

**INTRODUCCIÓN A LA  
INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA  
DE LA PATERNIDAD**



# **INTRODUCCIÓN A LA INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA DE LA PATERNIDAD**

**Dr. Emili Huguet Ramia**

Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria  
Departamento de Medicina Legal  
Universidad de Barcelona

**Dr. Ángel Carracedo Álvarez**

Profesor Titular de Toxicología y Legislación Sanitaria  
Departamento de Medicina Legal  
Universidad de Santiago de Compostela

**Dr. Manel Gené Badia**

Profesor Titular de Toxicología y Legislación Sanitaria  
Departamento de Medicina Legal  
Universidad de Barcelona

**PPU  
1988**

Publicaciones del Seminario Pere Mata de la Universidad de Barcelona.

© Emili Huguet Ramia, Ángel Carracedo Álvarez i Manel Gené Badia  
Seminari Pere Mata  
Unitat d'Ensenyament i Recerca de Medicina Legal i Laboral i Toxicologia.  
Departament de Salut Pública i Legislació Sanitària  
Universitat de Barcelona

© PPU  
Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A.  
Marqués de Campo Sagrado, 16  
08015 Barcelona

I.S.B.N.: 84-7665-248-8

D.L.: B-14203-88

Imprime: Limpergraf, S.A. Calle del Río, 17 Nave 3. Ripollet (Barcelona)

INDICE DE MATERIAS

=====

	Página
1.- Introducción Dr. Luis CONCHEIRO.	3
2.- Resumen histórico de la investigación biológica de la paternidad. Dr. Jacint CORBELLÀ.	9
3.- Principales aspectos jurídicos de la investi- gación biológica de la paternidad. Dr. Juan Bautista MARTI LLORET y Dr. Manel GENE.	29
4.- Procedimientos de investigación de la paternidad. Marcadores genético-moleculares. Técnicas de estudio de los diferentes marcadores empleados. Dr. Angel CARRACEDO y M <sup>a</sup> Sol RODRIGUEZ.	39
5.- Aspectos genético-poblacionales. Dr. José Luis B. CAEIRO y Olga CANABAL.	52
6.- El sistema HLA en la investigación de la paternidad. Guadalupe ERCILLA	66
7.- Marcadores genéticos eritrocitarios. Dr. Emili HUGUET y Dr. Manel GENE.	78
8.- Proteínas plasmáticas. Dr. Manel GENE y Dr. Emili HUGUET.	88
9.- Polimorfismos enzimáticos del eritrocito. Dr. Angel CARRACEDO, M <sup>a</sup> Victoria LAREU y Francisco BARROS.	113

10.-	Marcadores genético-moleculares de origen leucocitario. Cristóbal LLANO, Dr. José Luis B. CAEIRO, Olga CANABAL y Susana GARCIA.	142
11.-	Polimorfismo del ADN. Mercè MARCH y Guadalupe ERCILLA.	161
12.-	Parámetros estadísticos en la investigación biológica de la paternidad. Exclusión y prueba positiva de paternidad. Dr. Angel CARRACEDO, Dr. Emili HUGUET y Francisco BARROS.	171
13.-	Protocolos de investigación biológica de la paternidad. Capacitación del personal y homologación de los centros. Líneas actuales de investigación. Dr. Angel CARRACEDO y M <sup>a</sup> Dolores MONTIEL	189
14.-	Valoración médico-legal de la paternidad. Dr. Emili HUGUET, Dr. Angel CARRACEDO y Dr. Manel GENE.	197
15.-	El informe de paternidad. Dr. Manuel RODRIGUEZ PAZOS.	202

## Capítulo 1

---

### INTRODUCCION

---

---

Luis CONCHEIRO

---

La promulgación de la vigente Constitución y la ulterior reforma del Código Civil en materia de filiación, han determinado un creciente interés en España en los ámbitos jurídico y médico-legal, por la investigación biológica de la paternidad, una prueba pericial prácticamente ignorada antes de 1978, salvo en supuestos muy restringidos.

Dicho interés se difunde, también, de un modo progresivo por la sociedad y la demanda de la investigación biológica de la paternidad no es infrecuente en situaciones extrajudiciales.

Sin embargo, este creciente interés no se refleja en un incremento paralelo de esta clase de investigaciones biológicas. El número de pericias en España es sensiblemente inferior al de los restantes países europeos, incluso de aquellos que cultural y sociológicamente nos son más próximos (Italia y Portugal).

Resulta muy difícil precisar las razones de este comportamiento social. En este momento nos interesa resaltar qué otro tipo de condicionantes puede ejercer una influencia negativa sobre la frecuencia de estas pericias. En este sentido considero que un cierto grado de desconocimiento por parte de los profesionales del Derecho e incluso de bastantes médicos, de los enormes progresos que se han logrado en esta vertiente aplicada de la Biología, pueden jugar un papel significativo.

La transmisión hereditaria de diversas características personales es una idea ancestral en el hombre, pero su utilización científica con la finalidad expuesta con anterioridad es relativamente reciente. De hecho, han sido el descubrimiento de los primeros grupos sanguíneos por Landsteiner en 1901 y la posterior comprobación por von Dungern y Hirschfeld (1909-1910) de su transmisión hereditaria, los primeros pasos en este camino.

