar una hipótesis con datos discretos se puede reducir usando un término de corrección que normalmente tiene un valor de 0.5 o 0.25 (Emigh, 1980).

Al aplicar este tipo de tests se pueden cometer dos tipos errores:

- **Error de tipo I**, también llamado **nivel de significación** o **error a**, que es el error que cometemos cuando rechazamos la hipótesis nula siendo ésta verdadera.
- **Error de tipo II** o **b** que es el error cometido al aceptar dicha hipótesis cuando ésta es falsa. El valor $1-\beta$ es lo que se denomina poder o potencia de la prueba. Un test es tanto mejor cuanto más potente sea.

El **error a** es un valor controlable y fijado de antemano, cuanto más pequeño sea dicho valor mas garantías se tendrán de aceptar la hipótesis alternativa siendo ésta cierta.

El **valor P** es el mínimo error α al cual un resultado es significativo. Cuando P es menor o igual que el valor del error α se decide la hipótesis alternativa y se rechaza la nula, en cambio, si es mayor que α se acepta la hipótesis nula (Martín Andrés A, 1988).

- **Test de Homocigosidad**

Compara los resultados obtenidos agrupándolos en dos clases: homocigotos y heterocigotos, entonces realiza una χ^2 con un grado de libertad con los homocigotos y heterocigotos esperados y observados.

$$C^2 = [(\text{Hom}_{obs} - \text{Hom}_{esp})^2 / \text{Hom}_{esp}] + [(\text{Het}_{obs} - \text{Het}_{esp})^2 / \text{Het}_{esp}]$$

- **Test de razón de verosimilitudes**

Fue aplicado a la situación que nos ocupa en 1969 por Sokal y Rohlf y compara las frecuencias genóticas observadas y esperadas sin agruparlas. Calcula un valor G siguiendo el algoritmo:

$$G = -2 \sum_{i=1}^a f_i \times \ln (f_i/f'_i)$$

Siendo f_i la frecuencia observada para el genotipo i y f'_i la frecuencia esperada para el genotipo i .

Este test es aplicable en casos en los que existen frecuencias genóticas muy bajas pero, por este mismo motivo, plantea el problema de que su nivel de significación no puede ser evaluado directamente por ninguna distribución estándar. Por ello, se ha empleado un procedimiento empírico que realiza permutaciones de los alelos observados y genera una tabla de frecuencias genóticas hipotéticas por unión aleatoria de dichos alelos. Siguiendo a Chakraborty y col. (1991) se generaron 1000 muestras aleatorias, manteniendo las frecuencias alélicas, y para cada combinación se estimó el valor de G. El valor P obtenido se refiere al número de combinaciones en las que el valor G obtenido en la simulación es superior al observado.

Test Exacto de Guo-Thompson

El test exacto de Guo-Thompson (1992) es utilizado normalmente cuando la muestra poblacional es pequeña o bien cuando existen múltiples alelos y las frecuencias son bajas e incluso no llegan a observarse algunos genotipos en la muestra. Matemáticamente estos test son bastante complejos, no obstante hoy en día este problema queda solucionado mediante la creación de programas informáticos.

Existen dos métodos para calcular los niveles de significación del test exacto:

- El Método de Monte Carlo (Binder y Heermann, 1989).
- El Método adaptado del algoritmo Metropolis (Metropolis et al, 1953).

El **método de Monte Carlo** realiza un número N de simulaciones (en nuestro caso 2000) con el mismo número de individuos y la misma proporción de alelos que la muestra original. A cada una de estas simulaciones se le calcula su probabilidad exacta (p) para compararla con la de la muestra original. Si el valor de tal probabilidad es menor o igual al valor de nuestra muestra, se aumenta en un valor de 1 un contador denominado K. Así, el valor total de probabilidad que se calcula viene dado por K / N.

Valores muy bajos de este cociente indicarán que nuestra población se encuentra entre las distribuciones más raras y por lo tanto podremos rechazar la hipótesis de equilibrio con un determinado margen de error.

El **método de Metrópolis** se basa en la construcción de las cadenas de Markov con una distribución aleatoria de las probabilidades de los genotipos, cuyas muestras poseen las mismas frecuencias alélicas que la muestra poblacional en estudio.

El test utilizado por nosotros ha sido el Monte Carlo que, por regla general, parece ser el más adecuado para estudios con tamaños de muestra pequeños y un gran número de alelos.

Según Chakraborty y Zhong (Chakraborty, R. et al, 1994) cuanto más apartada del equilibrio esté la población, más fácil será detectar el desequilibrio. Al aumentar el tamaño de la muestra también se facilita la dicha detección. La gran diferencia de los tests exactos con respecto a los de bondad de ajuste es que en los primeros el nivel de detección de las desviaciones aumenta con el número de alelos, por lo que puede decirse que el test exacto es el método más poderoso de detección de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg para marcadores genéticos muy polimórficos como es el caso de los STR.

3.5.2- Test utilizados para demostrar la independencia de los alelos

Para demostrar tanto el equilibrio de ligamiento (o independencia intralocus) como el equilibrio de la fase gamética (independencia interlocus) se emplearon los tests de homocigosidad y de correlación interclase de Karlin respectivamente.

Para el test de homocigosidad el estadístico sigue una distribución χ^2 con un grado de libertad cuando la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg es cierta.

El **test de KARLIN** realiza una comparación dos a dos de todos los loci estudiados, determinando la correlación existente entre ambos (**rho**) y sobre ese valor determina una cantidad experimental. Para obtener la probabilidad (valor P) realiza una serie de permutaciones (1000 en nuestro caso) sobre los datos poblacionales obtenidos para ver como de extraño es la correlación obtenida, lo cual nos indica que los valores de P altos nos dirán que el resultado obtenido es un valor frecuente en nuestros datos y por lo tanto que no se ha obtenido por azar. El test aplicado es de dos colas, ya que nos indica la correlación tanto en sentido positivo como negativo, es decir, si la presencia de un determinado alelo lleva aparejada la de otro, o si por el contrario el que aparezca ese alelo implica que el otro no lo hará.

El planteamiento general del test será:

H₀: $\rho = 0$

H₁: valores altos o bajos de X suelen ir acompañados de valores altos o bajos de Y.

El hecho de que se obtenga un valor de rho diferente de cero no quiere decir que exista una correlación, ya que podría ser que ese valor se debiera al azar o como consecuencia de la muestra tomada y que realmente no exista una correlación en la población, de ahí la necesidad de hacer el test y ver si el resultado es o no significativo.

3.5.3- Parámetros estadísticos de interés forense.

Los cálculos estadísticos del laboratorio de Genética Forense suelen obedecer a las siguientes situaciones:

1. Identificación. Cuando tienen como finalidad determinar o descartar la identidad de un individuo vivo, de un cadáver reciente o de unos restos cadavéricos.
2. Criminalística. Cuando lo que hay que determinar o descartar es la participación de uno o más individuos en cualquier tipo de delito en el que las muestras biológicas puedan ser informativas: lesiones, homicidios, agresiones sexuales, etc.
3. Paternidad y/o maternidad. Si lo que hay que calcular es la probabilidad de que un individuo proceda biológicamente de otro (maternidad o paternidad) u otros (maternidad y paternidad al mismo tiempo).

Los parámetros estadísticos necesarios, que son diferentes para cada situación, se clasifican en parámetros “*a priori*” o “*a posteriori*”.

Los parámetros “*a priori*” se utilizan para saber de qué potencial respecto de la identificación se dispone. Los parámetros “*a posteriori*” serán obtenidos directamente de los valores obtenidos en cada caso individual.

Identificación y criminalística

Parámetros a priori

Poder de discriminación (PD)

Es la capacidad que un laboratorio tiene en un momento determinado para, analizando un vestigio, diferenciarlo de otro tomado al azar. El poder de discriminación (PD) depende del número de loci analizados y del polimorfismo de cada uno. También se puede decir que es la probabilidad de que dos muestras o individuos, seleccionados al azar de una población, puedan distinguirse por uno o más atributos, los cuales son estadísticamente independientes, y este valor se obtiene con la aplicación de la siguiente fórmula:

$$PD = 1 - \sum x_i^2$$

Donde x_i = frecuencia de cada uno de los genotipos encontrados:

La probabilidad de discriminación es una medida relativa de la eficacia del sistema o sistemas analizados. El que dos individuos, elegidos al azar en una población dada, presenten o no el mismo patrón genético dependerán de la frecuencia del haplotipo o marcador genético en esa población. Una probabilidad de discriminación cercana a uno sería, una situación deseable para establecer una identificación.

Probabilidad de coincidencia (PM)

Se define como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la misma población coincidan en su genotipo para ese locus. Esta probabilidad fue descrita por Jones (1972) y se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\sum x_i^2$$

Siendo x_i = la frecuencia esperada de cada genotipo

Como vemos, el poder de discriminación y la probabilidad de coincidencia son conceptos opuestos (**PD=1-PM**)

Parámetros a posteriori

Razón de verosimilitud

Es el valor de la probabilidad de que un material genético proceda de un individuo determinado en comparación al resto de una población concreta.

Razón de verosimilitud o probabilidad (RV) o likelihood ratio (LR) que será:

$$LR = \frac{\text{Probabilidad de tal resultado siendo el sospechoso culpable}}{\text{Probabilidad de tal resultado siendo el sospechoso inocente}}$$

Paternidad

Parámetros a priori

Probabilidad de exclusión (PE)

Es la probabilidad que tiene un laboratorio, en función de su metodología y del número de marcadores que investigue, de excluir a un “falso padre”. Esta probabilidad mejora cuando aumentan los marcadores estudiados, por lo que va paralela a la calidad científica del laboratorio. La probabilidad de exclusión deseable es la máxima posible. Hay normas internacionalmente aceptadas en cuanto al valor que debe poseer esta probabilidad, así el Grupo Español y Portugués de la Sociedad Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG) considera que para que un Laboratorio se considere competente en la realización de estas pruebas, debe estar por encima del 99.9% (con este valor, solo quedarían sin excluir uno de cada mil “falsos padres”) ya que el 100 % es utópico.

Otro modo de definir este término sería el siguiente: el porcentaje de presuntos padres falsamente imputados cuya paternidad quedaría excluida en base a un determinado marcador. El cálculo de la probabilidad de exclusión a priori de la paternidad para un sistema de dos alelos codominantes viene dado por la siguiente fórmula:

$$Pe = P_1 \times P_2 (1 - P_1 \times P_2)$$

Donde P_1 es la probabilidad de que un individuo sea transmisor del alelo 1 y P_2 es la probabilidad de que un individuo sea transmisor del alelo 2.

A medida que aumentamos el número de alelos de un determinado marcador el cálculo se irá haciendo cada vez más complejo.

La probabilidad de exclusión a priori es un valor porcentual que es función directa del polimorfismo de un sistema. Es decir, cuanto más polimórfico es un sistema y cuanto más equilibradas estén las frecuencias de sus alelos, tanto mayor será su probabilidad a priori de exclusión y, por lo tanto, su eficacia en la investigación de la paternidad.

Es posible calcular la probabilidad de exclusión a priori de un conjunto de sistemas, lo que se conoce como probabilidad de exclusión a priori acumulativa, que viene dada por la fórmula:

$$P_{\text{ex acumulativa}} = 1 - (1 - P_{e1})(1 - P_{e2}) \dots (1 - P_{en})$$

Siendo $P_{e1} \dots P_{en}$ las probabilidades de exclusión individuales de cada uno de los sistemas.

La probabilidad de exclusión acumulativa es un valor que se suele utilizar para determinar la eficacia que a priori posee un laboratorio, pero no tiene, obviamente, nada que ver con la probabilidad de paternidad en un caso concreto.

Parámetros a posteriori

Índice de paternidad

Se calcula dividiendo la probabilidad de transmisión del alelo paterno por parte del padre que será de 0.5 o 1 (dependiendo si es homocigoto o heterocigoto) entre la frecuencia génica de dicho alelo. Para varios loci, se utilizan los productos respectivos de todas las frecuencias. El resultado indicará cuantas veces es más probable que el supuesto padre sea el padre biológico con respecto a un individuo tomado al azar de entre los de su misma población.

La fórmula es la siguiente:

$$IP = X / Y$$

Probabilidad de paternidad

Se calcula mediante la fórmula descrita por Erik Essen-Möller en 1938, derivada del teorema de Bayes, y se utiliza para calcular la probabilidad condicionada.

$$W = X / X + Y$$

Donde X es la probabilidad del supuesto padre en relación al perfil paterno, e Y, la frecuencia génica de dicho perfil en la población.

Es el valor más usado en materia de paternidad porque da un valor de probabilidad muy fiable. El cálculo en realidad es la probabilidad de que un hijo sea de un individuo determinado, partiendo de una probabilidad a priori igual para todos los varones de la población. Se trata, por tanto, de un valor mínimo basado en parámetros muy objetivos.

Hummel describió los predicados verbales para armonizar los peritajes, dando un predicado a cada valor numérico de probabilidad (como ya se vio en el tema sobre paternidad biológica)

Supuestos posibles en paternidad

Refiriéndonos concretamente a un caso típico de estudio de paternidad (madre, hijo y supuesto padre), cuando se analizan en el laboratorio los distintos marcadores que componen la prueba de paternidad, puede ocurrir que se encuentre una exclusión en uno o varios marcadores o que no aparezca ninguna exclusión.

CUANDO EXISTEN EXCLUSIONES

Se pueden considerar dos tipos de exclusiones:

- **De primer orden**
- **De segundo orden**

Las de primer orden se producen cuando el hijo posee algún alelo nuevo no presente en ninguno de los padres. Igualmente sería cuando el padre es heterocigoto y el hijo no posee ninguno de sus alelos.

Las de segundo orden son las que se producen por la existencia de **alelos silentes**. Estos alelos existen pero que no se manifiestan por distintos motivos, uno de ellos por que se produzca el fenómeno de pérdida alélica por mutación en el sitio de unión del primer o porque existan alelos raros no detectados, siendo el caso mas sencillo cuando el padre y el hijo son homocigotos para alelos distintos.

Por consiguiente, las exclusiones de segundo orden son menos seguras que las de primer orden.

Cuando nos encontramos **una única exclusión de primer orden o dos exclusiones de segundo orden** en los marcadores que habitualmente estudiamos la recomendación que se seguía era la siguiente:

a.- Aumentar el número de marcadores a estudiar para confirmar o no la presencia de más exclusiones

b.- En caso de que no se encontrase ninguna exclusión mas, se descartaba el/los marcador/es donde se había encontrado la exclusión y no se tenía en cuenta para los cálculos estadísticos.

Hoy en día, se recomienda igualmente aumentar el número de marcadores y en caso de que no se encuentren mas exclusiones considerar que se ha producido una mutación en ese/esos marcador/es. De este modo, el marcador será integrado en el cálculo de probabilidad teniendo en cuenta lo siguiente:

Será necesario el cálculo de un índice de paternidad considerando estas mutaciones. El alelo que supuestamente el padre debía transmitir al hijo una vez que hemos interpretado que es una mutación puede estar relacionado con el que posee el hijo del siguiente modo; si hay un salto en número por arriba o por debajo del alelo en cuestión, si hay dos saltos por arriba o por debajo.

Finalmente, podremos asumir que un individuo se excluye como padre biológico de una determinada persona cuando se encuentran más de dos exclusiones

CUANDO NO EXISTEN EXCLUSIONES (INCLUSION)

Las bases del cálculo de paternidad, en los casos de inclusión, se basan en el Teorema de Bayes, que define el cálculo de las probabilidades condicionadas.

El resultado final es la fórmula ya conocida:

$$W = \frac{X}{X + Y}$$

Pero, ¿cómo se desarrolla el cálculo para llegar aquí?

Se pueden establecer en principio dos hipótesis H(1) mediante la cual el presunto padre es el padre biológico del hijo y H(2) según la que el presunto padre no puede ser el padre biológico del niño.

Ambas hipótesis son incompatibles y les podemos otorgar unas probabilidades a priori idénticas. La suma de ambas probabilidades es 1 (100%) pues, lógicamente, alguna tiene que suceder.

La fórmula empleada quedaría como sigue:

$$P(SI/H) = \frac{P(SI) \times P(H/SI)}{P(SI) \times P(H/SI) + P(NO) \times P(H/NO)}$$

P(SI): Probabilidad de paternidad a priori: Probabilidad que se le otorga a un supuesto padre de ser el padre. Hoy en día se da $P(SI) = P(NO) = \frac{1}{2}$ (se otorga igual probabilidad de ser el padre que no serlo)

$P(H/SI) = X$ = Probabilidad de que el hijo tenga un determinado genotipo **SIENDO** el supuesto padre el padre biológico

$P(H/NO) = Y$ = Probabilidad de que el hijo tenga un determinado genotipo **NO SIENDO** el supuesto padre el padre biológico

$P(SI/H) = W$ = Probabilidad de paternidad a posteriori: Probabilidad de que un supuesto padre sea realmente el padre cuando el hijo presenta un determinado genotipo.

Habida cuenta que en el caso de dar una probabilidad de paternidad a priori $P(SI) = P(NO) = 0.5$, la fórmula quedaría reducida a lo siguiente:

$$P(SI/H) = \frac{P(H/SI)}{P(H/SI) + P(H/NO)}$$

Como hemos visto X , será la información genética relativa a la hipótesis de paternidad e Y la evidencia genética relativa a la hipótesis de no paternidad. Esta fórmula fue por primera vez calculada y aplicada a cuestiones de paternidad en 1938 por Erik Essen-Moller.

Igualmente se ha mencionado que esta fórmula contiene un parámetro para poder ser simplificada a partir del teorema de Bayes, que es la consideración de una probabilidad a priori de paternidad de 0,5. Es decir, se otorgan tantas probabilidades a priori al presunto padre de serlo como de no serlo.

Habida cuenta de que en la mayoría de los laboratorios el número de exclusiones es muy inferior al de paternidades prácticamente probadas (en España alrededor del 18% de las paternidades analizadas son exclusiones) en la década de los setenta se empleo la llamada probabilidad real a priori, que fue calculada en casi todos los países y que variaba entre 0,55 y 0,85, lo que se traducía en una probabilidad de paternidad para los casos positivos bastante mayor que el empleo de un a priori 0,5. Hoy se sigue considerando una probabilidad a priori de 0,5.