En principio, cualquier característica hereditaria puede ser utilizada para la investigación biológica de la paternidad (1). En un bello pasaje literario, hace ya más de un siglo, Guy de Maupassant (2) escribía: "No puede figurarse usted la sensación extraña, confusa e intolerable que experimento frente a él, al pensar que ha salido de mi, que está unido a mi por ese lazo íntimo que liga al hijo con el padre, que, gracias a las terribles leyes de la herencia, es otro yo por mil cosas, por su sangre y por su carne, y que tiene incluso los mismos gérmenes de enfermedades, los mismos fermentos de pasiones".

Sin embargo, el rigor que debe presidir toda actuación pericial exige la selección de aquellas características o rasgos hereditarios que ofrezcan la suficiente garantía para ser aplicados con eficacia y seguridad en este campo.

En el XXX Congreso Internacional de Medicina Legal y Social de lengua francesa en 1965, Moureau, Brocteur y André (3), ya señalaron las condiciones que debe reunir un carácter o rasgo hereditario para ser utilizable con esta finalidad.

El carácter hereditario debe ser, en primer lugar, objetivo. Esto es, no requerir la colaboración activa de las personas examinadas para su comprobación. De otro modo se introduce un elemento de incertidumbre que sin duda menoscaba la fiabilidad de la pericia.

El carácter hereditario debe ser discontinuo, es decir, que permita distribuir a los individuos en grupos o clases perfectamente diferenciados.

La influencia de factores exógenos sobre el carácter determinado genéticamente debe ser nula, de tal forma que no se generen diferencias individuales con respecto a ese rasgo, atribuibles, por ejemplo, al clima o a la alimentación.

La penetrancia y la expresividad deben de ser otras características a considerar. La penetrancia se refiere a la capacidad del gen responsable de un carácter para expresarse. La expresividad es la intensidad con que se expresa un determinado gen penetrante (4). Parece claro que en el caso de un gen con penetrancia incompleta, esto es, que no todos los individuos portadores del mismo en su genotipo (5) lo manifiesten en su fenotipo (6), o que se exprese tan escasamente en el fenotipo que no pueda ser detectado, el carácter que determina no resulte adecuado para la investigación biológica de la paternidad.



Los caracteres a estudiar deben estar controlados por un par de genes y no ser rasgos poliméricos, es decir, dependientes de una serie de genes localizados en loci diferentes (7). Este hecho haría prácticamente imposibles deducciones seguras en las investigaciones de paternidad, en las que se requiere una valoración locus a locus y sobre la base del principio de que de los dos alelos (5) que posee el niño, uno procede de su madre y el otro de su padre biológico.

Los conceptos de dominancia y recesividad (9) no poseen una significación particular desde el punto de vista que estamos considerando. No obstante, cuando los genes son codominantes resulta muy sencillo determinar con toda precisión el genotipo a partir del fenotipo.

Los genes de los caracteres que se estudien deben poseer una frecuencia génica adecuada y en equilibrio en la población. La significación de este hecho será destacada en el capítulo de la exclusión y diagnóstico positivo de la paternidad. Asimismo, será considerado con más detalle en el referente a la genética de poblaciones.

La expresión en función de la edad puede condicionar la utilización de un determinado carácter en la investigación de la paternidad. Así, la corea de Huntington es una enfermedad hereditaria dominante que no se manifiesta clínicamente hasta después de los treinta años. Por ello, resulta evidente que no sería utilizable, en la investigación biológica de la paternidad, por el plazo necesario para que la enfermedad se manifieste.

Por último, resulta imprescindible que el estudio del carácter hereditario no suponga el menor riesgo para los implicados. Si así fuese, parece obvio que por imperativos éticos y legales no sería posible realizar la investigación.

Si confrontamos todas estas exigencias con los llamados marcadores genético-moleculares -antígenos eritrocitarios, proteínas séricas, enzimas y antígenos de histocompatibilidad (HLA)-, vemos que cumplen plenamente los requisitos señalados. En efecto, como señalan Moureau, Brocteur y André (3), se trata de características hereditarias objetivas, discontinuas, no influenciadas por causas no genéticas, mendelianas simples, de expresividad y penetrancia casi totales, cuyas frecuencias génicas son frecuentemente favorables, presentes la mayoría en el recién nacido y que no exigen para su estudio nada más que una pequeña muestra de sangre.

Existen, ciertamente, como se describe en un capítulo posterior, otros procedimientos para la investigación biológica de la paternidad sin fundamentación genética. Son los llamados métodos orientativos o de empleo ocasional (elementos de juicio de orden obstétrico y la esterilidad varonil). No obstante, su utilización en la práctica, es excepcional.

En un análisis retrospectivo de los procedimientos que han sido empleados para la investigación biológica de la paternidad se pueden establecer, hasta el momento, tres niveles metodológicos.

El nivel morfológico, sobre el que se ha asentado la investigación antropológica física. Hoy en día la utilización de estas técnicas está muy restringida incluso en países en los que alcanzó la Antropología Física un notable desarrollo.

El nivel citogenético, representado por el análisis estructural de los cromosomas. Técnicas con una cierta vigencia, pero con evidentes limitaciones; mucho más complejas y costosas que otras de mayor rendimiento.

El estudio de los productos de expresión génica, los llamados marcadores genético-moleculares, constituye sin duda, por las razones apuntadas, el procedimiento de elección. Especialmente los marcadores genético-moleculares sanguíneos. Los salivares son también útiles. No obstante, teniendo en cuenta el rendimiento de los primeros, rara vez se recurre a estos últimos por dificultades técnicas.

En un próximo futuro podrá establecerse un cuarto nivel, el génico o molecular. Las técnicas de secuenciación de DNA (ácido desoxirribonucleico), representarán, sin duda alguna, un hito fundamental en la investigación de la paternidad (10).

Investigación biológica de la paternidad que, como se detallará más ampliamente en otro capítulo, no cabe circunscribir tan solo a la cuestión de la exclusión de la paternidad sino que puede y debe ampliarse a la prueba o diagnóstico positivo de la misma cuando la exclusión no se logre de un modo concluyente.

## NOTAS Y BIBLIOGRAFIA

-----

- 1.- Aún cuando se utiliza habitualmente la expresión de investigación biológica de la paternidad, es perfectamente conocido que no siempre el progenitor masculino es el cuestionado. La investigación de la maternidad o la identificación de ambos progenitores (conflictos en maternidades) son, sin embargo, situaciones excepcionales.
- 2.- Guy de Maupassant. Un fils (1882). Contes et Nouvelles (Le massacre des innocents). Ed. Albin Michel. Paris. 1964. Pág. 324.
- 3.- P. Moureau, J. Brocteur, A. André. Les possibilités et les limitations actuelles de l'expertise médico-légale dans l'investigation de paternité. Actes XXXème Congrès International de Médecine Légale et Sociale de Langue Française. Coimbra, 1965.
- 4.- J. Blanco y M. Bullón. Cuadernos de genética. Marbán. Madrid. 1987.
- 5.- El genotipo está constituido por la dotación genética del individuo. En algunos casos el genotipo no puede ser determinado con precisión, pues hay genes silentes o amorfos, esto es, que no producen ningún producto detectable. Así un individuo que pertenece al grupo sanguíneo A, su genotipo puede ser AA ó AO. Cuál de los dos genotipos es el que está en causa no puede establecerse, ya que el gen O es amorfo y no origina ningún producto.
- 6.- El fenotipo se refiere a la característica directamente observable (color de los ojos) o detectable (grupo sanguíneo A ó O). Cuando los genes son codominantes ambos se expresan en el fenotipo y en este caso existe una correspondencia estricta entre genotipo y fenotipo (individuo fenotípicamente MN, genotípicamente también es MN; en este caso los genes o alelos M y N son codominantes).
- 7.- Loci es el plural de locus. Con este nombre se designa el lugar que ocupa un determinado gen en el cromosoma. Hoy se conoce la situación del locus de un determinado marcador genético-molecular en un cromosoma. Así, el locus del sistema Rh se sitúa en el cromosoma número 1. Cada

característica hereditaria, que se transmite por herencia mendeliana simple, está regulada por dos genes situados en los loci de una pareja de cromosomas homólogos, uno procedente del padre y otro de la madre. Estos de nuevo se separarán en las células sexuales del portador para ser transmitidos a la descendencia aisladamente.

- 8.- Los alelos son las diferentes formas alternativas de un gen. Una parte de los sistemas de marcadores genético-moleculares utilizados en la investigación biológica de la paternidad son bialélicos, así por ejemplo el sistema Kidd tiene dos alelos. Otros son multialélicos, como la proteína alfa-1-antitripsina que posee cincuenta alelos. En todo caso, cada individuo definirá el carácter en estudio tan sólo por dos alelos, de entre todos los posibles.
- 9.- En relación con estos términos conviene precisar antes los conceptos homocigoto y heterocigoto. El primero se refiere a aquellos individuos cuyos dos alelos en loci homólogos son idénticos (individuo AA), mientras que heterocigotos serán aquellos en los que la pareja de alelos es distinta (individuo AO). Pues bien, los genes que se manifiestan tanto en estado homocigótico como heterocigótico serán dominantes y los que se manifiesten sólo en estado homocigótico recesivos. Cuando ambos se expresan en estado heterocigótico hablamos de codominancia (véase también nota 6).
- 10.- El DNA representa el esencial sustrato bioquímico de la herencia. Constituye parte de los cromosomas y los genes se identifican actualmente con fragmentos de dicha molécula. La secuenciación del DNA ya ha sido aplicada en Criminalística Médico-Legal (delitos de violación) y para establecer una relación familiar (inmigración ilegal).

## Capítulo 2

---

### NOTAS HISTORICAS SOBRE LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

---

---

Jacinto CORBELLA

---

#### I. INTRODUCCION

---

El problema de la investigación de la paternidad ha tenido un interés considerable a lo largo de la historia, aunque se ha movido dentro de campos bastante distintos. En realidad ha existido una preocupación social importante, aunque la base científica era mínima. Así podemos distinguir tres grandes enfoques que delimitan, superponiéndose, algunas etapas:

.. el enfoque social basado principalmente en la trascendencia de la legitimidad o ilegitimidad.

.. el enfoque jurídico adoptando normas a menudo extremadamente protectoras de la familia.

.. el enfoque biológico basado en la aportación de pruebas científicas, suficientes para resolver el problema.

La cuestión ha afectado en realidad a toda la población, pero el interés de su estudio se ha centrado principalmente en los sectores que han tenido un mayor poder social. O sea aquellos en que una herencia biológica desviada de la línea que jurídica y socialmente era correcta -- y sobre todo el reconocimiento de esta desviación --- podía acarrear consecuencias graves en los aspectos económico o político (herencias de títulos, coronas, etc.). En cambio en sectores sociales menos protegidos, aunque el problema biológico era el mismo, su repercusión fué mucho menor.