Además del valor W , se usan a menudo otros parámetros como el índice de paternidad que es el cociente X/Y (**IP=X/Y**) muy usado en muchos países pues es de una fácil comprensión práctica. En todo caso estos parámetros son totalmente superponibles al valor W ya que:

IP

$$W = \frac{\text{-----}}{IP + 1}$$

Hemos visto como se desarrollan las fórmulas empleadas y volviendo a la simplificación expuesta en el tema de paternidad biológica, podremos decir que para sistemas codominantes la aplicación del teorema de Bayes es sencilla, ya que es fácil de deducir que el valor de X será de 1 para los homocigotos y de 0,5 para los heterocigotos e Y la frecuencia génica del alelo que el padre transmite al niño. **Se exceptúan las combinaciones en las que madre y niño, ambos heterocigotos, tienen el mismo genotipo.** En ese caso, cuando el presunto padre posee algún alelo no presente en madre y niño, la probabilidad de paternidad (W) vendrá dada por la expresión:

$$W = \frac{1/2}{(1/2) + (a + b)}$$

Siendo a y b las frecuencias génicas de los alelos presentes en madre y niño, teniendo en cuenta que:

$$W = \frac{X}{X + Y}; \quad X = \frac{1}{2} \text{ o } 0,5 \quad \text{e} \quad Y = a + b$$

Si los alelos que el padre posee están presentes en la madre y en el niño, la probabilidad de paternidad (W) vendrá dada por la fórmula:

$$W = \frac{1}{1 + (a + b)}$$

Siendo a y b las frecuencias génicas de los alelos presentes en madre y niño.

Una vez se conocen los valores W o los valores X e Y para cada marcador, el cálculo de la probabilidad de paternidad global o acumulada es muy sencillo pues el valor X global es el producto de todos los valores X parciales y el valor Y global el producto de todos los Y parciales.

La probabilidad de paternidad que finalmente se obtiene es un valor entre 0 y 1, o expresado porcentualmente entre 0 y 100%, si bien probabilísticamente los valores absolutos son inalcanzables y siempre serán tendencias al 100% en caso positivo. El valor final se suele expresar, para que sea fácilmente inteligible y el juez pueda tomar mejor una decisión, en forma de los llamados predicados verbales de Hummel.

En la actualidad se suelen utilizar programas informáticos que cubren no sólo los casos normales sino aquellos especiales en los que no se dispone de los datos de la madre, o cuando la paternidad se calcula a partir de datos de familiares (padre fallecido y datos de sus padres o hermanos por ejemplo), o cuando hay relaciones de parentesco entre diversos presuntos padres o entre el padre y la madre.

Los cálculos de paternidad pueden extenderse al supuesto en que falte alguno de los progenitores, o bien uno de ellos esté representado únicamente por los abuelos (prueba de paternidad indirecta).

Pueden darse multitud de otras variantes, además se pueden llegar a realizar igualmente cálculos de hermandad e incluso establecer otras relaciones más complejas como por ejemplo la determinación del **índice avuncular** que analiza vínculos tíos-sobrinos. No obstante, hay que tener en cuenta que los datos que puedan derivarse de tales resultados son orientativos, en estos supuestos, ya que los valores resultantes por una cuestión de azar en la combinación de alelos podrían no reflejar en datos estadísticos la posible realidad de tal vínculo, por lo que habrá que tomar estos datos siempre con relatividad y a ser posible complementarlos con otro tipo de análisis (ADNmt y ADN de cromosoma Y)

En todos los casos se usará una lógica bayesiana, donde se establecerán dos hipótesis alternativas:

H1: los individuos analizados están efectivamente relacionados (padre-hijo, hermanos, etc.).

H2: los individuos analizados no están relacionados entre sí (no hay parentesco).

Si se denomina $P(H1)$ y $P(H2)$ a las probabilidades de que sean ciertas las hipótesis H1 y H2 respectivamente, se podrá estimar la razón de verosimilitud (RV):

$$RV = P(H1) / P(H2)$$

Si el caso es de paternidad simple (madre, hijo y presunto padre), esta razón es equivalente al índice de paternidad (IP), siendo $P(H1)$ el valor de X (probabilidad de que el presunto padre transmita el alelo obligado dado H1, es decir, es el padre) y

$P(H_2)$ el valor de Y (probabilidad de que el alelo obligado provenga de cualquier otro individuo).

Por tanto, para cada caso se tendrá que calcular la probabilidad de obtener un cierto resultado (genotipos de padre, hijo, hermano, etc.) según una y otra hipótesis.

Valoración de la prueba del ADN

Los tipos de pruebas más comunes en los laboratorios de Genética Forense son: la Investigación Biológica de la Paternidad y la Criminalística Biológica, es decir, el análisis de vestigios biológicos de interés criminal, como manchas de sangre, de esperma, saliva o pelos.

VALORACIÓN DE LA PRUEBA DE PATERNIDAD

La valoración de esta prueba es uno de los aspectos más importantes y consiste en el procesamiento e interpretación de todos los resultados obtenidos con el objeto de que sean fácilmente comprensibles.

Como hemos visto caben dos alternativas; una de compatibilidad y otra de no compatibilidad entre los resultados del hijo y del supuesto padre. Por tanto, cabría preguntarnos lo siguiente:

¿Cuál es la garantía de que un individuo (supuesto padre) no excluido sea realmente el padre biológico? Y por otra parte, en caso de exclusión ¿Qué garantía tendremos de que esta no es debida a algún error?

Para responder a la primera pregunta debemos tener en cuenta dos parámetros:

- Probabilidad de exclusión a priori
- Probabilidad de paternidad

El primer parámetro nos garantizará la exclusión de un número determinado de falsos padres (cuanto mayor sea, mayor número de falsos padres tendremos capacidad de excluir) y por tanto si no excluimos a un supuesto padre, la probabilidad de que no sea el padre será muy pequeña

En cuanto al segundo parámetro, este se calculará cuando no excluyamos al supuesto padre. Su valor, como ya hemos visto, nos indica la probabilidad de que el hecho de la paternidad haya sucedido realmente. Es por tanto importante llegar siempre a un grado de certeza lo más alto posible (>99.9%). De este modo, la

probabilidad de que fuese un falso padre que no hubiese sido posible excluir será muy pequeña.

Para responder a la segunda pregunta, tenemos que tener en cuenta que en todo acto humano hay posibilidad de error, lo que debemos realizar es minimizar el mismo y tener posibilidad de detectarlo. Aun así, es importante tener en cuenta que si se produce un error casi siempre se dará en el sentido de la exclusión y no al contrario.

Por otra parte si se dá alguna exclusión aislada tendremos que tener en cuenta lo descrito anteriormente en cuanto a las mutaciones y demás problemas.

VALORACION DE LA PRUEBA EN CRIMINALÍSTICA

La eficacia de los laboratorios de Genética Forense se mide por su eficacia a priori (el número y tipo de los polimorfismos que utiliza), por la calidad de su personal y por la superación de controles internos y externos de forma regular.

Igualmente que en el caso anterior podemos obtener dos posibilidades al comparar los resultados obtenidos por ejemplo en un sospechoso y en una muestra de sangre obtenida en un determinado lugar, es decir:

- Presenten distinto perfil genético
- Presenten igual perfil genético

En el primer caso la conclusión será decir que la muestra no procede del sospechoso.

Pero puede ocurrir que coincidan, entonces hay que valorar la probabilidad de que esa muestra provenga de ese individuo, lo que dependerá de la frecuencia de esos alelos en la población. No obstante, siempre hay un grado de incertidumbre valorable sobre la procedencia de una determinado muestra, que será tanto menor cuanto:

- Mayor sea en número de marcadores estudiados
- Mas raro sea el perfil genético

Por consiguiente nunca es posible hablar de seguridad absoluta.

¿Cuál sería el planteamiento estadísticamente correcto?

Pues aquel que se basa en el teorema de Bayes, que como hemos visto es el teorema base de los cálculos de la probabilidad de paternidad.

Existirán dos hipótesis posibles y mutuamente excluyentes:

- El sospechoso ha dejado esa mancha de sangre
- El sospechoso no ha dejado esa mancha de sangre (y por tanto ha sido otra persona)

El juez para valorar la prueba tendrá que valorar los indicios previos (que no sean de ADN) y añadirlos a un parámetro conocido como **razón de verosimilitud o probabilidad (RV) o likelihood ratio (LR)** que será:

$$\text{LR} = \frac{\text{Probabilidad de tal resultado siendo el sospechoso culpable}}{\text{Probabilidad de tal resultado siendo el sospechoso inocente}}$$

Este parámetro toma una posición intermedia entre el argumento del fiscal y del defensor. Y por tanto asumir que la probabilidad de que esa mancha provenga de ese sospechoso si es culpable es de 1 (100 %), porque es el ADN que encontraríamos si el sospechoso hubiese dejado la mancha. Por el contrario y bajo la hipótesis contraria, (de inocencia), quiere decir que es otra persona la que dejó tal mancha de sangre. En tal caso, esto será la probabilidad de que otro individuo al azar de la población posea tal resultado de ADN (1%).

La razón de verosimilitud tendrá un valor de 100 (1/0,01). Lo cual indica es 100 veces más probable que la mancha proceda del sospechoso que de una persona escogida al azar en la población.

Llegados a este punto hay que tener en cuenta la población de referencia que utilizamos en los cálculos que normalmente, es la población del entorno del caso. No obstante, y a pesar de que no existan diferencias importantes si se utilizan otras poblaciones (si en el caso de poblaciones autóctonas particulares) debería ser el juez el que fije la población de referencia, pues es el que conoce el caso.

Mucho más cruciales son los casos en los que, por ejemplo, hay vínculos familiares entre sospechosos o entre un sospechoso y una víctima ya que será más probable que compartan alelos entre ellos.

Pero, ¿cuando se puede considerar un valor de LR lo suficientemente elevado como para tener una evidencia clara de relación entre por ejemplo un sospechoso y una muestra de sangre?

Es difícil precisar pero se suele considerar aquel que está por encima de 1.000

Heterocigosidad y diversidad génica

Es un parámetro indicativo del polimorfismo y eficacia de un marcador genético. En una población que se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg es posible estimar la heterocigosidad media examinando la proporción de heterocigotos. La heterocigosidad de un sistema puede calcularse siguiendo la siguiente ecuación:

$$h_1 = \sum_{u \neq v} n_{uv} / N$$

Donde n_{uv} es el número de individuos heterocigotos para un locus determinado.

La varianza muestral de este estimador viene dado por la fórmula:

$$\text{Var}(h_1) = h_1 (1-h_1) / N$$

Hay casos en los que el uso de este parámetro no es adecuado:

- cuando el tamaño de la muestra es pequeño ya que en este caso las frecuencias de los genotipos pueden desviarse del equilibrio de Hardy-Weinberg por un error de muestreo
- si actuara una fuerte selección en un estadio de desarrollo antes de la observación ya que la proporción de heterocigotos quedaría desproporcionada
- cuando existe endogamia.

En estos tres casos es más correcto medir la variabilidad de la población mediante el parámetro denominado diversidad genética. El valor de este parámetro no depende del polimorfismo del sistema sino de las frecuencias génicas y del tamaño de la muestra. En poblaciones apareadas al azar los valores de heterocigosidad y diversidad genética tienen valores similares.

4. RESULTADOS

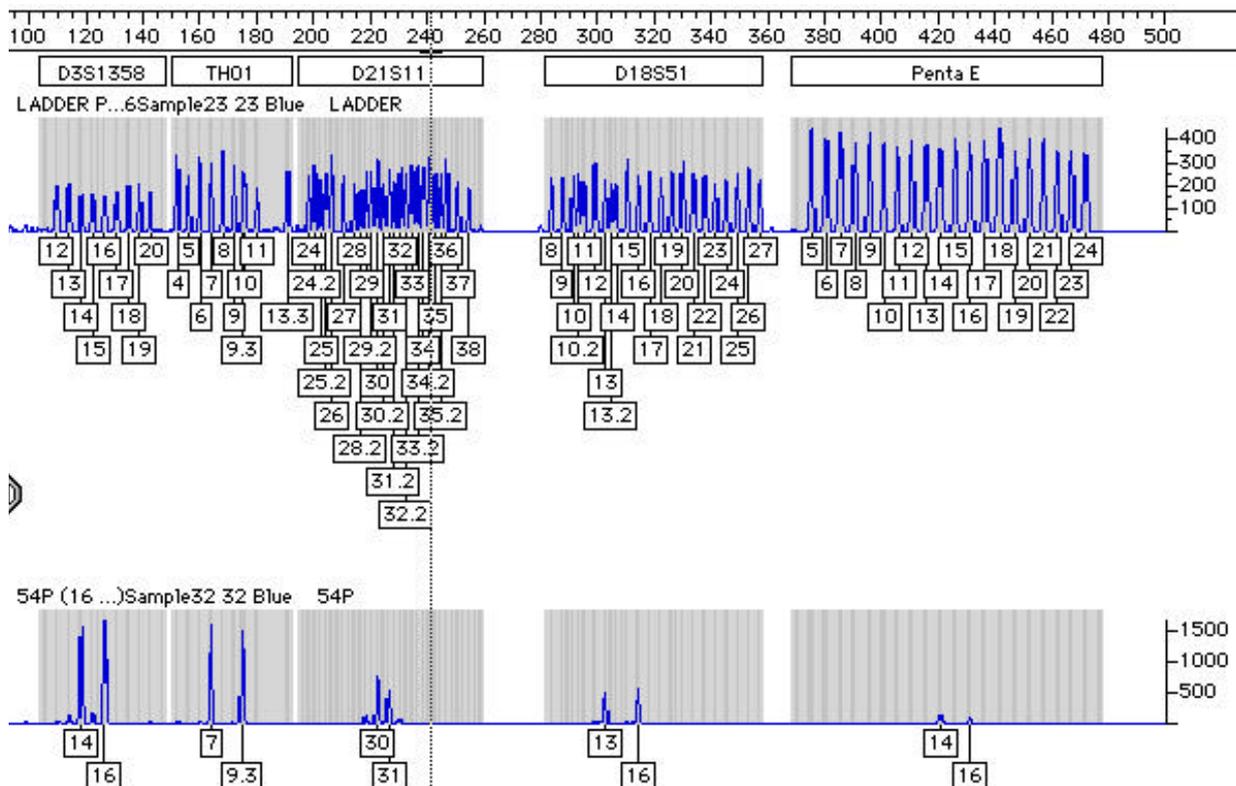
4.1- RESULTADOS DEL ESTUDIO POBLACIONAL

Los resultados obtenidos en el presente estudio se exponen en diversas tablas y figuras, clasificadas según el locus analizado, los datos del estudio estadístico y el valor para su aplicación práctica.

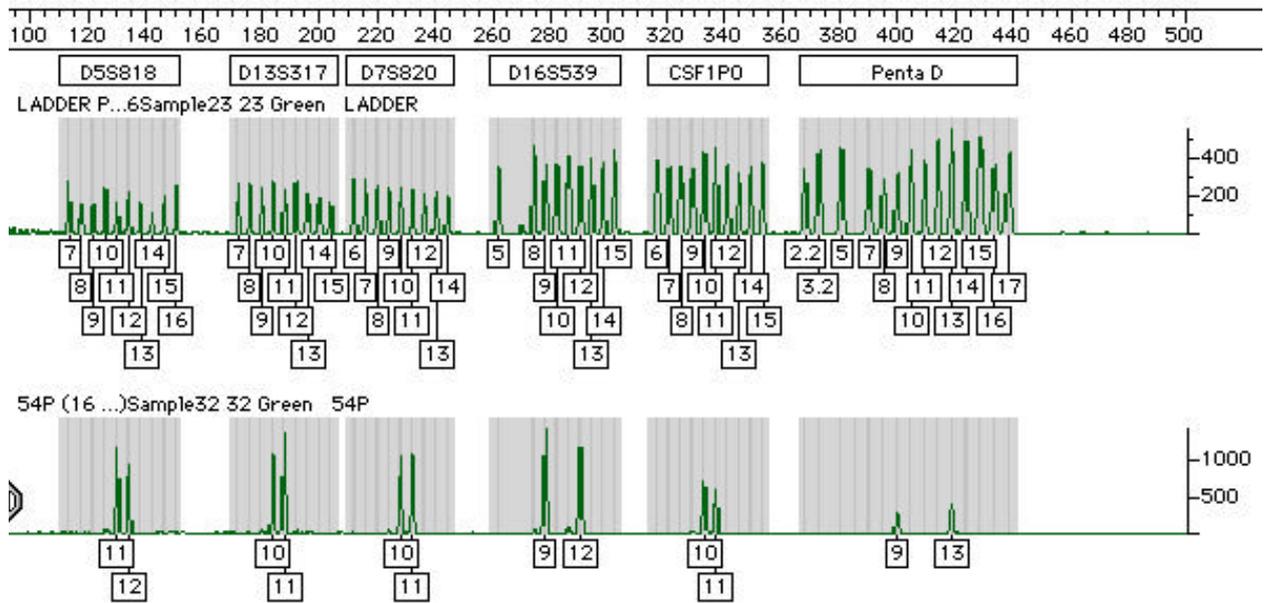
Por tanto en el presente capítulo se procederá a la exposición ordenada y esquematizada de todos los resultados obtenidos, se estudiarán los resultados obtenidos para el estudio poblacional de 15 loci, mostrándose para cada uno de ellos las frecuencias alélicas y los resultados de los test aplicados para demostrar el equilibrio de Hardy-Weinberg, la independencia de los loci así como otros parámetros de interés forense.

4.1.1- Visualización de los resultados obtenidos para el kit PPLEX 16 en la población de Paraguay.