El hecho de la filiación "ilegal" ha sido bien conocido desde antiguo y valorado de modo muy distinto según el medio histórico y social en que se daba; según las conveniencias y la situación de los implicados. Ha tenido básicamente los siguientes enfoques: a) aceptación y reconocimiento de la filiación ilegítima; b) castigo en forma de rechazo social, o más complejo; c) ignorancia, probablemente en la mayor parte de casos.

En ocasiones ha sido preciso probar esta filiación o paternidad. En épocas antiguas existía prácticamente un medio casi único, el reconocimiento, lo que daba la llave de la situación al progenitor que solía actuar según su conveniencia. Dado que el hecho de la ilegitimidad era valorado negativamente en muchas sociedades -- así en nuestro occidente de raíz cultural cristiana -- el problema se planteaba de manera muy esporádica y casi siempre sólo en altos niveles sociales: reconocimiento de bastardos por altos personajes y poco más.

Con el tiempo se fueron arbitrando algunas normas jurídicas relativamente precisas. La posibilidad de solución real del problema quedaba limitada y no excluía en último caso la posibilidad de error. Sólo muy tardíamente, por medio del aporte de pruebas con base científica de carácter biológico, se ha intentado llegar a un sistema objetivo de determinación de la paternidad. Este ha pasado por dos grandes etapas, avizorándose una tercera en un futuro relativamente cercano.

La primera etapa se ha basado en la utilización de pruebas o criterios biológicos de certeza dudosa en sus resultados. La segunda, ya bien entrado este siglo, se ha basado en el estudio de los datos aportados por el estudio de la herencia de grupos detectados en la sangre. Ello ha facilitado el amplio desarrollo actual de la Hemogenética Forense. La etapa siguiente, ya inmediata, se basará en el estudio directo del material genético (DNA).

En el esquema cronológico de esta evolución histórica podemos considerar, a grandes rasgos, las siguientes etapas:

1. Interés únicamente social y jurídico, prácticamente sin aportaciones desde el campo biológico (antigüedad hasta el fin de la edad media).
2. Inicio de las aportaciones de interés médico que coexisten con las de los otros campos (siglos XVI - XIX).
3. Inicio de aportaciones concretas de la heredobiología desde un punto de vista científico (primera mitad del siglo XX).
4. Desarrollo de la Hemogenética Forense (época contemporánea).

## II. ALGUNOS DATOS DE LA ANTIGÜEDAD

---

En la antigüedad no existían prácticamente pruebas biológicas ni se intuía este posible grado de exactitud en la determinación de la paternidad más allá de un aleatorio parecido físico. Las referencias, sin ser escasas, son de hecho siempre marginales cuando no legendarias. Se las encuentra sobre todo en el campo de la literatura y la mitología. Su interés real según nuestra visión actual es reducido.

Desde el punto de vista estrictamente biológico los datos eran mínimos. Aparte la imposibilidad física de relación conyugal quedaba el recurso a valorar el parecido familiar y poco más. La semejanza fisiognómica pudo provocar situaciones conflictivas o molestas sobre todo en adultos. De hecho se planteaba un problema de identidad, que quedaba a menudo lejos del de la paternidad. En algunos textos de medicina legal antiguos se mencionaban casos de confusión intencionada, o involuntaria, por razones fisiognómicas. Así Mata relata el caso de Leodicea quien asesinó a su esposo Antioco, rey de Siria, poniendo después en el lecho a Antinor, parecido al rey. El mismo Mata relata casos de su propia época, la primera mitad del siglo XIX, con confusión de parecido de un caballero barcelonés en Mallorca. (1)

En la etapa histórica, heterogénea y larga, anterior a nuestra era, encontramos algunos datos, ninguno de ellos decisivo, en fuentes de diverso origen.

Quizá la aportación jurídica de mayor peso en este campo se encuentra en la legislación babilónica. En uno de los textos más importantes de la legislación de la antigüedad clásica, el Código de Hammurabi, encontramos datos de un considerable interés. Data probablemente del siglo XVIII a.C. La estela de diorita negra se conserva en el museo del Louvre. Consta de 282 artículos, por lo común breves y concisos. (2) Encontramos algunas referencias indirectas al tema que nos ocupa. Destaca sobre todo el rigor con que es prohibida y castigada la misma investigación de la paternidad. Es una actitud que tendrá una larga vigencia.

El simple hecho de la duda sobre la paternidad, en el caso de los hijos adoptivos, a partir de un cierto nivel social, ya es sancionado gravemente.

Así se dice:

S.192: "Si el hijo (adoptivo) de un favorito o el hijo (adoptivo) de una hieródula ha dicho a su padre, que le ha criado, o a su madre, que le ha criado, "tu no eres mi padre" "tu no eres mi madre", se le cortará la lengua"

S.193: "Si el hijo... .. ha identificado su casa paterna y llega a odiar al padre que le ha criado, o a la madre que le ha criado, y se marcha a su casa paterna, le sacarán su ojo".(3)

También se establecen diferencias legales entre los hijos de padres desconocidos y aquellos cuyo origen es conocido (p.58). (4)

Fuentes mejor conocidas, englobadas a menudo en la leyenda, las hallamos en la Biblia o en la antigua literatura griega. Aquí haremos sólo breve referencia a hechos que son bien conocidos en nuestra tradición cultural. El juicio de filiación que ha tenido, sin ninguna duda, una mayor resonancia histórica es el de Salomón resolviendo un problema de maternidad disputada. Aunque se trata en este caso de decidir quien era la madre, el problema de filiación es el mismo. Aquí se utilizaron criterios psicológicos, en consonancia con la fama del rey sabio.