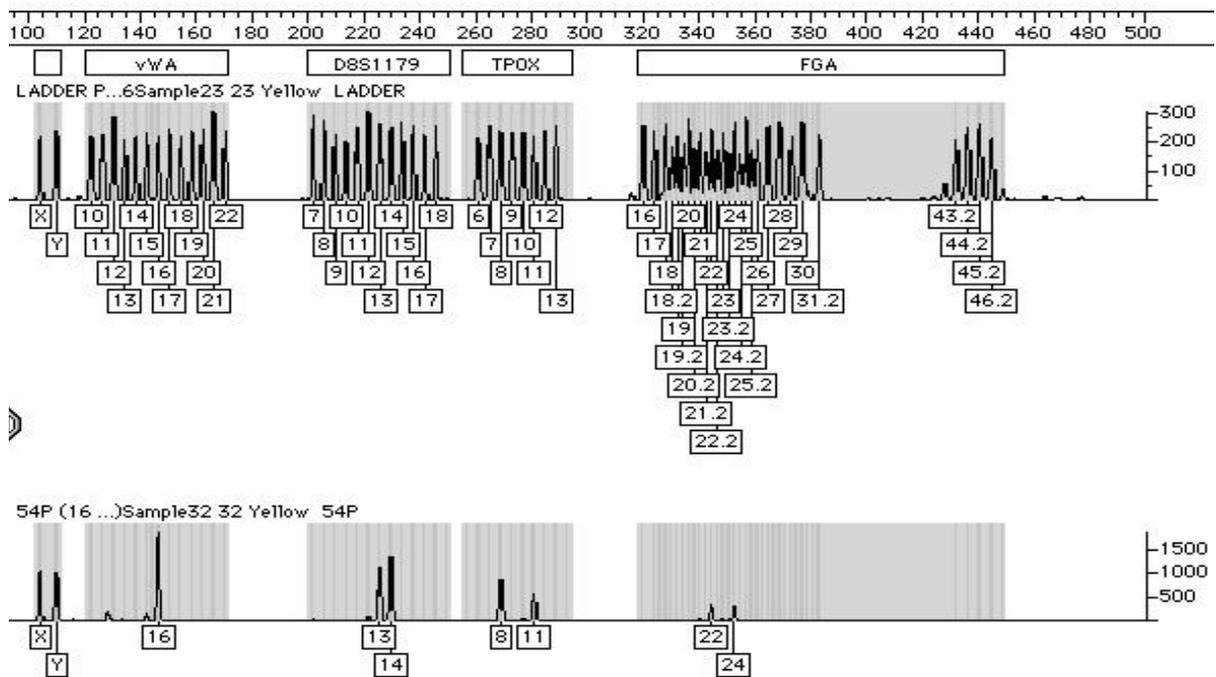
Tras el análisis de las muestras con el programa Genotyper, éste asignó automáticamente los alelos a cada marcador y los resultados se visualizaron como se muestra a continuación:



Electroferograma en el que se observan los resultados obtenidos para los loci marcados con el fluorocromo azul.



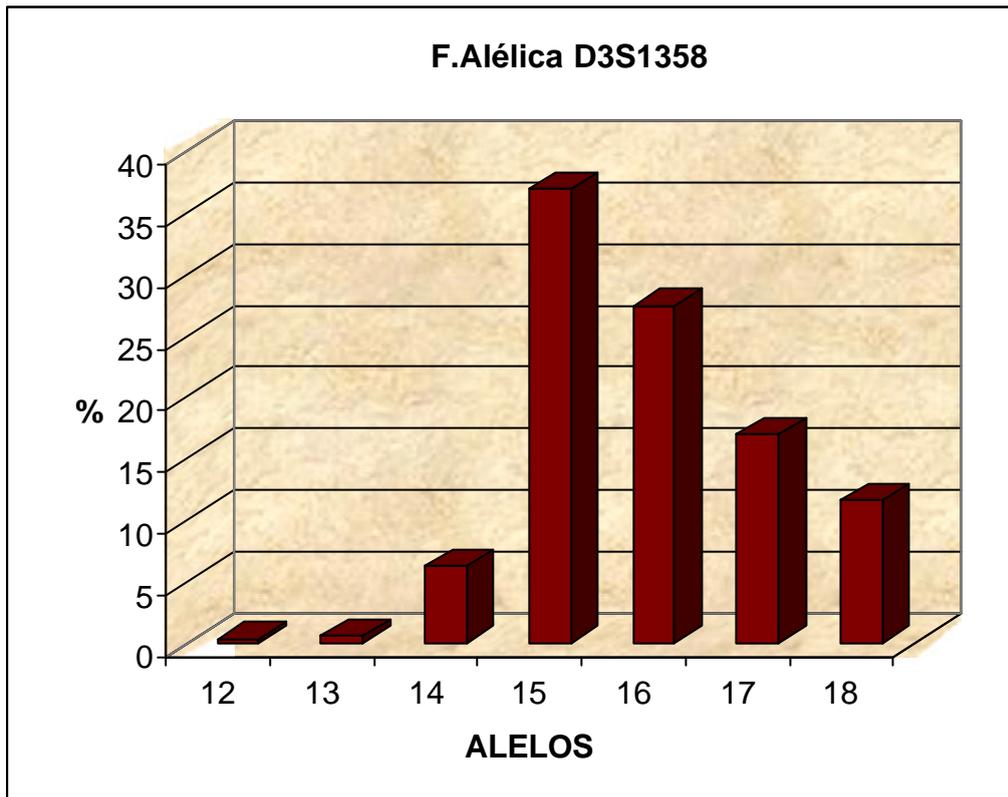
. Electroferograma en el que se observan los resultados obtenidos para los loci marcados con el fluorocromo verde



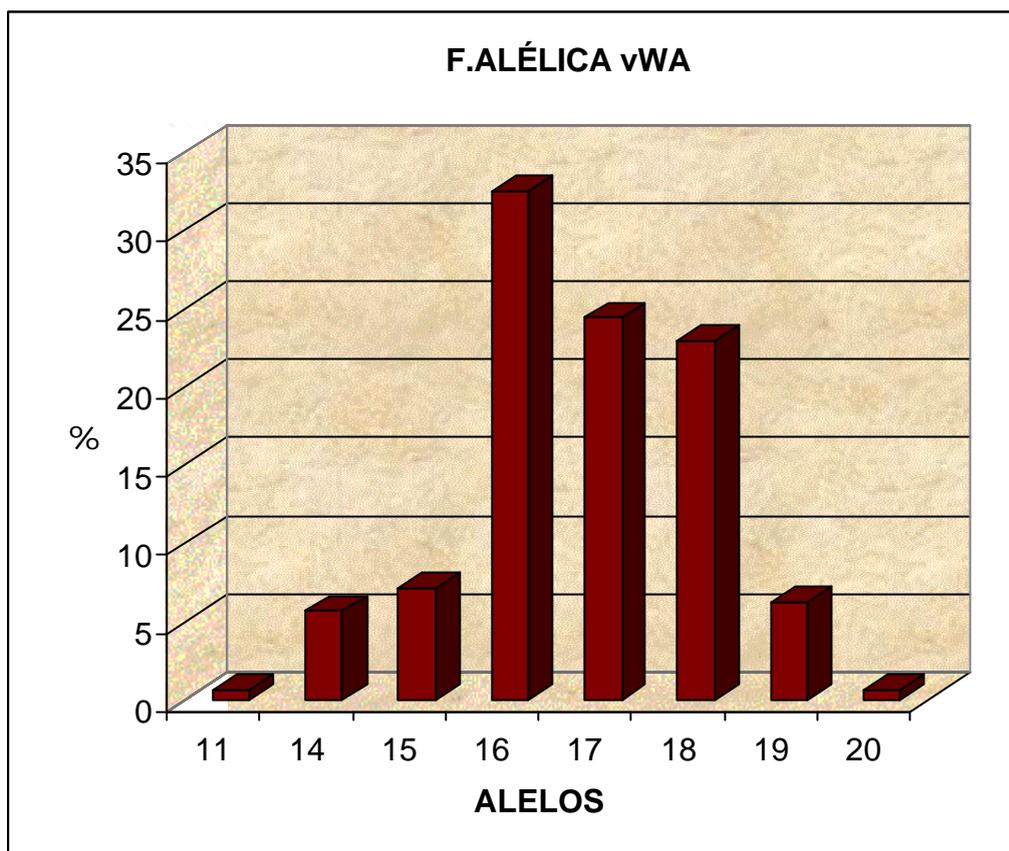
Electroferograma en el que se observan los resultados obtenidos para los loci marcados con el fluorocromo amarillo

4.1.2- Resultados obtenidos para la población de Paraguay.

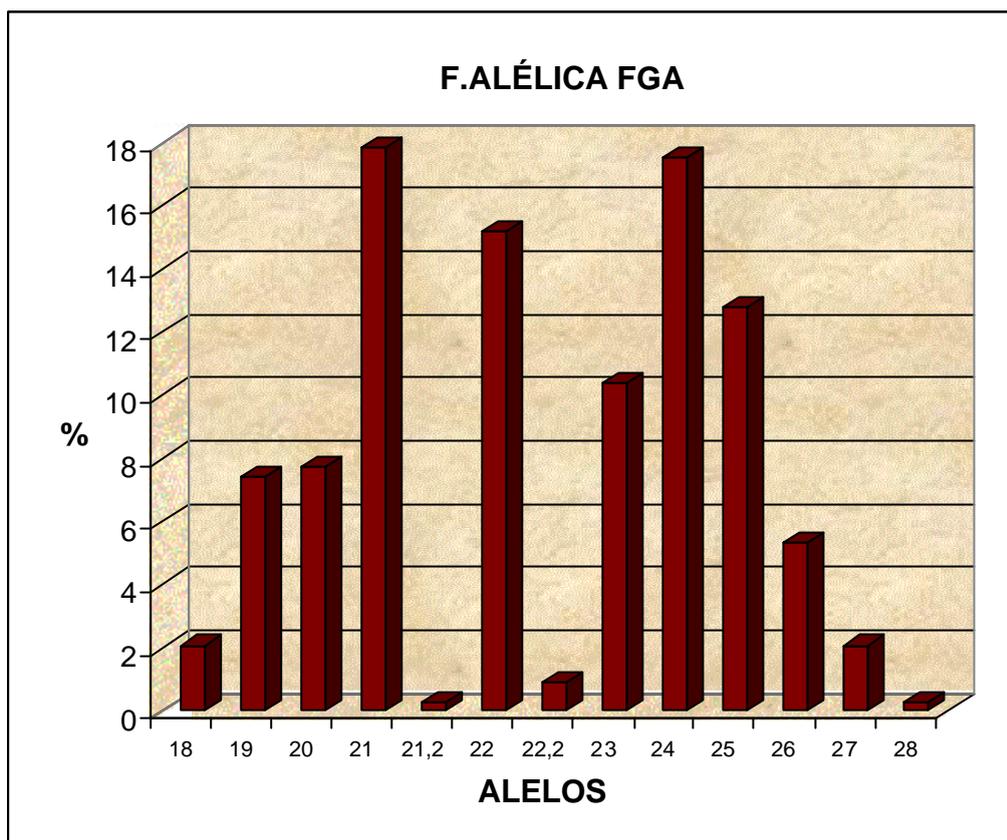
Una vez realizado el recuento de genotipos en la población estudiada, los datos fueron introducidos en formato de WP en el programa informático cedido por el Doctor Budowle del FBI, para un total de individuos de N=168.



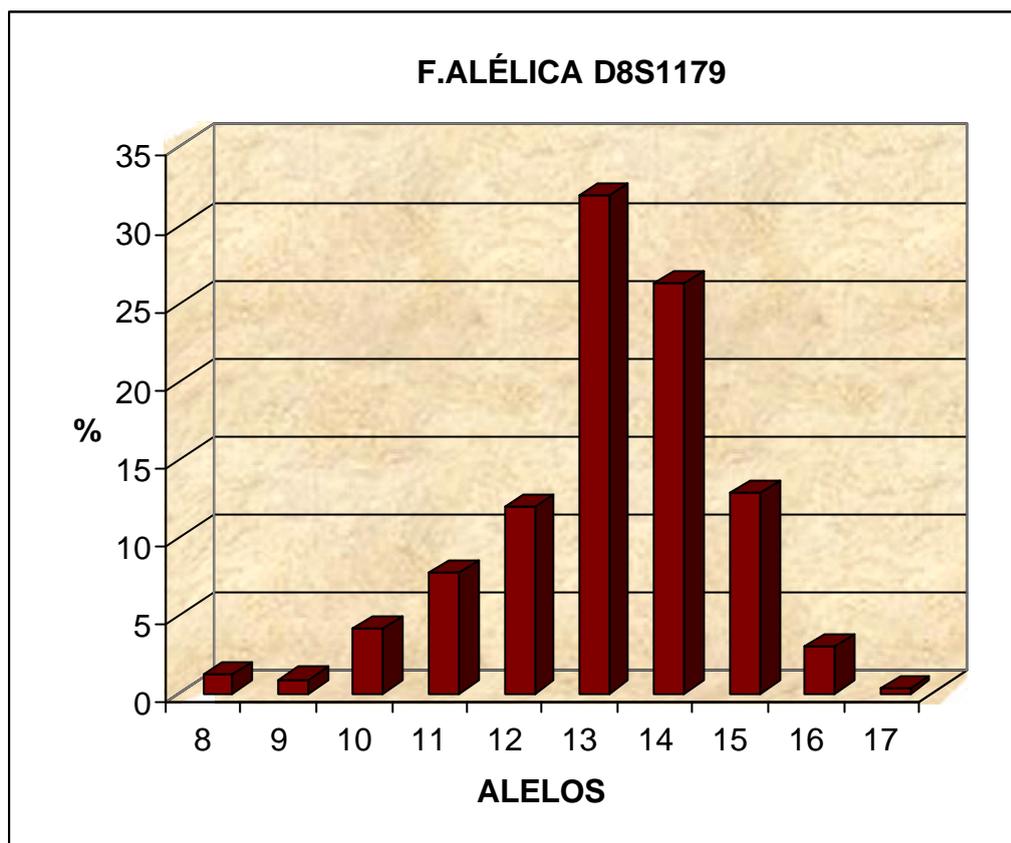
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
12	1	0.298
13	2	0.595
14	21	6.250
15	124	36.905
16	92	27.381
17	57	16.964
18	39	11.607



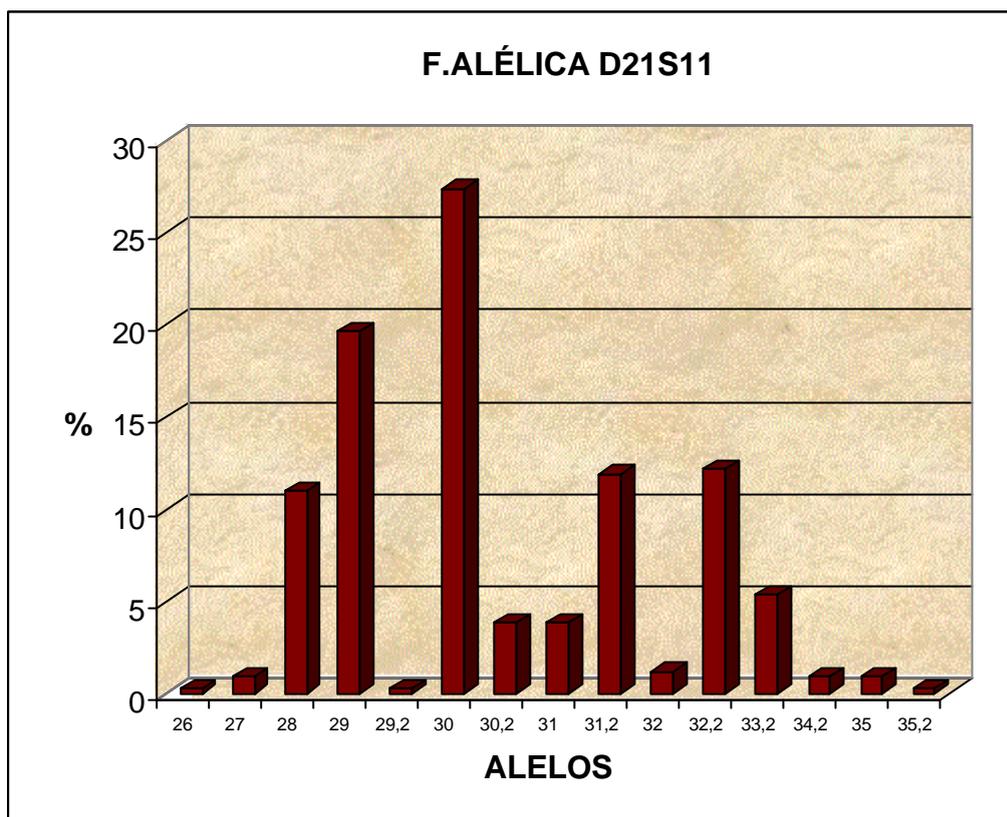
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
11	2	0.595
14	19	5.655
15	24	7.143
16	109	32.440
17	82	24.405
18	77	22.917
19	21	6.250
20	2	0.595



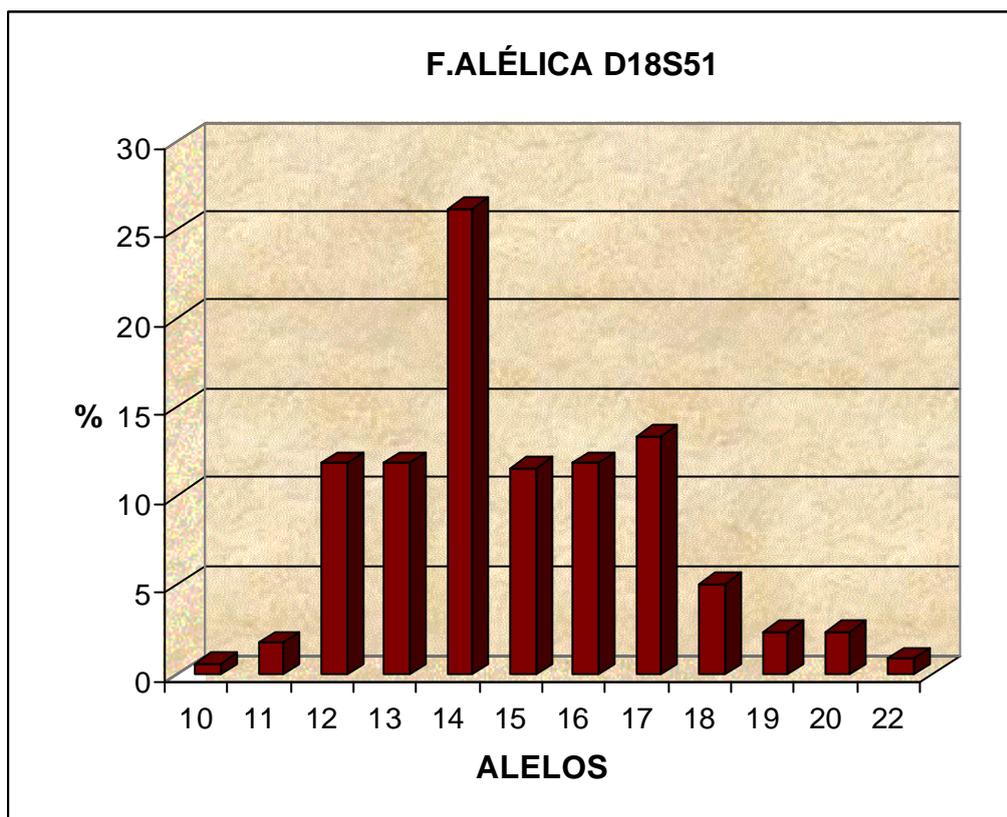
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
18	7	2,083
19	25	7,440
20	26	7,738
21	60	17,857
21,2	1	0,298
22	51	15,179
22,2	3	0,893
23	35	10,417
24	59	17,560
25	43	12,798
26	18	5,357
27	7	2,083
28	1	0,298



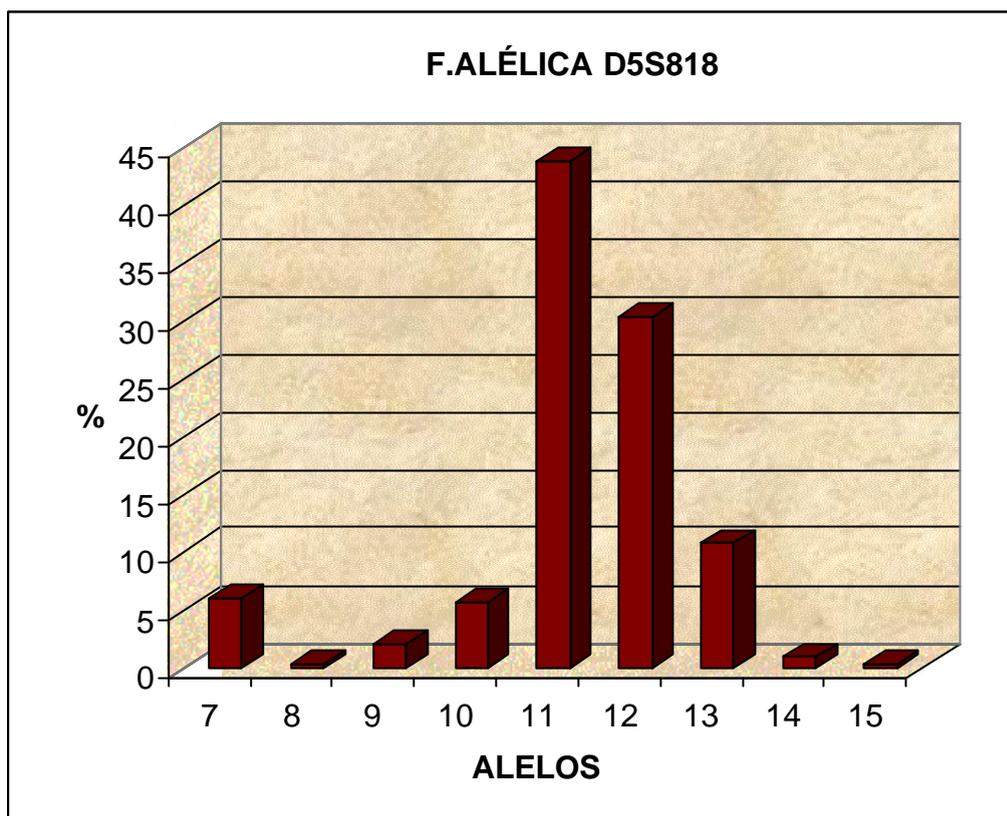
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
8	4	1,190
9	3	0,893
10	14	4,167
11	26	7,738
12	40	11,905
13	107	31,845
14	88	26,190
15	43	12,798
16	10	2,976
17	1	0,298



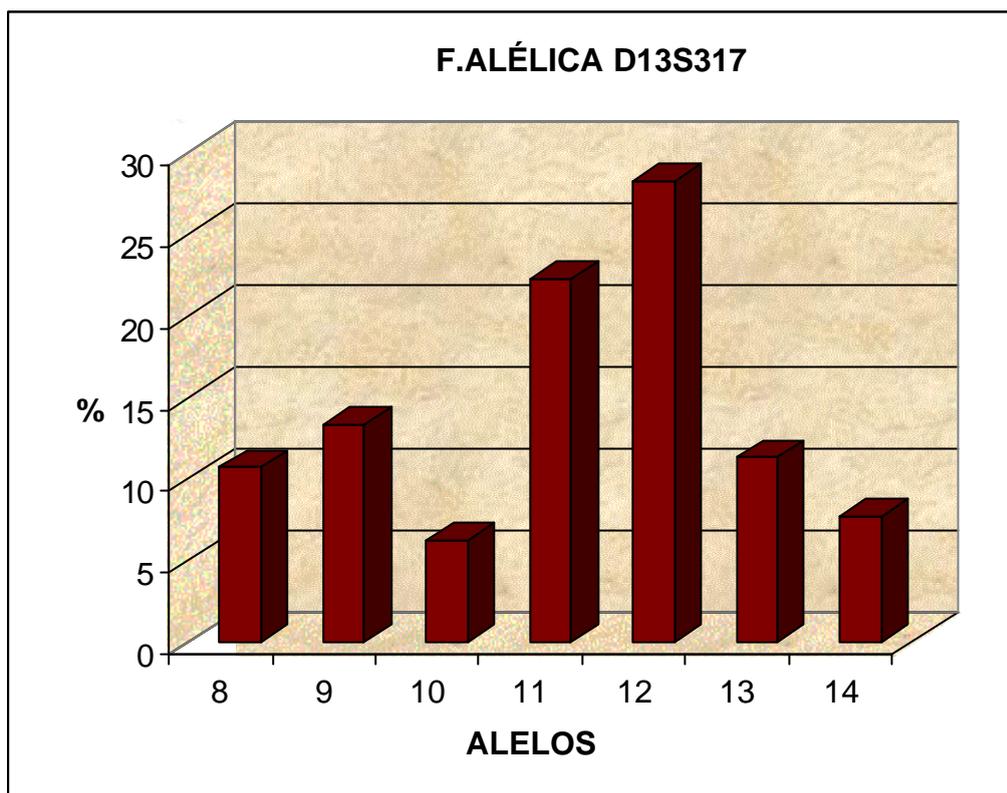
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
26	1	0,298
27	3	0,893
28	37	11,012
29	66	19,643
29,2	1	0,298
30	92	27,381
30,2	13	3,869
31	13	3,869
31,2	40	11,905
32	4	1,190
32,2	41	12,202
33,2	18	5,357
34,2	3	0,893
35	3	0,893
35,2	1	0,298



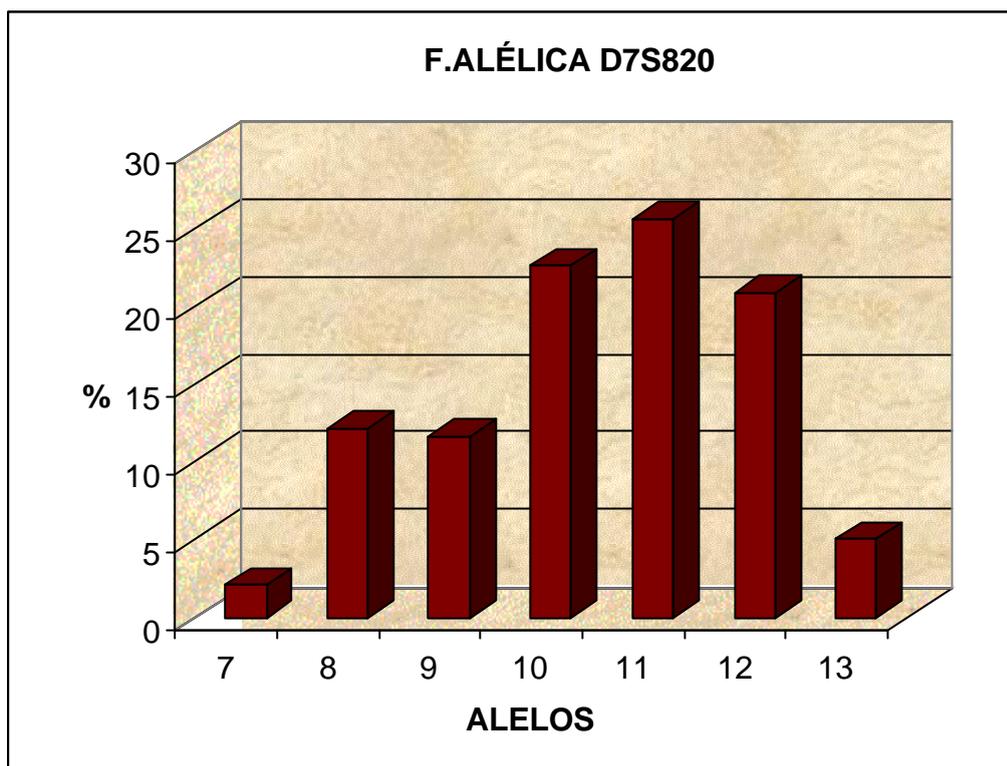
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
10	2	0,595
11	6	1,786
12	40	11,905
13	40	11,905
14	88	26,190
15	39	11,607
16	40	11,905
17	45	13,393
18	17	5,060
19	8	2,381
20	8	2,381
22	3	0,893



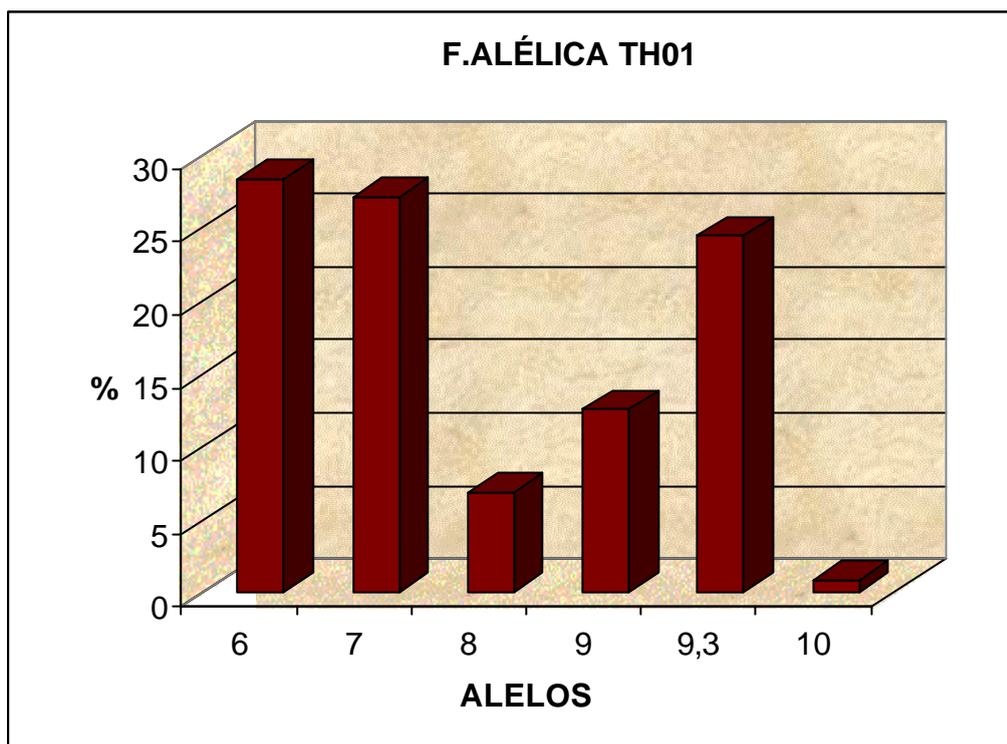
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
7	20	5,952
8	1	0,298
9	7	2,083
10	19	5,655
11	147	43,750
12	102	30,357
13	36	10,714
14	3	0,893
15	1	0,298



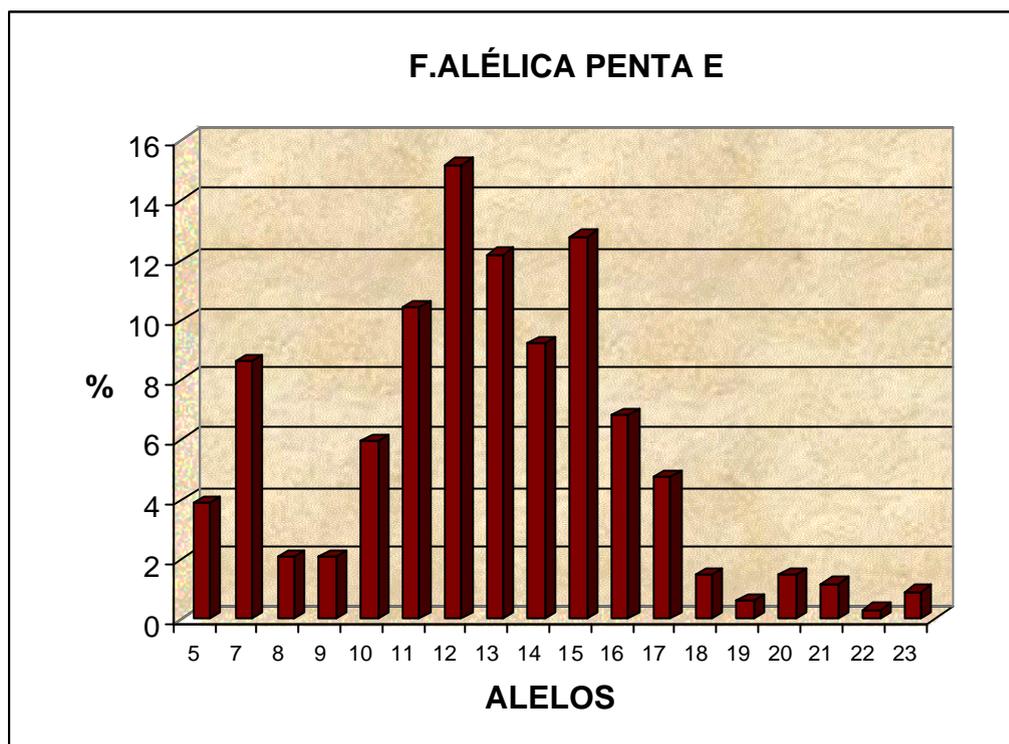
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
8	36	10,714
9	45	13,393
10	21	6,250
11	75	22,321
12	95	28,274
13	38	11,310
14	26	7,738



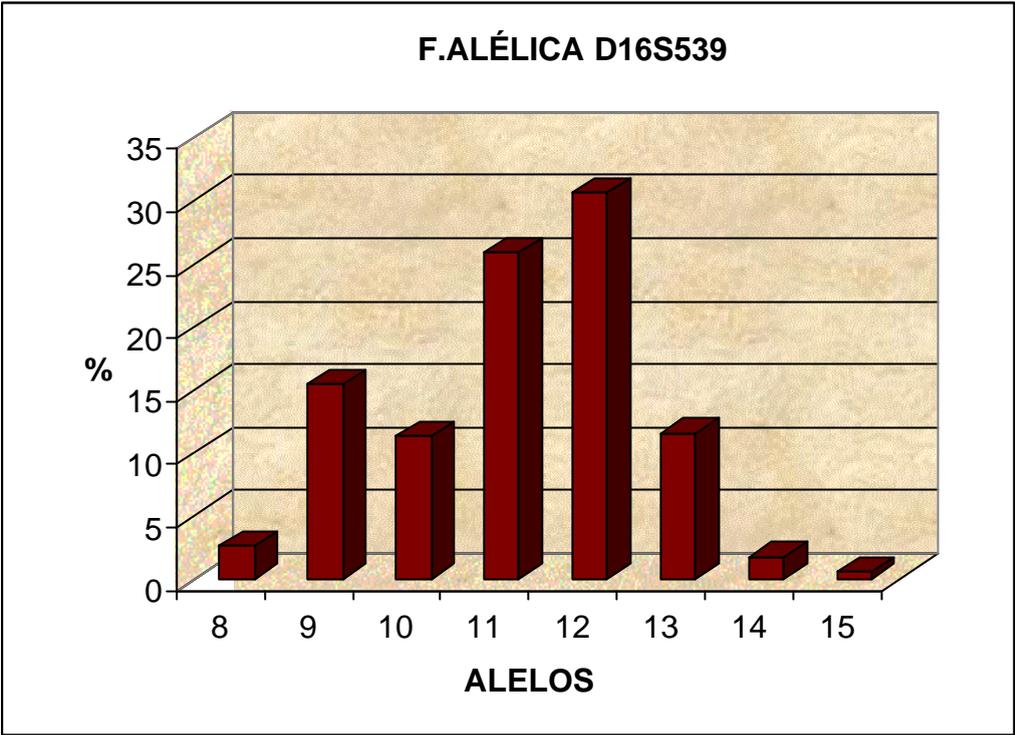
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
7	7	2,083
8	41	12,202
9	39	11,607
10	76	22,619
11	86	25,595
12	70	20,833
13	17	5,060



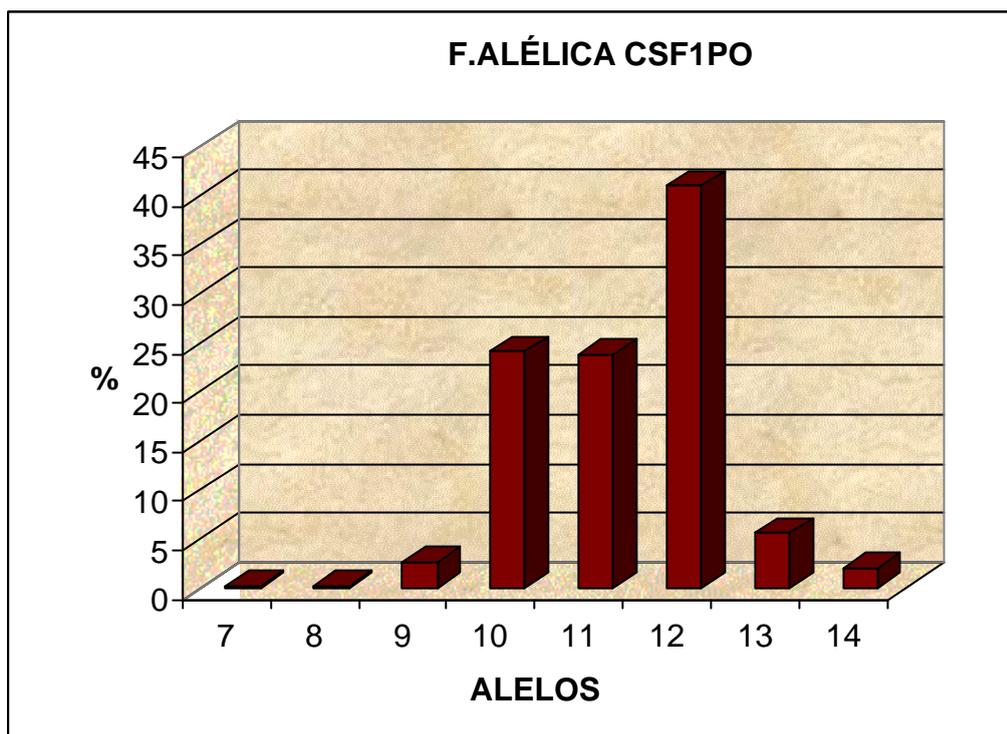
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
6	95	28,274
7	91	27,083
8	23	6,845
9	42	12,500
9,3	82	24,405
10	3	0,893