Otras veces la técnica es la pura indagación de las circunstancias que rodearon el nacimiento o el abandono de algún recién nacido que sobrevivió. Así lo vemos en tradiciones antiguas griegas y romanas. Entre los ejemplos de mayor resonancia debemos recordar el drama de Edipo ignorante de quienes eran sus padres verdaderos, quien dió origen a uno de los mayores mitos de la literatura clásica.

Igualmente, en la antigua tradición romana, tenemos algún ejemplo de determinación de la filiación mediante la técnica indagatoria de las circunstancias del nacimiento. Este es el caso del conocimiento por Numa Pompilio, rey de Alba Longa del verdadero origen de Rómulo y Remo sus nietos.

--- -- -- -- --

En el Derecho medieval el problema dista de ser sencillo. Espigaremos algunas referencias aportadas al campo médico legal principalmente por Simonin en una revisión breve de la cuestión.

Así señala que en la Edad Media, en Francia, "se observa que en esta época el bastardo, fuera de la sociedad, estaba a cargo de las parroquias, éstas



buscaban el padre para liberarse invocando el principio "el que hace al niño tiene que alimentarlo" (5). Recuerda que en el antiguo derecho francés se admitían diversos tipos de pruebas: conjeturales, testimoniales y hasta naturales y de hecho el juez tenía en la práctica poderes extensísimos para resolver el caso. En el derecho germánico se reconoce al niño el derecho a ser alimentado, durante dieciseis años por el que lo ha procreado. Es el que se denomina sistema de la "paternidad alimentaria" (6).

En el derecho medieval español existen algunas referencias de interés. El texto legal más importante es el Código de las Siete Partidas, que data del siglo XIII. Allí encontramos ya una alusión concreta a la duración del embarazo (7) "Quanto tiempo puede traer la muger preñada la criatura en el vientre segund ley e segund natura". Se establecen como plazos legales los de siete (un día del seteno mes) y diez meses. En esto sigue la opinión de Hipócrates y por tanto de toda la literatura médica anterior. En otra parte (8) se fija el plazo de un año para contraer la viuda nuevo matrimonio.

También hallamos algunas referencias en otros textos. Así en el Fuero Real Alfonsino del siglo XIII relativas al hijo póstumo (9). Asimismo en algunos fueros municipales. En el de Zorita de los Canes se apunta una solución al problema del reconocimiento de la paternidad. Cuando hay duda, por manifestación dispar de la mujer embarazada y el varón a quien se atribuye, se soluciona mediante el fuego, la prueba del hierro caliente aplicada a la mujer. El resultado es claro: si se quema miente y en caso contrario dice verdad (ley 264) (10). También en los fueros de Cuenca e Iznatoraf se encuentran descripciones análogas. Las leyes de Toro se ocupan, igualmente, de algunos de estos aspectos (11).

### III - INICIO DE LAS APORTACIONES MÉDICAS

---

En la época moderna de la medicina, a partir del Renacimiento, encontramos ya algunas referencias, en textos médicos.

Son pocas, pero intentan aportar soluciones. Los criterios que se utilizan son los posibles dados los conocimientos de cada etapa. Quizá el más importante es el relativo a la duración de la gestación, extremo sobre el que ya existían normas jurídicas desde mucho antes.

Más allá de este hecho, evidentemente biológico pero comprobado según criterios jurídicos, se plantea el estudio de la herencia de ciertos caracteres físicos (parecido, color del pelo, algún defecto, etc.). También dió lugar a una cierta literatura el tema de la superfetación que evidentemente podía tener repercusiones en nuestro campo. Más allá se valoraron las circunstancias fisiológicas o patológicas del posible padre (edad, impotencia, etc.). En algunos casos históricamente relevantes la crítica o maledicencia social o políticas suplían de hecho la falta de pruebas biológicas de certeza.

En la literatura médico legal española de esta etapa se hallan algunas referencias. Quizá las de mayor interés sean las de Fragoso, en un texto importante y poco conocido (12). Plantea diversos problemas. Así la "Declaración acerca de una muger que dixo estar preñada y ser su marido impotente" o bien el caso: "si parida una muger a los onze meses de su preñez se le ha de declarar si fué legítimo el parto" (13). Otros autores que se ocuparon en parte del tema son entre los mejor conocidos el jurista Alonso Carranza y el teólogo fray Antonio José Rodríguez (14). Prácticamente siempre se utilizan los criterios de tipo cronológico, o sea el tiempo de duración del embarazo.

En todas las épocas ha sido difícil conocer la frecuencia real de la ilegitimidad, en particular la intramatrimonial. Un caso extremo sería el del hijo no sólo no reconocido sino no aceptado. Una cierta aproximación al tema podemos encontrarla en las inscripciones de los hijos no reconocidos. En estudios recientes en archivos parroquiales catalanes se ha profundizado en el conocimiento de los llamados "venturers" o hijos de la ventura, esto es los hijos sin padres reconocidos. Las aportaciones de Daniel Montañá en Terrassa en los siglos XVII y XVIII y de Manuel Escudé en Sitges en el siglo XVIII, nos dan tasas relativamente variables, de alrededor del 1% de inscripciones, con oscilaciones entre 0.5 y 1.5% (15). En el caso de la parroquia de San Juan de Lérida, estudiada por Camps y Camps (16), las cifras son mucho mayores. Prácticamente nunca son inferiores 5% del total de inscritos y en largos períodos no bajan del 10% en el siglo XVII.

Referencias claras a peritaciones en casos de disputa de paternidad basadas en conocimientos u opiniones médicas, se encuentran ya en la obra de Paolo Zacchia y son recogidas por Mata. La cuestión se plantea para resolver un problema hasta cierto punto infrecuente, pero que es citado, no de manera excepcional, en la literatura médico legal antigua. En

la consulta número 76 se plantea el caso de una mujer, Laura, esposa de Nicolás, quien habiendo enviudado parió a los 8 meses un niño mal conformado y dos meses más tarde dió a luz otro bien constituido que vivió. Mata que recoge el caso, señala que el informe de Zacchia "salvó el honor de Laura" (17). El mismo Mata recoge otros dos casos de Zacchia. En el primero, ocurrido durante la peste de Nápoles, Jerónima, mujer joven, viuda de un varón de 40 años, dió a luz un niño a los 273 días de enviudar. Zacchia imputa la paternidad en este caso a Aniello, el amante. En otro caso se discutía la paternidad entre un marido de 72 años y un joven pelirrojo de 24. Los dos hijos eran pelirrojos (18).

Mata alude también a otros casos de superfetación aportando datos abundantes de la literatura médica de su tiempo, tanto en favor como con opiniones contrarias, en una relación bastante larga. (19) Quizá el caso más llamativo es el relatado por Norton, de una mujer, Mary Johnson, la cual tuvo dos hijos, uno negro y otro mulato en el espacio de 24 horas. Alude también, sin que en tales casos se susciten cuestiones de paternidad, a casos de superfetación conocidos en Madrid en su tiempo.

Otros problemas pueden plantearse en el caso de la viuda que da a luz, con o sin matrimonio ulterior, en fecha que suscita dudas en relación con la de la muerte del marido. Así menciona el caso de la mujer que casa a los 20 días de enviudar y da a luz un hijo a los 8 meses. El segundo marido atribuía la paternidad al fallecido. Los jurisconsultos no estuvieron de acuerdo e incluso algunos atribuían una doble paternidad al hijo (20).

También Casper, otro de los autores clásicos de la medicina legal, aporta datos que son bien recogidos por Hoffmann. Así el caso de una mujer de 30 años casada con un varón de 72. Tras cuatro años de matrimonio estéril el marido enferma y muere a las seis semanas. La mujer da a luz un hijo varón a los 317 días de enviudar, pretendiendo que fuera considerado legítimo (21).

Hoffmann ya menciona, como factores a tener en cuenta para el informe médico legal "las condiciones del órgano genital como causa de impotencia para realizar el coito" (22). Vemos pues que siguen usándose criterios de probabilidad muy relativa.

Aunque las posibilidades técnicas, basadas en conocimientos biológicos, para resolver el problema eran escasas, con alguna frecuencia se plantearon cuestiones judiciales y la literatura médico legal recogió

ocasionalmente esta preocupación. Aquí recibimos sobre todo la influencia francesa. Así recordemos un trabajo de André Fournier "De la recherche de la paternité dans la législation de l'Etat de New York", opúsculo de 35 páginas publicado en Poitiers en 1896 (23). Igualmente poco más tarde Félix Dupré La Tour presentó en París, en 1900, una tesis de la facultad de Derecho, sobre la valoración jurídica de la investigación de la paternidad en algunos países europeos (24).

Considerando las normas jurídicas los puntos de vista variaron con criterios de lugar y tiempo. La legislación francesa es la que influye de manera más decisiva en los dos últimos siglos, en las normas jurídicas españolas. En este sentido, aunque ha sido mencionado muchas veces, no podemos dejar de recordar el Código de Napoleón de 1804, sobre todo el artículo 340, que tiene un sentido fuertemente proteccionista de la familia. Este artículo fue reformado en Francia por la Ley de 16 de noviembre de 1912 (25).

En esta vertiente jurídica de la cuestión debemos recordar como hitos importantes, la peritación realizada por Schiff en 1926, utilizando ya los grupos sanguíneos, para dilucidar un caso de paternidad y la sentencia del tribunal de Koln de 1938, aceptando estas pruebas (26).

#### IV - APORTACIONES DE LA HEREDOBIOLOGIA

---

Ya entrado el siglo actual los métodos basados en datos biológicos han alcanzado un mayor desarrollo y se han conocido mejor los datos basados en la duración del embarazo, el grado de desarrollo fetal, y otros aspectos no ligados directamente a la herencia sino a las circunstancias en que se ha iniciado la gestación.

El estudio de la transmisión de caracteres ha dado lugar al desarrollo de la "heredobiología", de interés quizá mayor en el campo estrictamente antropológico que médico legal.