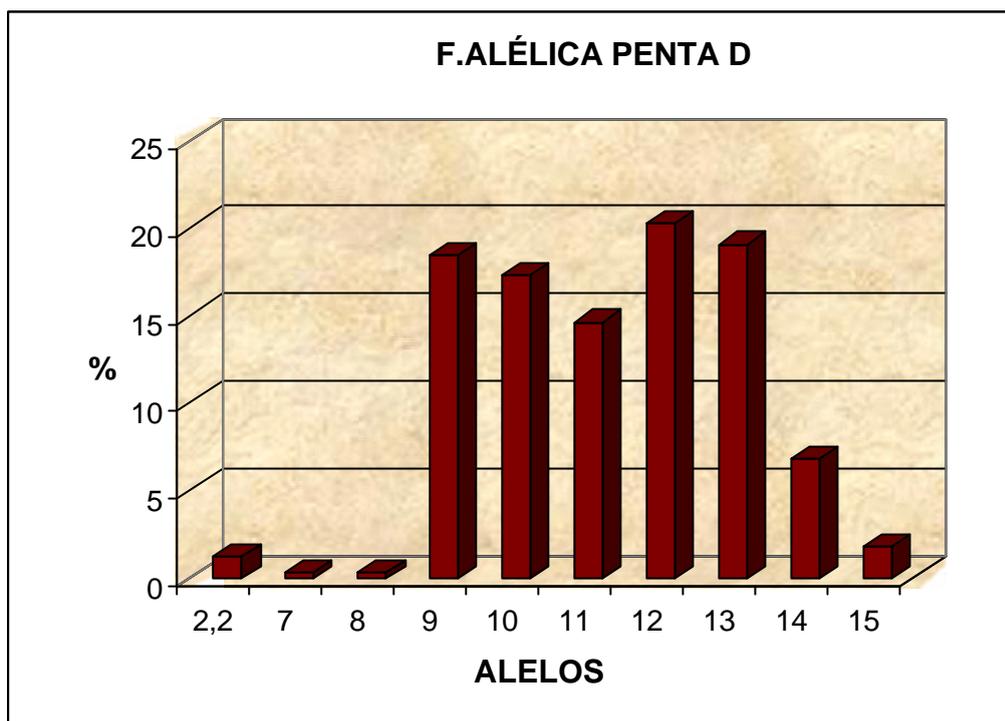
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
5	13	3,869
7	29	8,631
8	7	2,083
9	7	2,083
10	20	5,952
11	35	10,417
12	51	15,179
13	41	12,202
14	31	9,226
15	43	12,798
16	23	6,845
17	16	4,762
18	5	1,488
19	2	0,595
20	5	1,488
21	4	1,190
22	1	0,298
23	3	0,893



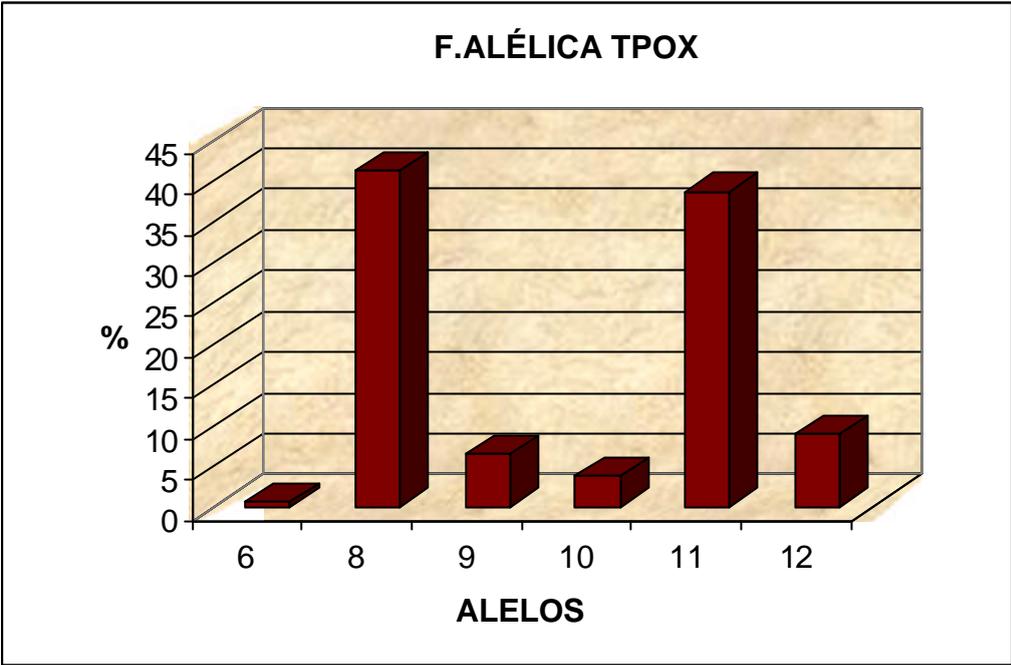
ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
8	9	2,679
9	52	15,476
10	38	11,310
11	87	25,893
12	103	30,655
13	39	11,607
14	6	1,786
15	2	0,595



ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
7	1	0,298
8	1	0,298
9	9	2,679
10	81	24,107
11	80	23,810
12	138	41,071
13	19	5,655
14	7	2,083



ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
2,2	4	1,190
7	1	0,298
8	1	0,298
9	62	18,452
10	58	17,262
11	49	14,583
12	68	20,238
13	64	19,048
14	23	6,845
15	6	1,786



ALELOS	CONTADOS	PORCENTAJE
6	2	0,595
8	139	41,369
9	22	6,548
10	13	3,869
11	130	38,690
12	30	8,929

A continuación mostramos los porcentajes de Homocigosidad observada así como la esperada y los resultados del Test de Homocigosidad y exacto, para los distintos marcadores contenidos en este Kit.

	D3S1358	vWA	FGA
Homocigosidad Observada (%).	28.0	24.4	10.7
Homocigosidad Esperada (%).	25.5	22.7	12.6
Test de Homocigosidad.	0.464	0.604	0.467
Test exacto.	0.252	0.900	0.585

	D8S1179	D21S11	D18S51
Homocigosidad Observada (%).	18.5	16.1	14.3
Homocigosidad Esperada (%).	20.7	15.9	14.4
Test de Homocigosidad.	0.471	0.938	0.963
Test exacto.	0.559	0.740	0.561

	D5S818	D13S317	D7S820
Homocigosidad Observada (%).	33.3	14.9	15.5
Homocigosidad Esperada (%).	30.0	17.9	18.9
Test de Homocigosidad.	0.349	0.301	0.257
Test exacto.	0.184	0.289	0.728

	TH01	PENTA E	D16S539
Homocigosidad Observada (%).	19.6	11.9	25.6
Homocigosidad Esperada (%).	23.1	9.2	21.0
Test de Homocigosidad.	0.288	0.225	0.143
Test exacto.	0.562	0.759	0.373

	CSF1PO	PENTA D	TPOX
Homocigosidad Observada (%).	32.1	20.2	34.5
Homocigosidad Esperada (%).	28.6	16.5	33.3
Test de Homocigosidad.	0.306	0.192	0.729
Test exacto.	0.791	0.277	0.308

Resultados del Test de Karlin.

LOCI	P
1 D3S1358 / 2 vWA	0.711
1 D3S1358 / 3 FGA	0.107
1 D3S1358 / 4 D8S1179	0.226
1 D3S1358 / 5 D21S11	0.094
1 D3S1358 / 6 D18S51	0.530
1 D3S1358 / 7 D5S818	0.388
1 D3S1358 / 8 D13S317	0.343
1 D3S1358 / 9 D7S820	0.609
1 D3S1358 / 10 THO1	0.387
1 D3S1358 / 11 PentaE	0.462
1 D3S1358 / 12 D16S539	0.321
1 D3S1358 / 13 CSF1PO	0.752
1 D3S1358 / 14 PentaD	0.921
1 D3S1358 / 15 TPOX	0.763
2 vWA / 3 FGA	0.052
2 vWA / 4 D8S1179	0.956
2 vWA / 5 D21S11	0.082
2 vWA / 6 D18S51	0.120
2 vWA / 7 D5S818	0.151
2 vWA / 8 D13S317	0.532
2 vWA / 9 D7S820	0.325
2 vWA / 10 THO1	0.352
2 vWA / 11 PentaE	0.053
2 vWA / 12 D16S539	0.379

LOCI	P
2 vWA / 13 CSF1PO	0.165
2 vWA / 14 PentaD	0.570
2 vWA / 15 TPOX	0.294
3 FGA / 4 D8S1179	0.583
3 FGA / 5 D21S11	0.969
3 FGA / 6 D18S51	0.033
3 FGA / 7 D5S818	0.507
3 FGA / 8 D13S317	0.636
3 FGA / 9 D7S820	0.210
3 FGA / 10 THO1	0.904
3 FGA / 11 PentaE	0.491
3 FGA / 12 D16S539	0.581
3 FGA / 13 CSF1PO	0.202
3 FGA / 14 PentaD	0.656
3 FGA / 15 TPOX	0.109
4 D8S1179 / 5 D21S11	0.733
4 D8S1179 / 6 D18S51	0.239
4 D8S1179 / 7 D5S818	0.586
4 D8S1179 / 8 D13S317	0.006
4 D8S1179 / 9 D7S820	0.901
4 D8S1179 / 10 THO1	0.348
4 D8S1179 / 11 PentaE	0.924
4 D8S1179 / 12 D16S539	0.474

LOCI	P
4 D8S1179 / 13 CSF1PO	0.968
4 D8S1179 / 14 PentaD	0.423
4 D8S1179 / 15 TPOX	0.584
5 D21S11 / 6 D18S51	0.439
5 D21S11 / 7 D5S818	0.270
5 D21S11 / 8 D13S317	0.950
5 D21S11 / 9 D7S820	0.404
5 D21S11 / 10 THO1	0.081
5 D21S11 / 11 PentaE	0.377
5 D21S11 / 12 D16S539	0.079
5 D21S11 / 13 CSF1PO	0.498
5 D21S11 / 14 PentaD	0.083
5 D21S11 / 15 TPOX	0.079
6 D18S51 / 7 D5S818	0.557
6 D18S51 / 8 D13S317	0.455
6 D18S51 / 9 D7S820	0.914
6 D18S51 / 10 THO1	0.280
6 D18S51 / 11 PentaE	0.624
6 D18S51 / 12 D16S539	0.858
6 D18S51 / 13 CSF1PO	0.776
6 D18S51 / 14 PentaD	0.161
6 D18S51 / 15 TPOX	0.798

LOCI	P
7 D5S818 / 8 D13S317	0.205
7 D5S818 / 9 D7S820	0.245
7 D5S818 / 10 THO1	0.684
7 D5S818 / 11 PentaE	0.089
7 D5S818 / 12 D16S539	0.911
7 D5S818 / 13 CSF1PO	0.010
7 D5S818 / 14 PentaD	0.215
7 D5S818 / 15 TPOX	0.172
8 D13S317 / 9 D7S820	0.995
8 D13S317 / 10 THO1	0.738
8 D13S317 / 11 PentaE	0.712
8 D13S317 / 12 D16S539	0.489
8 D13S317 / 13 CSF1PO	0.807
8 D13S317 / 14 PentaD	0.770
8 D13S317 / 15 TPOX	0.072
9 D7S820 / 10 THO1	0.133
9 D7S820 / 11 PentaE	0.329
9 D7S820 / 12 D16S539	0.325
9 D7S820 / 13 CSF1PO	0.990
9 D7S820 / 14 PentaD	0.866
9 D7S820 / 15 TPOX	0.309
10 THO1 / 11 PentaE	0.028
10 THO1 / 12 D16S539	0.566

LOCI	P
10 THO1 / 13 CSF1PO	0.118
10 THO1 / 14 PentaD	0.397
10 THO1 / 15 TPOX	0.163
11 PentaE / 12 D16S539	0.518
11 PentaE / 13 CSF1PO	0.414
11 PentaE / 14 PentaD	0.468
11 PentaE / 15 TPOX	0.567
12 D16S539 / 13 CSF1PO	0.338
12 D16S539 / 14 PentaD	0.808
12 D16S539 / 15 TPOX	0.504
13 CSF1PO / 14 PentaD	0.004
13 CSF1PO / 15 TPOX	0.432
14 PentaD / 15 TPOX	0.827

**VALORES DE PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (PD) Y
PODER DE EXCLUSIÓN (PE).**

Locus	PD(Obs)	PD (Exp)	PE
1 D3S1358	0.89151077	0.89271689	0.51483624
2 vWA	0.91546202	0.91200720	0.55883360
3 FGA	0.96598639	0.97001290	0.74098142
4 D8S1179	0.92368197	0.92780471	0.59971637
5 D21S11	0.95351474	0.95583990	0.68506984
6 D18S51	0.95897109	0.96280685	0.71032591
7 D5S818	0.86323696	0.86249670	0.46343428
8 D13S317	0.93594104	0.94339041	0.64294426
9 D7S820	0.92906746	0.93591004	0.62024462
10 TH01	0.89817177	0.90678134	0.54415416
11 PentaE	0.97966270	0.98337683	0.80853391
12 D16S539	0.92410714	0.92410099	0.58835125
13 CSF1PO	0.87337018	0.86933277	0.46963725
14 PentaD	0.94720805	0.94939159	0.66195898
15 TPOX	0.82667234	0.82783182	0.40801803
Total	>0.99999999	>0.99999999	0.99999944

5. DISCUSIÓN

5.1- ESTUDIO GENÉTICO-POBLACIONAL

5.1.1- Discusión de los resultados del Multiplex PowerPlex16 System para la población de Paraguay.

5.1.1.1- Discusión de los resultados analíticos.

Mediante este kit de detección fluorescente se analizaron quince loci tipo STR y un fragmento del gen de la amelogenina localizado en la región homóloga de los cromosomas X e Y (y que es utilizado para el diagnóstico del sexo en humanos).

Para los procesos de amplificación, electroforesis e interpretación de los resultados se siguieron los protocolos recomendados en el manual del fabricante GenePrint PowerPlex16 System de Promega.

La interpretación de los resultados se hizo por comparación con el ladder alélico que contiene el kit. El estándar de tamaño que se añade a cada muestra amplificada asegura una gran precisión en la determinación del tamaño de los fragmentos, lo cual hace que la comparación con los alelos del ladder sea más exacta, tanto si son alelos compuestos por repeticiones completas de la secuencia consenso, como variantes compuestas por repeticiones incompletas.

Los alelos han sido designados siguiendo las recomendaciones de la Comisión de ADN de la ISFH (DNA Recommendations, 1994, Bär et al, 1997).

El programa Genotyper asignó a los picos obtenidos los alelos correspondientes, siempre y cuando éstos no difiriesen en más de 0.5 pb del pico correspondiente en el ladder.

Para la mayoría de las muestras que nosotros utilizamos los alelos fueron asignados correctamente, no obstante, en aquellas en las que se observó algún alelo fuera de ladder ("off-ladder" alleles) volvió a repetirse el proceso de electroforesis.

Tras la asignación de los alelos, los resultados fueron introducidos en el programa informático utilizado para el análisis estadístico.

Los alelos más y menos frecuentes se muestran a continuación en la siguiente tabla:

<u>MARCADOR</u>	<u>ALELOS MAS FRECUENTES</u>	<u>ALELOS MENOS FRECUENTES</u>
D3S1358	15 y 16	12 y 13
vWA	16 y 17	11 y 20
FGA	21 y 24	21.2 y 28
D8S1179	13 y 14	9 y 17
D21S11	29 y 30	26, 29.2 y 35.2
D18S51	14 y 17	10 y 22
D5S818	11 y 12	8 y 15
D13S317	11 y 12	10 y 14
D7S820	10 y 11	7 y 13
THO1	6 y 7	10 y 8
PENTA E	12 y 15	19 y 22
D16S539	11 y 12	14 y 15
CSF1PO	12, 10 y 11	7 y 8
PENTA D	12,13 y 9	7 y 8
TPOX	8 y 11	6 y 10

Los 15 loci analizados conjuntamente en este kit comercial de Promega mostraron, en la población analizada, alelos discretos y distinguibles siendo posible así el cálculo de las frecuencias alélicas por recuento de los mismos.

5.1.1.2- Discusión del análisis estadístico.

Como quedó expuesto en el apartado de Introducción, bajo condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg las frecuencias genotípicas de una población vienen determinadas por las frecuencias alélicas, manteniéndose éstas constantes de generación en generación.

Cuando en Criminalística, por ejemplo, se analiza el ADN de una mancha de sangre encontrada en el lugar del delito y se quiere comparar con el ADN de un sospechoso es necesario conocer cuál es la frecuencia en la población de los genotipos encontrados para que, en caso de que coincidan, pueda darse un valor de probabilidad de que esa mancha de sangre procede de dicho sospechoso.

Obviamente, estudiar todos los genotipos de la población es imposible, por lo que se toma una muestra representativa ($n > 100$) y se analizan en ella las frecuencias de los alelos de los diferentes marcadores que serán utilizados

para la identificación genética. Por lo tanto, las frecuencias génicas obtenidas en un estudio poblacional no son valores exactos sino estimas con un margen de error.

Una vez calculadas las frecuencias alélicas en la muestra el siguiente paso es comprobar que la población estudiada se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para el locus estudiado. Para ello se aplican una serie de tests estadísticos cuyo objetivo es asegurar dicho equilibrio con un grado de fiabilidad del 95%.

Además, para que un marcador genético pueda ser utilizado en la identificación de individuos debe demostrarse que no se encuentra ligado con cualquier otro marcador de los utilizados con el mismo fin, tanto si se encuentran en el mismo o en diferentes cromosomas.

Una vez aplicados todos los tests estadísticos y comprobado que la población se encuentra en equilibrio y que no existe ligamiento entre los distintos loci, es posible utilizar los datos poblacionales obtenidos sin necesidad de repetir los muestreos cada pocos años (Carracedo et al, 1996).

Los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson indicaron que, de los 15 ninguno dio valores de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que estos marcadores están en equilibrio Hardy-Weinberg. No obstante, los tests empleados para la demostración de equilibrio no son fiables al 100% y asumen un margen de error o nivel de significancia (en nuestro caso del 0.05%) de aceptar la hipótesis alternativa (nuestros datos se alejan del equilibrio) cuando en realidad es verdadera.

También habría que considerar el tamaño de la muestra ya que los tests estadísticos son más exactos cuanto mayor es este valor.

Los loci más informativos han sido (por tener un mayor poder de discriminación) el FGA y Penta E, y los que tienen menos poder de discriminación son el TPOX y D5S818.