Este campo se había desarrollado bastante aunque con un considerable grado de incertidumbre y ha sido, en el aspecto médico legal concreto, sustituido casi por completo por el estudio de un tipo determinado de caracteres, los ligados a los grupos sanguíneos. Sin embargo entre ellos debemos recordar algunas aportaciones:

K. Kuhne, de formación inicialmente antropológica, estudió algunas variaciones en la disposición anatómica de la columna vertebral, sobre todo las que denomina desviaciones craneal y caudal. Intentó explicar los mecanismos hereditarios. Sus ideas alcanzaron un cierto predicamento. Algunos dictámenes fueron aceptados por tribunales alemanes. La comprobación de algún error hizo perder confianza en el método que hoy ya no se utiliza (27). El estudio de los dermatoglifos, sobre todo la herencia de la disposición de las rayas de las manos ha sido estudiada entre nosotros por Pons y Rosell (28), quien ha descrito además el posible mecanismo hereditario que sería bastante complejo.

La herencia de algunos caracteres concretos, como la capacidad o no de percibir el sabor amargo, así como el estudio de la herencia de algunos caracteres patológicos (algunas hemoglobinopatías entre los mejor estudiados), ha contribuido a enriquecer este campo (29).

Pero el progreso realmente importante, decisivo, -- que ha dado un giro al prestigio biológico de este estudio entre juristas -- ha llegado solamente cuando se han utilizado técnicas que otorgan márgenes suficientes, aceptables, de seguridad en los resultados, que eliminaran al máximo la incertidumbre.

Tales técnicas han llegado con la introducción del estudio de los llamados "grupos sanguíneos", sobre todo a medida que se han conocido sus condiciones hereditarias, sus tasas de frecuencia en la población, y la progresiva complejidad y riqueza de dichos grupos.

En el año 1900 Karl Landsteiner describe, por primera vez, la existencia de diversos tipos o grupos de sangre, en relación con sus propiedades antigénicas. Así se introduce el primero, más importante, y por hoy mejor conocido de los sistemas, el ABO. Quedó claro que existían sangres con propiedades distintas que podían reunirse en cuatro grandes grupos, de desigual reparto entre la población. Esto tuvo importancia práctica sobre todo de cara a las transfusiones y a la valoración de la distribución de frecuencias con un sentido primordialmente antropológico.

## V - APORTACIONES ESPAÑOLAS DE ANTROPOLOGOS Y HEMATOLOGOS

---

Una de las líneas más precisas, en los estudios que abocan a definir y aclarar cuestiones de paternidad la encontramos en los trabajos sobre la herencia. Así podemos encontrar un conjunto fértil de

aportaciones por parte de quienes estudian los aspectos descriptivos y hereditarios de algunos caracteres concretos. En este sentido debemos destacar los estudios, relativamente abundantes de los antropólogos. Se trata de series largas de trabajos, de un considerable nivel, en muchas áreas geográficas. Haremos algunas referencias breves, y forzosamente parciales, a las aportaciones de los antropólogos españoles. Y en el campo concreto de los grupos sanguíneos la colaboración importante de algunos hematólogos. Es pues de un campo con aportaciones mixtas.

En Cataluña entre los primeros trabajos, en este sentido antropológico, que conocemos, debemos mencionar los de Grífols (Barcelona, 1929), con 641 determinaciones; Armengol y Martínez Ribera (1930), con 700 determinaciones, y la revisión de M. Miserachs (1934), con 1000 determinaciones. Del resumen de estas 2341 determinaciones se refieren las siguientes frecuencias, grupo O: 41.0% ; grupo A: 49.6% ; grupo B: 7.3% ; grupo AB: 1.7% . Martínez Piñero en un estudio de 3049 determinaciones en población española halló resultados comparables (1932) (30).

Entre estas aportaciones iniciales debemos recordar también las de L. Hoyos Sáinz (1932, 1944, 1945). (31)

Recordemos también los datos que se encuentran en el trabajo de Boyd (1937). (32). Pero es hacia el fin de la década de los cuarenta, y a lo largo de toda la de los cincuenta, esto es a caballo de la mitad del siglo, cuando el número de aportaciones se hace mayor. También aquí en las dos vertientes, la antropológica y la hematológica; y lejos, evidentemente, de una de sus consecuencias, la investigación de la paternidad. (33)

Recordemos entre estos trabajos, en cita forzosamente parcial, algunas aportaciones:

.. las de Agostí (1946) y Carrión (1951) sobre los grupos MN y de Agostí (1950), referida a los sistemas ABO, MN y Rh, en Galicia. (34)

.. la de Alcobé (1945) en el Sáhara occidental. (35)

.. las de Grífols (1952, 1954) sobre el grupo Rh y los sistemas Kell, Duffy y P en Barcelona. (36)

.. Las de Guasch (1948 y sigs.) principalmente sobre el sistema Rh. (37)

.. Las numerosas de Pilar Hors (1951) con estudios serológicos de grupos marginados: agotes, vaqueiros de Alzada, maragatos, y en Galicia y León. (38)

.. Las de Mata de la Campa (1949, tesis y sigs.). (39)

.. Las de Elósegui (1950) en población vasca, y posteriormente (1951), estudiando los sistemas Rh, Kell y Duffy. (40)

.. La de Diaz de Yraola, (1951) en población andaluza. (41)

.. el trabajo de Miserachs, estudiando el grupo Rh en Cataluña (1950). (42)

.. el de Parrilla Hermida en Galicia (1953). (43)

.. Un trabajo importante de Race, con varios colaboradores catalanes. (44)

.. las aportaciones de Pons Rosell y su grupo de colaboradores, con temática diversa, desde la distribución de la sensibilidad a la feniltiurea (1955) (45), las relaciones entre dibujos papilares y grupos hemáticos en población de Guinea (1957) (46) y algunos de sus aspectos hereditarios (1959).