En cuanto al equilibrio de la fase gamética, los resultados obtenidos tras la aplicación del test de correlación de Karlin dieron valores de p por encima de 0.05 en la mayoría de los marcadores, demostrándose así que existe independencia de unos loci con respecto a otros y que, por lo tanto se cumple la segunda condición necesaria para la aplicación de dichos marcadores en identificación genética, si embargo también observamos con relación al **test de correlación de Karlin** que nos encontramos con valores de p por debajo de 0.05 en los pares de loci FGA/D18S51; $p=0.033$; D8S1179/D13S317; $p=0.006$; D5S818/CSF1PO; $p=0.010$; TH01/PentaE; $p=0.028$; CSF1PO/PentaD; $p=0.004$ de un total de 105 pares de comparaciones.

Estadísticamente, cuando se comparan dos poblaciones (en este caso dos loci) a través de K características medidas en ellas, cada comparación individual ha de hacerse a un error α/K si se desea obtener un valor global de

α (Martín Andrés et al, 1989). Esta corrección se denomina *corrección de Bonferroni* y en nuestro caso daría un error de 0.0004 (0.05/105) con lo que tras su aplicación se demostraría que los valores del **test de correlación de Karlin** para estos 5 pares de loci no son significativos.

En caso contrario, nos hubiésemos encontrado desde el punto de vista estadístico con una significancia para estos 5 pares de loci, aunque pensamos que genéticamente podríamos afirmar que estos loci son independientes puesto que así se ha demostrado en otros trabajos publicados recientemente.

Podemos concluir diciendo que nuestro Kit comercial de la casa Promega ha sido aplicado con éxito a las 168 muestras de nuestro estudio poblacional consiguiéndose en conjunto un poder de discriminación (PD) de **>0.99999999** y un poder de exclusión (PE) de **0.99999944**.

5.1.2- Discusión de parámetros estadísticos para otras poblaciones.

VALORES DE PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (PD), PODER DE EXCLUSIÓN (PE), TEST DE HOMOCIGOSIDAD (TH) Y TEST EXACTO (TE) EN LA POBLACIÓN DE COSTA RICA.

LOCUS	PD	PE	TH	TE
1 D3S1358	0.91561003	0.56804391	0.495	0.370
2 vWA	0.91344771	0.57743034	0.325	0.200
3 FGA	0.96717093	0.73432389	0.274	0.646
4 D8S1179	0.93232024	0.62833192	0.275	0.169
5 D21S11	0.95144172	0.67549430	0.584	0.822
6 D18S51	0.97328557	0.76953324	0.404	0.384
7 D5S818	0.88037118	0.49317995	0.383	0.905
8 D13S317	0.94280834	0.65108883	0.833	0.450
9 D7S820	0.92042730	0.58417474	0.149	0.288
10 TH01	0.91481942	0.56507345	0.290	0.559
11 PentaE	0.97883110	0.80674228	0.184	0.057
12 D16S539	0.93685627	0.62035246	0.057	0.308
13 CSF1PO	0.87013271	0.46248157	0.237	0.215
14 PentaD	0.95204369	0.67328325	0.402	0.033
15 TPOX	0.80894268	0.40411711	0.221	0.332
TOTAL	>0.99999999	0.99999967		

Para la población de Costa Rica los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson indicaron que de los 15 marcadores analizados, solo uno (Penta D) dio un valor de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que este marcador se aleja del equilibrio. No obstante, los test empleados para la demostración de equilibrio no son fiables al 100% y asumen un margen de

error o nivel de significancia de aceptar la hipótesis alternativa cuando en realidad es verdadera. Además tras el uso de la corrección de Bonferroni para el número de loci analizados, se observó que no existía tal grado de significancia. El resto de marcadores se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los loci más informativos han sido el Penta E y D18S51, y los que han tenido menos poder de discriminación han sido el TPOX y CSFPO.

En cuanto al equilibrio de la fase gamética, los resultados obtenidos tras la aplicación del test de correlación de Karlin dieron valores de p por encima de 0.05 en la mayoría de los marcadores pero sin embargo también nos encontramos con valores de p por debajo de 0.05 en los pares de loci D8S1179/D5S818;p=0.028;TPOX/FGA;p=0.045;FGA/TH01;p=0.026;D5S818/D16S539;p=0.010; de un total de 105 pares de comparaciones y donde tras la *corrección de Bonferroni*, los valores del **test de correlación de Karlin** para estos 4 pares de loci no han resultado ser significativos.

El poder de discriminación (PD) fue de **>0.99999999** y el poder de exclusión (PE) de **0.99999967**.

VALORES DE PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (PD), PODER DE EXCLUSIÓN (PE), TEST DE HOMOCIGOSIDAD (TH) Y TEST EXACTO (TE) EN LA POBLACIÓN DE BUENOS AIRES (ARGENTINA).

LOCUS	PD	PE	TH	TE
1 D3S1358	0.89520635	0.55995084	0.042	0.055
2 vWA	0.92010587	0.59747357	0.924	0.537
3 FGA	0.95951377	0.74182206	0.305	0.247
4 D8S1179	0.92912460	0.61972987	0.770	0.642
5 D21S11	0.94618175	0.68473614	0.337	0.345
6 D18S51	0.96716008	0.75145012	0.540	0.936
7 D5S818	0.87069895	0.46643097	0.210	0.231
8 D13S317	0.93931967	0.66091772	0.666	0.153
9 D7S820	0.92559553	0.58935836	0.207	0.801
10 THO1	0.90775414	0.55237420	0.016	0.109
11 PentaE	0.97363004	0.79136515	0.790	0.453
12 D16S539	0.91892952	0.58076682	0.942	0.918
13 CSF1PO	0.86756200	0.47503097	0.738	0.595
14 PentaD	0.94363298	0.65438853	0.017	0.226
15 TPOX	0.83070287	0.41436402	0.383	0.888
TOTAL	>0.99999999	0.99999958		

Para la población de Argentina los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson indicaron que de los 15 marcadores analizados, tres (D3S1358, THO1 y Penta D) dieron valores de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que estos marcadores se alejan del equilibrio. No obstante, recordar que los test empleados para la demostración de equilibrio no son fiables al 100% y asumen

un margen de error o nivel de significancia de aceptar la hipótesis alternativa cuando en realidad es verdadera. Además tras el uso de la corrección de Bonferroni para el número de loci analizados, se observó que no existía tal grado de significancia. El resto de marcadores se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los loci más informativos han sido el Penta E y D18S51, y los que han tenido menos poder de discriminación han sido el TPOX y CSFPO.

En cuanto al equilibrio de la fase gamética, los resultados obtenidos tras la aplicación del test de correlación de Karlin dieron valores de p por encima de 0.05 en la mayoría de los marcadores pero sin embargo también nos encontramos con valores de p por debajo de 0.05 en los pares de loci THO1/D7S820; P=0.030; THO1/D8S1179; P=0.021; D18S51/D7S820; P=0.026 PentaE/PentaD; P=0.027; D18S51/D5S818; P=0.042 y D5S818/D16S539; P=0.035 de un total de 105 pares de comparaciones y donde tras la *corrección de Bonferroni*, los valores del **test de correlación de Karlin** para estos 6 pares de loci no han resultado ser significativos.

El poder de discriminación (PD) fue de **>0.99999999** y el poder de exclusión (PE) de **0.99999958**.

VALORES DE PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (PD), PODER DE EXCLUSIÓN (PE), TEST DE HOMOCIGOSIDAD (TH) Y TEST EXACTO (TE) EN LA POBLACIÓN DE CHILE.

LOCUS	PD	PE	TH	TE
1 D3S1358	0.88405873	0.49149762	0.322	0.188
2 vWA	0.90207205	0.55517793	0.493	0.467
3 FGA	0.96647230	0.73539573	0.231	0.405
4 D8S1179	0.93419409	0.63224998	0.419	0.489
5 D21S11	0.95387339	0.68708958	0.517	0.604
6 D18S51	0.96501458	0.73361811	0.595	0.513
7 D5S818	0.89582466	0.53715336	0.253	0.343
8 D13S317	0.95340483	0.68325371	0.258	0.680
9 D7S820	0.90733028	0.55156953	0.794	0.230
10 THO1	0.89212828	0.53570855	0.116	0.461
11 PentaE	0.98328821	0.82803091	0.566	0.943
12 D16S539	0.91795085	0.58126074	0.897	0.002
13 CSF1PO	0.86344232	0.46526042	0.527	0.974
14 PentaD	0.95168680	0.68774901	0.982	0.119
15 TPOX	0.83756768	0.42261732	0.814	0.891
TOTAL	>0.99999999	0.99999961		

Para la población de Chile los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson indicaron que de los 15 marcadores analizados, solo uno (D16S539) dio un valor de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que este marcador se aleja del

equilibrio. No obstante, recordamos que los test empleados para la demostración de equilibrio no son fiables al 100% y asumen un margen de error o nivel de significancia de aceptar la hipótesis alternativa cuando en realidad es verdadera. Además tras el uso de la corrección de Bonferroni para el número de loci analizados, se observó que no existía tal grado de significancia. El resto de marcadores se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los loci más informativos han sido el Penta E, FGA y D18S51 y los que han tenido menos poder de discriminación han sido el TPOX y CSFPO.

En cuanto al equilibrio de la fase gamética, los resultados obtenidos tras la aplicación del test de correlación de Karlin dieron valores de p por encima de 0.05 en la mayoría de los marcadores pero sin embargo también nos encontramos con valores de p por debajo de 0.05 en los pares de loci TH01/FGA; $p=0.027$; PentaE/FGA; $p=0.046$; FGA/D8S1179; $p=0.009$ de un total de 105 pares de comparaciones y donde tras la *corrección de Bonferroni*, los valores del **test de correlación de Karlin** para estos 3 pares de loci no han resultado ser significativos.

El poder de discriminación (PD) fue de **>0.99999999** y el poder de exclusión (PE) de **0.99999961**.

VALORES DE PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (PD), PODER DE EXCLUSIÓN (PE), TEST DE HOMOCIGOSIDAD (TH) Y TEST EXACTO (TE) EN LA POBLACIÓN DE URUGUAY.

LOCUS	PD	PE	TH	TE
1 D3S1358	0.91115312	0.55679720	0.960	0.861
2 vWA	0.92743336	0.59750625	0.808	0.874
3 FGA	0.96145982	0.73350004	0.453	0.009
4 D8S1179	0.93075113	0.62909510	0.736	0.301
5 D21S11	0.96331160	0.73205338	0.987	0.532
6 D18S51	0.96832684	0.75598564	0.084	0.189
7 D5S818	0.88329926	0.50593916	0.635	0.537
8 D13S317	0.92774199	0.61708945	0.302	0.616
9 D7S820	0.93090544	0.60984292	0.214	0.735
10 TH01	0.91763435	0.58581517	0.576	0.092
11 PentaE	0.97519386	0.78652066	0.289	0.223
12 D16S539	0.90559778	0.54701101	0.566	0.440
13 CSF1PO	0.86246673	0.45583377	0.842	0.696
14 PentaD	0.95382123	0.70052626	0.915	0.035
15 TPOX	0.84371745	0.42580028	0.539	0.200
TOTAL	1.00000000	0.99999968		

Para la población de Uruguay los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson indicaron que de los 15 marcadores analizados, solo dos (FGA y Penta D) dieron un valor de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que este marcador

se aleja del equilibrio. No obstante, recordamos que los test empleados para la demostración de equilibrio no son fiables al 100% y asumen un margen de error o nivel de significancia de aceptar la hipótesis alternativa cuando en realidad es verdadera. Además tras el uso de la corrección de Bonferroni para el número de loci analizados, se observó que no existía tal grado de significancia. El resto de marcadores se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los loci más informativos han sido el Penta E y D18S51 y los que han tenido menos poder de discriminación han sido el TPOX y CSFPO.

En cuanto al equilibrio de la fase gamética, los resultados obtenidos tras la aplicación del test de correlación de Karlin dieron valores de p por encima de 0.05 en la mayoría de los marcadores pero sin embargo también nos encontramos con valores de p por debajo de 0.05 en los pares de loci D16S539/CSFPO; $p=0.047$; D7S820/THO1; $p=0.000$; THO1/PENTA E; $p=0.016$; THO1/D8S1179; $p=0.041$ de un total de 105 pares de comparaciones y donde tras la *corrección de Bonferroni*, los valores del **test de correlación de Karlin** para 3 de los pares de loci estudiados, no han resultado ser significativos, sin embargo la pareja D7S820/THO1; $p=0.000$, dá significativo aún después de la corrección aplicada. Genéticamente podríamos afirmar que estos dos loci, son independientes puesto que así se ha demostrado en otros trabajos publicados (Kupferschmid et al, 1999; Gehrig et al, 1999; Neuhuber et al, 1999; Hanstschel et al, 1999).

El poder de discriminación (PD) fue de **1.00000000** y el poder de exclusión (PE) de **0.99999968**.

VALORES DE PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (PD), PODER DE EXCLUSIÓN (PE), TEST DE HOMOCIGOSIDAD (TH) Y TEST EXACTO (TE) EN LA POBLACIÓN DE BRASIL.

LOCUS	PD	PE	TH	TE
1 D3S1358	0.89740000	0.53064161	0.495	0.362
2 vWA	0.90480000	0.59566631	0.194	0.046
3 FGA	0.95840000	0.73148288	0.400	0.156
4 D8S1179	0.93300000	0.62637293	0.368	0.466
5 D21S11	0.96200000	0.72804410	0.263	0.715
6 D18S51	0.96860000	0.76701342	0.969	0.473
7 D5S818	0.85640000	0.47093924	0.159	0.017
8 D13S317	0.91800000	0.56613593	0.287	0.630
9 D7S820	0.91900000	0.60128470	0.857	0.065
10 THO1	0.92940000	0.61603724	0.017	0.041
11 PentaE	0.97620000	0.79647518	0.263	0.764
12 D16S539	0.91380000	0.57664122	0.735	0.395
13 CSF1PO	0.88720000	0.49523125	0.412	0.785
14 PentaD	0.94880000	0.69194011	0.242	0.133
15 TPOX	0.81300000	0.41488206	0.074	0.527
TOTAL	>0.99999999	0.99999967		

Para la población de Brasil los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson indicaron que de los 15 marcadores analizados, tres (VWA, D5S818 y THO1) dieron un valor de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que este marcador se aleja del equilibrio. No obstante, recordamos que los test empleados para la demostración de equilibrio no son fiables al 100% y asumen un margen de error o nivel de significancia de aceptar la hipótesis alternativa cuando en realidad es verdadera. Además tras el uso de la corrección de Bonferroni para el número de loci analizados, se observó que no existía tal grado de significancia. El resto de marcadores se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los loci más informativos han sido el Penta E, FGA y D18S51 y los que han tenido menos poder de discriminación han sido el TPOX y D5S818.

En cuanto al equilibrio de la fase gamética, los resultados obtenidos tras la aplicación del test de correlación de Karlin dieron valores de p por encima de 0.05 en la mayoría de los marcadores pero sin embargo también nos encontramos con valores de p por debajo de 0.05 en los pares de loci D13S317/VWA; $p=0.044$; D13S317/PENTA D; $p=0.016$; FGA/VWA; $p=0.027$; THO1/D3S1358; $p=0.035$; TPOX/CSF1PO; $p=0.033$; D3S1358/PENTA E; $p=0.033$ de un total de 105 pares de comparaciones y donde tras la *corrección de Bonferroni*, los valores del **test de correlación de Karlin** para estos 6 pares de loci no han resultado ser significativos.

El poder de discriminación (PD) fue de **>0.99999999** y el poder de exclusión (PE) de **0.99999967**.

VALORES DE PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (PD), PODER DE EXCLUSIÓN (PE), TEST DE HOMOCIGOSIDAD (TH) Y TEST EXACTO (TE) EN LA POBLACIÓN DE ESPAÑA.

LOCUS	PD	PE	TH	TE
1 D3S1358	0.92269737	0.58299702	0.389	0.844
2 vWA	0.92944945	0.60962035	0.788	0.488
3 FGA	0.96641274	0.73910229	0.357	0.336
4 D8S1179	0.92529432	0.62118533	0.396	0.048
5 D21S11	0.96156510	0.71562119	0.118	0.582
6 D18S51	0.96918283	0.75197184	0.844	0.897
7 D5S818	0.87629848	0.48530485	0.211	0.274
8 D13S317	0.91784972	0.59710511	0.199	0.181
9 D7S820	0.92269737	0.60817361	0.650	0.267
10 THO1	0.91326177	0.57932276	0.582	0.227
11 PentaE	0.96892313	0.74728688	0.229	0.603
12 D16S539	0.90226801	0.55780904	0.209	0.143
13 CSF1PO	0.83907548	0.45017867	0.118	0.261
14 PentaD	0.94650277	0.67224651	0.788	0.048
15 TPOX	0.81864612	0.40301804	0.470	0.331

TOTAL	>0.99999999	0.99999953		
--------------	-----------------------	-------------------	--	--

Para la población de España los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson indicaron que de los 15 marcadores analizados, dos (Penta D y D8S1179) dieron un valor de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que este marcador se aleja del equilibrio. No obstante, recordamos que los test empleados para la demostración de equilibrio no son fiables al 100% y asumen un margen de error o nivel de significancia de aceptar la hipótesis alternativa cuando en realidad es verdadera. Además tras el uso de la corrección de Bonferroni para el número de loci analizados, se observó que no existía tal grado de significancia. El resto de marcadores se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los loci más informativos han sido el Penta E y D18S51 y los que han tenido menos poder de discriminación han sido el TPOX y CSF1PO.

En cuanto al equilibrio de la fase gamética, los resultados obtenidos tras la aplicación del test de correlación de Karlin dieron valores de p por encima de 0.05 en la mayoría de los marcadores pero sin embargo también nos encontramos con valores de p por debajo de 0.05 en los pares de loci TH01/PENTA E; P=0.021; D21S11/D18S51; P=0.012; D21S11/D16S539; P=0.017; D18S51/TPOX; P=0.008; D13S317/D7S820; P=0.026; D13S317/TPOX; P=0.044; D7S820/CSF1PO; P=0.020; D16S539/PENTA D; P=0.040 de un total de 105 pares de comparaciones y donde tras la *corrección de Bonferroni*, los valores del **test de correlación de Karlin** para estos 8 pares de loci no han resultado ser significativos.

El poder de discriminación (PD) fue de **>0.99999999** y el poder de exclusión (PE) de **0.99999953**.

Los alelos más y menos frecuentes para las diferentes poblaciones se muestran a continuación en la siguiente tabla:

ALELOS MÁS FRECUENTES PARA LOS 15 STR DE LAS POBLACIONES DE PARAGUAY, COSTA RICA, ECUADOR, BRASIL, ARGENTINA, CHILE, URUGUAY Y ESPAÑA.

LOCUS	COST.	BRAS.	ARGE.	CHIL.	URUG.	ESPA.
D3S1358	15	16	15	15	16	16
vWA	16	17	16	16	17	17
FGA	24	23	22 y 25	24	22	21
D8S1179	13	13	13	13	13	13
D21S11	30	29 y 30	30	30	30	30
D18S51	14	14	15	14	12	14
D5S818	11	11	11	11	11	11
D13S317	12	12	12	12	11	12
D7S820	11	10	10	11	10	10
TH01	6	7	7	6	9.3	6
PentaE	12	11	12	12	12	12
D16S539	12	11	12	11	11	11
CSF1PO	12	11	12	12	11	11
PentaD	10 y 11	11	12	10	9	12
TPOX	8	8	8	8	8	8

Los 15 loci analizados conjuntamente en este kit comercial de Promega mostraron, en las diferentes poblaciones, alelos discretos y distinguibles siendo posible así el cálculo de las frecuencias alélicas por recuento de los mismos.

5.2- DISCUSIÓN GLOBAL

En su conjunto, el kit desarrollado por la firma Promega (USA) y comercializado bajo el nombre PowerPlex 16 System, se muestra, en nuestras manos, como una herramienta útil en el ámbito de la genética forense. Más útil aún resulta en su aplicación en el estudio biológico de la paternidad, ya que aplicado en conjunción con otros marcadores STR permite llegar a valores de índice de paternidad o probabilidad de paternidad bastante elevados.

En el campo de la criminalística su importancia deriva de varias razones. En primer lugar, porque viene a aumentar la batería de marcadores disponibles para la resolución de casos criminales en términos puramente estadísticos (PD, PE,...). En segundo lugar, por el aspecto metodológico, ya que se usan protocolos similares a otros kits en uso, lo cual significa que es fácil y de rápida implantación en los laboratorios que tienen experiencia con kits similares.

Las técnicas fluorescentes tienen mayor sensibilidad y el tratamiento informatizado de los resultados puede facilitar la interpretación de los casos

complejos (debido a la calidad de la muestra, a la aparición de “stutter bands”, etc), y ello son ventajas irrefutables.

Sin embargo, es necesario que los loci analizados actualmente puedan ser estudiados también por técnicas básicas, manuales y baratas, asequibles a cualquier laboratorio o incluso a los grandes laboratorios cuando hay problemas técnicos. En base a estas características, tanto el Grupo Científico de Trabajo para Métodos y Análisis del ADN (SWGDM) capitaneado por el FBI, como el Grupo Iberoamericano de Trabajo en ADN (GITAD) de la Academia Iberoamericana de Ciencias y Estudios Forenses (AICEF), de especial interés para nosotros, incluyen a los 15 loci de este Kit como loci de interés especial y de uso común entre los diferentes países (Gitad, Profiles in DNA, 1999) para poder comparar datos, construir bases de datos, etc.

MÁXIMA PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (Highest P.D), MÍNIMA PROBABILIDAD DE DISCRIMINACIÓN (Minimum P.D), MÁXIMO PODER DE EXCLUSION (Highest P.E), MÍNIMO PODER DE EXCLUSION (Minimum P.E), PARA LAS DIFERENTES POBLACIONES ANALIZADAS.

POBLACIONES	Highest P.D	Minimum P.D	Highest P.E	Minimum P.E
ARGENTINA	PENTA E (97.4)	TPOX (83.1)	PENTA E (79.1)	TPOX (41.4)
BRASIL	PENTA E (97.6)	TPOX (81.3)	PENTA E (79.6)	TPOX (41.5)
CHILE	PENTA E (98.3)	TPOX (83.8)	PENTA E (82.8)	TPOX (42.3)
COSTA RICA	PENTA E (97.9)	TPOX (80.9)	PENTA E (80.7)	TPOX (40.4)
ESPAÑA	PENTA E (96.9)	TPOX (81.8)	D18S51 (75.2)	TPOX (40.3)
URUGUAY	PENTA E (97.5)	TPOX (84.4)	PENTA E (78.7)	TPOX (42.6)
PARAGUAY	PENTA E (98.0)	TPOX (82.6)	PENTA E (80.8)	TPOX (40.8)

En todos los países (incluido el de nuestro estudio), la Probabilidad de discriminación con el empleo de estos 15 marcadores, fue mayor de 99.999999 y el Poder de exclusión fue mayor del 99.9999. Incluso a pesar de las diferencias históricas y geográficas, todas las poblaciones muestran un P.D y P.E muy similar. En todas las poblaciones el Locus que resultó ser más discriminativo fue el Penta E y el menos informativo el TPOX. El sistema múltiplex usado ha resultado ser una herramienta muy poderosa para propósitos de identificación humana.

6. CONCLUSIONES

PRIMERA: Los loci microsatélites estudiados con el kit PowerPlex16 System (D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D16S539, CSF1PO, PENTA D, TPOX, THO1, PENTA E, y D7S820) se encuentran, en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población analizada.

SEGUNDA: Al estudiar la correlación o equilibrio de la fase gamética de los quince loci entre sí, no se observaron valores de significancia relevantes, lo cual nos lleva a afirmar que los loci considerados son independientes entre sí en nuestra población.

TERCERA: DE los quince loci estudiados el más informativo resultó ser el Penta E, con un poder de discriminación del 97,96% y una probabilidad de exclusión del 80,85%. Debemos puntualizar que el locus FGA confiere un poder de discriminación del 96,59% y un poder de exclusión a priori del 74.09%, por lo que los loci más informativos serían el Penta E y el FGA.

En conjunto, los quince loci analizados en el kit confieren un poder de discriminación de $>0,99999999$ y una probabilidad de exclusión de $0,99999944$.

CUARTA: cuando comparamos los resultados de Probabilidad de Discriminación y Poder de Exclusión de nuestra población analizada, respecto a otras poblaciones estudiadas con los mismo marcadores genéticos, en todos los casos fueron mayores del 99.999999 para P.D y mayores del 99.9999 para P.E, mostrando valores similares, y todo ello a pesar de las diferencias históricas y geográficas de estas poblaciones.

QUINTA: los resultados obtenidos tras la aplicación del test de Homocigosidad y test exacto de Guo-Thompson para el resto de poblaciones, indicaron que de los 15 marcadores analizados, algunos dieron valores de p por debajo de 0.05 por lo que, en principio, cabría pensar que este marcador se aleja del equilibrio pero tras el uso de la corrección de Bonferroni para el número de loci analizados, se observó que no existía tal grado de significancia.

SEXTA: Habida cuenta de la importancia que en Genética Forense supone la búsqueda de nuevos polimorfismos de ADN con un alto poder de discriminación y cuyo análisis sea rápido y sencillo, podemos afirmar que los loci analizados en este trabajo cumplen todos los requisitos necesarios para su aplicación en identificación genética humana y que son una poderosa herramienta para su uso en identificación humana.

Las técnicas utilizadas para el análisis de los mismos, son el reflejo de la adaptación de la Genética Forense al desarrollo y evolución de la Biología Molecular, desarrollo que está haciendo posible el estudio conjunto de múltiples loci tipo microsatélite de una manera sencilla y rápida, disminuyendo los errores de interpretación de los resultados y permitiendo alcanzar valores de probabilidad con una fiabilidad cada vez más cercana al 100%. La

electroforesis capilar en equipos automatizados con fluorescencia inducida por láser permitie un análisis eficiente y rápido de las muestras, con menos pasos intermedios y disminuyendo el peligro de contaminación.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alberts, B.** "Biología Molecular de la célula" 2ª edición. Editorial Omega, Barcelona 1992.
2. **Allshire, R. C., M. Dempster, and N. D. Hastie.** 1989. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Research*. **17**(12):4611-27.
3. **Anderson, T. D., J. P. Ross, R. K. Roby, D. A. Lee, and M. M. Holland.** 1999. A validation study for the extraction and analysis of DNA from human nail material and its application to forensic casework. *Journal Of Forensic Sciences*. **44**(5):1053-6.
4. **Andreassen, R., and B. Olaisen.** 1997. Length and sequence variation in D7S22 (g3) alleles studied by high resolution length measurements and nucleotide sequencing. *Electrophoresis*. **18**(5):675-81.
5. **Andrés, A., Luna, J.D.** 1989. *Bioestadística para las Ciencias de la Salud*. 2ª Edición. Ediciones Norma. Madrid.
6. **Armour, J. A., P. C. Harris, and A. J. Jeffreys.** 1993. Allelic diversity at minisatellite MS205 (D16S309): evidence for polarized variability. *Human Molecular Genetics*. **2**(8):1137-45.
7. **Bär, W., B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, W. Mayr, and B. Olaisen.** 1997. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems.

- International Society for Forensic Haemogenetics [editorial]. *International Journal Of Legal Medicine*. **110**(4):175-6.
8. **Bell, G., M. Selby, and W. Rutter.** 1982. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*. **295**(5844):31-35.
 9. **Bellas, S., Soto, J.L., Carracedo, A., Rodriguez-Calvo, M.S.** 1997. Minisatellite variant repeat coding using semiautomatic system. *BioTechniques*. **23**:44-46.
 10. **Binder, K., and D. Heermann.** 1989. *Monte Carlo Methods in Statistical Physics*. Berlin: Springer-Verlag.
 11. **Boerwinkle, E., W. J. Xiong, E. Fourest, and L. Chan.** 1989. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. **86**(1):212-6.
 12. **Britten, R. J., and D. E. Kohne.** 1968. Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science*. **161**(841):529-40.
 13. **Budowle, B., R. Chakraborty, A. M. Giusti, A. J. Eisenberg, and R. C. Allen.** 1991. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *American Journal Of Human Genetics*. **48**(1):137-44.

14. **Budowle, B., J. Lindsey, J. DeCou, B. Koons, A. Giusti, and C. Comey.** 1995. Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, and Gc (PM loci), and HLA-DQ alpha using a multiplex amplification and typing procedure. *J Forensic Sci.* **40**(1):45-54.
15. **Budowle, B., T. Moretti, and M. Keys.** 1997. Validation studies of the CTT STR Multiplex System. *J Forensic Sci.* **42**(2):701-707.
16. **Castro, A.** 1996. Evaluación de los polimorfismos de loci minisatélite y microsatélite en la identificación genética humana. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
17. **Capon, D. J., P. H. Seeburg, J. P. McGrath, J. S. Hayflick, U. Edman, A. D. Levinson, and D. V. Goeddel.** 1983. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature.* **304**(5926):507-13.
18. **Carracedo, A., and F. Barros.** 1996. Problemas bioestadísticos en Genética Forense. Ed. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela.
19. **Chakraborty, R.** 1992. Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Human Biology.* **64**(2):141-59.
20. **Chakraborty, R.** 1991. Statistical interpretation of DNA typing data [letter; comment]. *American Journal Of Human Genetics.* **49**(4):895-7, 899-903.
21. **Chakraborty, R., and K. K. Kidd.** 1991. The utility of DNA typing in forensic work. *Science.* **254**(5039):1735-9.

22. **Chakraborty, R., and Y. Zhong.** 1994. Statistical power of an exact test of Hardy-Weinberg proportions of genotypic data at a multiallelic locus. *Human Heredity*. **44**(1):1-9.
23. **Chakraborty, R., Y. Zhong, L. Jin, and B. Budowle.** 1994. Nondetectability of restriction fragments and independence of DNA fragment sizes within and between loci in RFLP typing of DNA. *American Journal Of Human Genetics*. **55**(2):391-401.
24. **Cheung, V. G., M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati, and G. Childs.** 1999. Making and reading microarrays. *Nature Genetics*. **21**(1 Suppl):15-9.
25. **Clayton, T., J. Whitaker, R. Sparkes, and P. Gill.** 1998. Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci Int*. **91**(1):55-70.
26. **Comey, C., and B. Budowle.** 1991. Validation Studies on the Analysis of the HLA DQ alpha Locus Using the Polymerase Chain Reaction. *J of Forensic Sciences*. **36**(6):1633-1648.
27. **Coyne, V.E., James, M.D., Reid, S.J., Rybicki, E.P.** 1996 *Molecular Biology Techniques Manual*. Third Edition. Ed. Rybicki.
28. **Devlin, B., N. Risch, and K. Roeder.** 1990. No excess of homozygosity at loci used for DNA fingerprinting. *Science*. 249:1416-1420
29. **Devlin, B., N. Risch, and K. Roeder.** 1993. Statistical evaluation of DNA fingerprinting: a critique of the NRC's report [see comments]. *Science*. **259**(5096):748-9, 837.

30. **Dover, G.** 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*. **299**(5879):111-7.
31. **Duggan, D. J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer, and J. M. Trent.** 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics*. **21**(1 Suppl):10-4.
32. **Edwards, A., A. Civitello, H. Hammond, and C. Caskey.** 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*. **49**(4):746-56.
33. **Edwards, A., H. Hammond, L. Jin, C. Caskey, and R. Chakraborty.** 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*. **12**(2):241-53.
34. **Eng, B., P. Ainsworth, and J. Wayne.** 1994. Anomalous migration of PCR products using nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis: the amelogenin sex-typing system. *J Forensic Sci*. **39**(6):1356-9.
35. **Entrala, C., J. A. Lorente, M. Lorente, J. C. Alvarez, B. Budowle, and E. Villanueva.** 1999. Spanish population data on the loci D13S317, D7S820, and D16S539 generated using silver staining (SilverSTR III Multiplex). *Journal Of Forensic Sciences*. **44**(5):1032-4.
36. **Entrala, C., M. Lorente, J. A. Lorente, J. C. Alvarez, T. Moretti, B. Budowle, and E. Villanueva.** 1998. Fluorescent multiplex analysis of nine STR loci: Spanish population data. *Forensic Science International*. **98**(3):179-83.

37. **Epstein, N., O. Nahor, and J. Silver.** 1990. The 3' ends of alu repeats are highly polymorphic. *Nucleic Acids Research*. **18**(15):4634.
38. **Evett, I.W., Weir B.S.**1998. *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for forensic scientists*. Sinaeur Associates. USA.
39. **Fernández, I.** 1998. Polimorfismos de ADN microsatélite y minisatélite en el País Vasco y su aplicación a la identificación genética en delitos de agresión sexual. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
40. **Frégeau, C. J., K. L. Bowen, and R. M. Fourney.** 1999. Validation of highly polymorphic fluorescent multiplex short tandem repeat systems using two generations of DNA sequencers. *Journal Of Forensic Sciences*. **44**(1):133-66.
41. **Fu, Y., A. Pizzuti, and R. Fenwick.** 1992. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science*. **255**(5049):1256-1258.
42. **Fu, Y. H., D. P. Kuhl, A. Pizzuti, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, S. Richards, A. J. Verkerk, J. J. Holden, R. G. J. Fenwick, S. T. Warren, and e. al.** 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*. **67**(6):1047-58.
43. **García-Foncillas, J.** 1998. "Genetic Diagnosis in Medicine". Editores: Armengod, M.E., Echevarría, J.M., Blasband, A. Pamplona (España).
44. **Gamero, J., L. Souto, D. Vieira, M. Vizcaya, M. Arufe, M. Feliu, M. Vide, and J. Romero.** 1998. Population study of the HUMVWA, HUMTH01, HUMFES and

- HUMF13A1 STR polymorphisms in the south-west of Spain. *Progress in Forensic Genetics*. **7**:366-368.
45. **Garofano, L., M. Pizzamiglio, C. Vecchio, G. Lago, T. Floris, G. D'Errico, G. Brembilla, A. Romano, and B. Budowle.** 1998. Italian population data on thirteen short tandem repeat loci: HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMVWFA31, HUMFIBRA, D8S1179, HUMTPOX, HUMCSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, D3S1358. *Forensic Science International*. **97**(1):53-60.
46. **Gehrig, C., M. Hochmeister, U. V. Borer, R. Dirnhofer, and B. Budowle.** 1999. Swiss Caucasian population data for 13 STR loci using AmpFISTR profiler plus and cofiler PCR amplification kits. *Journal Of Forensic Sciences*. **44**(5):1035-8.
47. **Gene, M., E. Huguet, P. Moreno, C. Sanchez, A. Carracedo, and J. Corbella.** 1996. Population study of the STRs HUMTH01 (including a new variant) and HUMVWA31A in Catalonia (northeast Spain). *Int J Legal Med*. **108**(6):318-20.
48. **Gill, P., R. Sparkes, R. Pinchin, T. Clayton, J. Whitaker, and J. Buckleton.** 1998. Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. *Forensic Sci Int*. **91**(1):41-53.
49. **Goellner, G. M., D. Tester, S. Thibodeau, E. Almqvist, Y. P. Goldberg, M. R. Hayden, and C. T. McMurray.** 1997. Different mechanisms underlie DNA instability in Huntington disease and colorectal cancer. *American Journal Of Human Genetics*. **60**(4):879-90.
50. **Guo, S. W., and E. A. Thompson.** 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. **48**(2):361-72.

51. **Hacia, J. G.** 1999. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nature Genetics*. **21**(1 Suppl):42-7.
52. **Hantschel, M., R. Hausmann, T. Lederer, P. Martus, and P. Betz.** 1999. Population genetics of nine short tandem repeat (STR) loci-DNA typing using the AmpFISTR Profiler PCR amplification kit. *International Journal of Legal Medicine*. **112**:393-395.
53. **Hayward, G. S., and M. G. Smith.** 1972. The chromosome of bacteriophage T5. I. Analysis of the single-stranded DNA fragments by agarose gel electrophoresis. *Journal Of Molecular Biology*. **63**(3):383-95.
54. **Hochmeister, M., B. Budowle, J. Jung, U. Borer, C. Comey, and R. Dirnhofer.** 1991. PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *Int J Legal Med*. **104**(4):229-33.
55. **Hopkins, B., N. J. Williams, M. B. Webb, P. G. Debenham, and A. J. Jeffreys.** 1994. The use of minisatellite variant repeat-polymerase chain reaction (MVR-PCR) to determine the source of saliva on a used postage stamp. *Journal Of Forensic Sciences*. **39**(2):526-31.
56. **Horn, G. T., B. Richards, and K. W. Klinger.** 1989. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*. **17**(5):2140.

57. **Huberman, J. A.** 1995. Cell cycle. A licence to replicate [news; comment]. *Nature*. **375**(6530):360-1.
58. **Hudson, T. J., L. D. Stein, S. S. Gerety, J. Ma, A. B. Castle, J. Silva, D. K. Slonim, R. Baptista, L. Kruglyak, S. H. Xu, and e. al.** 1995. An STS-based map of the human genome [see comments]. *Science*. **270**(5244):1945-54.
59. **Huguet E., Carracedo, A., Gené M.** 1988. Introducción a la Investigación Biológica de la Paternidad. Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A. Barcelona.
60. **Jarjoura, D., J. Jamison, and S. Androulakakis.** 1994. Likelihood ratios for deoxyribonucleic acid (DNA) typing in criminal cases. *J Forensic Sci*. **39**(1):64-73.
61. **Jarman, A. P., R. D. Nicholls, D. J. Weatherall, J. B. Clegg, and D. R. Higgs.** 1986. Molecular characterisation of a hypervariable region downstream of the human alpha-globin gene cluster. *Embo Journal*. **5**(8):1857-63.
62. **Jeffreys, A., V. Wilson, and S. Thein.** 1985a. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. **314**(6006):67-73.
63. **Jeffreys, A. J., V. Wilson, and S. L. Thein.** 1985b. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*. **316**(6023):76-9.
64. **Jeffreys, A., A. MacLeod, K. Tamaki, D. Neil, and D. Monckton.** 1991. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing [see comments]. *Nature*. **354**(6350):204-9.

65. **Jeffreys, A. J., D. G. Monckton, K. Tamaki, D. L. Neil, J. A. Armour, A. MacLeod, A. Collick, M. Allen, and M. Jobling.** 1993. Minisatellite variant repeat mapping: application to DNA typing and mutation analysis. *Exs.* **67**:125-39.
66. **Jung, J., C. Comey, D. Baer, and B. Budowle.** 1991. Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ alpha gene. *Int J Legal Med.* **104**(3):145-8.
67. **Kao, F. T.** 1985. Human genome structure. *International Review Of Cytology.* **96**:51-88.
68. **Kasai, K., Y. Nakamura, and R. White.** 1990. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *Journal Of Forensic Sciences.* **35**(5):1196-200.
69. **Kimpton, C., A. Walton, and P. Gill.** 1992. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Human Molecular Genetics.* **1**(4):287.
70. **Kimpton, C., A. Walton, and P. Gill.** 1992. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet.* **1**(4):287.
71. **Kit, S.** 1961. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues. *J Mol Biol.* **3**:711-716.
72. **Krawczack, M. and J.Schmidtke.**1998. "DNA Fingerprinting". 2ªEdición. Ed. BIOS Scientific Publishers Ltd. UK.

73. **Kreike, J., and A. Lehner.** 1995. Sex determination and DNA competition in the analysis of forensic mixed stains by PCR. *Int J Legal Med.* **107**(5):235-8.
74. **Kupferschmid, T. D., T. Calicchio, and B. Budowle.** 1999. Maine Caucasian population DNA database using twelve short tandem repeat loci. *Journal Of Forensic Sciences.* **44**(2):392-5.
75. **Lahermo, P., M. L. Savontaus, P. Sistonen, J. Béres, P. de Knijff, P. Aula, and A. Sajantila.** 1999. Y chromosomal polymorphisms reveal founding lineages in the Finns and the Saami. *European Journal Of Human Genetics.* **7**(4):447-58.
76. **Lareu, M., M. Pestoni, F. Barros, A. Salas, and A. Carracedo.** 1996. Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D12S391 locus. *Gene.* **182**(1-2):151-3.
77. **Li, C.** 1976. First course in population genetics. **Boxwood, Pacific Grove, C.A.**
78. **Li, H., L. Schmidt, M. H. Wei, T. Hustad, M. I. Lerman, B. Zbar, and K. Tory.** 1993. Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352; D3S1358; D3S1359. *Human Molecular Genetics.* **2**(8):1327.
79. **Lorente, M., J. A. Lorente, M. R. Wilson, B. Budowle, and E. Villanueva.** 1993. Composite PAGE: an alternate method for increased separation of amplified short tandem repeat alleles. *International Journal Of Legal Medicine.* **106**(2):69-73.
80. **Lorente, M.** 1994. Polimorfismo del ADN e identificación médico-legal: Estudio

de siete loci (D1S80, D17S5, HUMTH01, HUMVWA, ACTBP2, D21S11 y HLA-DQ-alfa) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

81. **Lorente, J.A., Lorente M**(1995). El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica. Editorial Comares. Granada.
82. **Lorente, M., J. A. Lorente, M. R. Wilson, B. Budowle, and E. Villanueva.** 1997. Spanish population data on seven loci: D1S80, D17S5, HUMTH01, HUMVWA, ACTBP2, D21S11 and HLA-DQA1. *Forensic Science International*. **86**(3):163-71.
83. **Lorente, M., C. Entrala, J. A. Lorente, J. C. Alvarez, E. Villanueva, and B. Budowle.** 1998. Dandruff as a potential source of DNA in forensic casework. *Journal Of Forensic Sciences*. **43**(4):901-2.
84. **Lorente , M., Lorente, J.A., Villanueva, E.** Identificación humana y Medicina Legal: consideraciones éticas y jurídicas. En "La prueba del ADN en Medicina Forense". (1999) Martínez Jarreta, M.B. Editorial Masson. Barcelona.
85. **Martinez Jarreta, B., P. Diaz Roche, and E. Abecia.** 1999. Genetic variation at six STR loci (HUMTH01, HUMTPOX, HUMCSF1PO, HUMF13A01, HUMFES/FPS, HUMVWFA31) in Aragon (north Spain). *Forensic Science International*. **100**(1-2):87-92.
86. **Martínez Jarreta, B.** 1999. "La prueba del ADN en Medicina Forense". Ed. Masson. Barcelona (España).

87. **Metropolis, N., A. Rosenbluth, M. Rosenbluth, A. Teller, and E. Teller.** 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *J Chem Physics*. **21**:1087-1092.
88. **Micka, K., E. Amriott, and T. Hockenberry.** 1999. TWGDAM Validation of nine-locus and a four locus fluorescent STR Multiplex system. *J Forensic Science*. **44**(6):1243-1257.
89. **Micka, K. A., C. J. Sprecher, A. M. Lins, C. Theisen Comey, B. W. Koons, C. Crouse, D. Endean, K. Pirelli, S. B. Lee, N. Duda, M. Ma, and J. W. Schumm.** 1996. Validation of multiplex polymorphic STR amplification sets developed for personal identification applications. *Journal Of Forensic Sciences*. **41**(4):582-90.
90. **Mills, K. A., D. Even, and J. C. Murray.** 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Human Molecular Genetics*. **1**(9):779.
91. **Moller, A., E. Meyer, and B. Brinkmann.** 1994. Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int J Legal Med*. **106**(6):319-23.
92. **Monckton, D. G., R. Neumann, T. Guram, N. Fretwell, K. Tamaki, A. MacLeod, and A. J. Jeffreys.** 1994. Minisatellite mutation rate variation associated with a flanking DNA sequence polymorphism. *Nature Genetics*. **8**(2):162-70.
93. **Mora, J.M.** 1999. La identificación criminal a través de la tecnología del ADN. Tesis

Doctoral. Universidad de Granada.

94. **Moreno Suárez, P., Gené Badía, M** 1999. Fundamentos de la variabilidad genética de las poblaciones humanas. En "La prueba del ADN en Medicina Forense". (1999) Martínez Jarreta, M.B. Editorial Masson. Barcelona.
95. **Morral, N., and X. Estivill.** 1992. Multiplex PCR amplification of three microsatellites within the CFTR gene. *Genomics*. **13**(4):1362-4.
96. **Mullis, K., and F. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-50.
97. **Mullis, K. B.** 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales De Biologie Clinique.* **48**(8):579-82.
98. **Mully, J., A. Gedeon, S. White, E. Haan, and R. Richards.** 1991. Predictive diagnosis of myotonic dystrophy with flanking microsatellite markers. *Journal of Medical Genetics.* **28**:448-452.
92. **Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolf, T. Holm, and M. Culver.** 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science.* **235**:1616-1622.
99. **Neil, D. L., and A. J. Jeffreys.** 1993. Digital DNA typing at a second hypervariable locus by minisatellite variant repeat mapping. *Human Molecular Genetics.* **2**(8):1129-35.

100. **Neuhuber, F., M. Klintschar, and M. Radacher.** 1998. A collaborative genetic study on the STR system FGA in two Austrian population samples. *Forensic Sci Int.* **91(1):1-6.**
101. **Ohno, S.** 1984. Repeats of base oligomers as the primordial coding sequences of the primeval earth and their vestiges in modern genes. *Journal Of Molecular Evolution.* **20(3-4):313-21.**
102. **Oldroyd, N. J., A. J. Urquhart, C. P. Kimpton, E. S. Millican, S. K. Watson, T. Downes, and P. D. Gill.** 1995. A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification. *Electrophoresis.* **16(3):334-7.**
103. **Oste, C.** 1988. Polymerase chain reaction. *Biotechniques.* **6(2):162-7.**
104. **Oudet, C., R. Heilig, A. Hanauer, and J. L. Mandel.** 1991. Nonradioactive assay for new microsatellite polymorphisms at the 5' end of the dystrophin gene, and estimation of intragenic recombination. *American Journal Of Human Genetics.* **49(2):311-9.**
105. **Owerbach, D., and L. Aagaard.** 1984. Analysis of a 1963-bp polymorphic region flanking the human insulin gene. *Gene.* **32(3):475-9.**
106. **Pastinen, T., A. Kurg, A. Metspalu, L. Peltonen, and A. C. Syvänen.** 1997. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Research.* **7(6):606-14.**

107. **Perkin Elmer Corporation.** 1996. GeneScan Analysis Software, P/N 904435.
108. **Perkin Elmer Corporation.** 1996. Genotyper. Applications Tutorials, P/N 904649.
109. **Perkin Elmer Corporation.** 1997. GeneScan Reference Guide, P/N 4303189 rev A.
110. **Perkin Elmer Corporation.** 1998. ABI PRISM™310 Genetic Analyzer User's Manual, P/N 903565 rev B.
111. **Persidis, A.** 1998. Biochips. Nature Biotechnology. **16**(10):981-3.
112. **Plummer, S. J., M. J. Paris, J. Myles, R. Tubbs, J. Crowe, and G. Casey.** 1997. Four regions of allelic imbalance on 17q12-qter associated with high-grade breast tumors. Genes, Chromosomes And Cancer. **20**(4):354-62.
113. **Pouchkarev, V., E. Shved, and P. Novikov.** 1998. Sex determination of forensic samples by polymerase chain reaction of the amelogenin gene and analysis by capillary electrophoresis with polymer matrix. Electrophoresis. **19**(1):76-9.
114. **Promega Corporation.** 1998. GenePrint™ STR Systems Technical Manual, # TMD004.
115. **Proudfoot, N. J., A. Gil, and T. Maniatis.** 1982. The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. Cell. **31**(3 Pt 2):553-63.

116. **Puers, C., H. A. Hammond, L. Jin, C. T. Caskey, and J. W. Schumm.** 1993. Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]_n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *American Journal Of Human Genetics.* **53(4):**953-8.
117. **Rand, S., C. Puers, K. Skowasch, P. Wiegand, B. Budowle, and B. Brinkmann.** 1992. Population genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLP's. *International Journal Of Legal Medicine.* **104(6):**329-33.
118. **Richards, R. I., and G. R. Sutherland.** 1992. Heritable unstable DNA sequences [news]. *Nature Genetics.* **1(1):**7-9.
119. **Rodriguez-Calvo, M. S., S. Bellas, J. L. Soto, F. Barros, and A. Carracedo.** 1996. Comparison of different electrophoretic methods for digital typing of the MS32 (D1S8) locus. *Electrophoresis.* **17(8):**1294-8.
120. **Rodriguez-Calvo, M. S.** 1999. Análisis de la variación interna de los loci minisatélites. Un enfoque digital para el análisis del ADN. En "La prueba del ADN en Medicina Forense". 1999. Martínez Jarreta, M.B. Editorial Masson. Barcelona.
121. **Ruiz-Jiménez Aguilar, J.** 1993. Aspectos legales y prácticos del empleo de la información genética en criminalística y pruebas de paternidad. Utilización de material genético en criminalística y pruebas de paternidad: aspectos éticos y legales. (ISFH): 15-27.
122. **Ross, A., and H. Harding.** 1989. DNA typing and forensic science. *Forensic Sci Int.* **41(3):**197-203.

123. **Saitoh, H., S. Ueda, K. Kurosaki, and M. Kiuchi.** 1998. The different mobility of complementary strands depends on the proportion AC/GT. *Forensic Sci Int.* **91(2):**81-90.
124. **Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatics.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, Second ed, vol. I, II, III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
125. **Schildkraut, C., J. Marmur, and P. Doty.** 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J Mol Biol.* **4:**430-443.
126. **Schmutzler, R. K., A. Homann, E. Bierhoff, O. D. Wiestler, A. von Daimling, and D. Krebs.** 1995. [Detection of genetic alterations in sporadic breast tumors]. *Gynakologisch-Geburtshilfliche Rundschau.* **35 Suppl 1:**63-7.
127. **Sen, D., and W. Gilbert.** 1988. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature.* **334(6180):**364-6.
128. **Sharma, V., and M. Litt.** 1992. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Human Molecular Genetics.* **1(1):**67.
129. **Silva, F., L. Gusmão, C. Alves, R. Seruca, L. David, and A. Amorim.** 1997. Tetra- and pentanucleotide short tandem repeat instability in gastric cancer. *Electrophoresis.* **18(9):**1633-6.

130. **Singer, M.** 1982a. Highly repeated sequences en mammalian genomes. *Int Rev Cytol.* **76**:67-112.
131. **Singer, M.** 1982b. SINE and LINE: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell.* **28**(3):433-434.
132. **Smith, G. P.** 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science.* **191**(4227):528-35.
133. **Smith, J., R. Anwar, J. Riley, D. Jenner, A. Markham, and A. Jeffreys.** 1990. Highly polymorphic minisatellite sequences: allele frequencies and mutation rates for five locus-specific probes in a Caucasian population. *J Forensic Sci Soc.* **30**(1):19-32.
134. **Southern, E. M.** 1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry.* **100**(2):319-23.
135. **Sparkes, R., C. Kimpton, S. Gilbard, P. Carne, J. Andersen, N. Oldroyd, D. Thomas, A. Urquhart, and P. Gill.** 1996. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II), Artefacts, casework studies and success rates. *International Journal Of Legal Medicine.* **109**(4):195-204.
136. **Sparkes, R., C. Kimpton, S. Watson, N. Oldroyd, T. Clayton, L. Barnett, J. Arnold, C. Thompson, R. Hale, J. Chapman, A. Urquhart, and P. Gill.** 1996. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I). Mixtures,

- ageing, degradation and species studies. *International Journal Of Legal Medicine*. **109**(4):186-94
137. **Strachan, T., Andrew, P.R.** 1999. *Genética Molecular Humana*. Ediciones Omega. Barcelona.
138. **Sullivan, K. M., A. Mannucci, C. P. Kimpton, and P. Gill.** 1993. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*. **15**(4):636-8, 640-1.
139. **Tamaki, K., D. G. Monckton, A. MacLeod, D. L. Neil, M. Allen, and A. J. Jeffreys.** 1992. Minisatellite variant repeat (MVR) mapping: analysis of 'null' repeat units at D1S8 [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1992 Oct;1(7):558]. *Human Molecular Genetics*. **1**(6):401-6.
140. **Tamaki, K., X. L. Huang, T. Yamamoto, R. Uchihi, H. Nozawa, and Y. Katsumata.** 1995. Applications of minisatellite variant repeat (MVR) mapping for maternal identification from remains of an infant and placenta. *Journal Of Forensic Sciences*. **40**(4):695-700.
141. **Urquhart, A., C. Kimpton, T. Downes, and P. Gill.** 1994. Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med*. **107**(1):13-20.
142. **Urquhart, A., N. J. Oldroyd, C. P. Kimpton, and P. Gill.** 1995. Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. *Biotechniques*. **18**(1):116-8, 120-1.

143. **Valverde, E.** 1992. Análisis del polimorfismo en los loci minisatélite D2S44, D7S21 y D12S11: Aplicaciones Médico-Legales. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
144. **van Oorschot, R. A., S. J. Gutowski, S. L. Robinson, J. A. Hedley, and I. R. Andrew.** 1996. HUMTH01 validation studies: effect of substrate, environment, and mixtures. *Journal Of Forensic Sciences*. **41**(1):142-5
145. **Vogt, P.** 1990. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved chromatin folding code. *Human Genetics*. **84**(4):301-36.
146. **Vosberg, H. P.** 1989. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Human Genetics*. **83**(1):1-15.
147. **Walker, G. J., J. M. Palmer, M. K. Walters, D. J. Nancarrow, P. G. Parsons, and N. K. Hayward.** 1994. Simple tandem repeat allelic deletions confirm the preferential loss of distal chromosome 6q in melanoma. *International Journal Of Cancer*. **58**(2):203-6.
148. **Walsh, P., D. Metzger, and R. Higuchi.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. **10**(4):506-13.
149. **Waring, M., and R. J. Britten.** 1966. Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. *Science*. **154**(750):791-4.

150. **Weber, J. L.** 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*. **7**(4):524-30.
151. **Weber, B., O. Riess, G. Wolff, S. Andrew, C. Collins, R. Graham, J. Theilmann, and M. R. Hayden.** 1992. Delineation of a 50 kilobase DNA segment containing the recombination site in a sporadic case of Huntington's disease. *Nature Genetics*. **2**(3):216-22.
152. **Weir, B.** 1992. Population genetics in the forensic DNA debate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**(24):11654-9.
153. **Willard, H. F., and J. S. Waye.** 1987. Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *Journal Of Molecular Evolution*. **25**(3):207-14.
154. **Wong, Z., V. Wilson, I. Patel, S. Povey, and A. J. Jeffreys.** 1987. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Annals Of Human Genetics*. **51 (Pt 4)**:269-88.
155. **Wooster, R., A. Cleton-Jansen, N. Collins, J. Mangion, R. Cornelis, C. Cooper, B. Gusterson, B. Ponder, A. von Deimling, O. Wiestler, and a. et.** 1994. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet*. **6**(2):152-6.

156. **Wu, S., S. Seino, and G. I. Bell.** 1990. Human collagen, type II, alpha 1, (COL2A1) gene: VNTR polymorphism detected by gene amplification. *Nucleic Acids Research*. **18**(10):3102.
157. **Wyman, A. R., and R. White.** 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. **77**(11):6754-8.
158. **Yamamoto, T., K. Tamaki, T. Kojima, R. Uchihi, and Y. Katsumata.** 1994. Potential forensic applications of minisatellite variant repeat (MVR) mapping using the polymerase chain reaction (PCR) at D1S8. *Journal Of Forensic Sciences*. **39**(3):743-50.