.. La distribución de grupos en Población asturiana (1964), o la de las haptoglobinas en Canarias (1968). (47)

.. son asimismo importantes las aportaciones del grupo de J. Planas sobre haptoglobinas (Castilla, 1965; Asturias, 1968); sobre distribución grupal en Canarias (1969) o aspectos más generales (1966). (48)

.. también la Tesis de A. Valls sobre la feniltiocarbazona (MADRID; 1958). (49)

.. La población vasca ha sido estudiada además por Boyd (1937); Chalmers (1948); Alberi (1957); Goti (1965). (50)

... Ruffié y Ducos han estudiado la población pirenaica (1954, 1958). (51) Han figurado además entre los primeros autores que han publicado sobre trascendencia médico legal de la investigación de grupos en manchas en la prensa médica española. (52)

En este período si bien los estudios hematológicos en el campo médico legal se referían sobre todo al diagnóstico de las manchas de sangre, existe ya una cierta orientación para la solución --- en nuestro

país sólo teórica, dadas las limitaciones legislativas --- del problema de la paternidad. Así en el manual de antropología de Jose Pérez de Barradas (1946), se menciona ya esta cuestión y se ofrecen cuadros en los que se incluyen los sistemas ABO (con los subgrupos A1 y A2) y MN. (53)

## VI - EL AUGE DE LA HEMOGENÉTICA FORENSE

---

Una buena sistematización de los trabajos de hematología forense -- inicialmente en el campo de las manchas de sangre -- ha sido realizada por Prokop. (54)

Vemos aquí, en esquema breve, un resumen de las principales aportaciones.

Entre los primeros estudios formulados sobre la herencia de los grupos del sistema ABO deben citarse los de HIRSFELD y VON DUNGERN en 1928 entre profesores de Heidelberg y sus familiares.

Recordemos que estos autores tuvieron un papel decisivo en la introducción de la nomenclatura actualmente aceptada para este sistema y que Ludwik Hirszfeld había iniciado ya sus estudios de herencia en perros.

La interpretación de los datos requería dos grandes tipos de apoyo: de un lado el conocimiento de las circunstancias que regían la herencia de los caracteres; de otro la formulación matemática del grado de certidumbre o de probabilidad. Ya en 1924 el matemático Bernstein había logrado precisar, de manera suficientemente clara, el mecanismo de herencia del sistema ABO. En principio hubo una cierta disparidad de criterios sobre este tema, aunque las opiniones de Bernstein, apoyadas a su vez por Welisch, prevalecieron. Poco más tarde Thomsen, Friedenreich y Worsa precisaron la herencia de los subgrupos A1 y A2. El propio Friedenreich describió en 1936 el subgrupo A3. (55)

El mismo Bernstein había formulado en 1925 su teoría de las tres razas primitivas humanas con los grupos A, B y O. Las proporciones actuales se habrían formado por la mezcla gradual de aquellas. La doctrina no llegó a imponerse.

El apoyo matemático ha sido decisivo y ha contribuido en gran parte a la credibilidad de este tipo de estudios. Las aportaciones son numerosas e importantes. Entre todas debemos señalar las de Erik Essen-Möller quien ya en 1938 desarrolló una fórmula para el diagnóstico de la paternidad (56) y la de Ruffié y



Huron, formulada en 1953, que es de las más sencillas. (57). M. Lons había intentado en 1950 un método de diagnóstico positivo de la paternidad que en su momento careció de la base suficiente, moviendo una cierta controversia sobre las posibilidades reales de diagnóstico. (58)

El segundo gran grupo que se introdujo en este tipo de estudios fue el MN, descubierto por Landsteiner y Levine en 1927. Los primeros estudios familiares, debidos a los mismos autores, ya se dieron a conocer el año siguiente, con una muestra de 64 familias y 286 hijos. Luego los estudios familiares han crecido, en este y otros sistemas, de modo muy intenso. Dificultades particulares, de interés en nuestro campo, en el sistema MN, fueron observadas por Crome en 1935 quien comprobó que el hijo biológico de una madre M pertenecía al grupo N. Se pensó inicialmente en un cambio de niños, que no se comprobó. Al año siguiente Pietrosky, estudiando el mismo caso, comprobó en la madre la existencia de un receptor N débil, que fue denominado N2 por Friedenreich el mismo año. Su rareza podía crear problemas en la técnica de determinación. En 1947 Andersen lo había hallado 8 veces en un conjunto de 20.000 determinaciones de paternidad (0.04%). Poco más tarde se halló también el M débil (M2, Pietrosky, 1943) y el M3 por autores de la misma escuela. (59)

Los grupos S y s fueron también objeto de estudio familiares numerosos ya desde el fin de la década de los años cincuenta (Sanger, Race y cols.). Asimismo debemos mencionar los estudios extensos de Dahr sobre la herencia del sistema P. Ya en el año 1941 estudiaron una muestra de 563 familias de Koln con 1070 hijos.

También tiene una particular importancia, por su variedad, el sistema Rh. Su historia, desde el descubrimiento por Landsteiner y Wiener en 1940 es bien conocida. Sólo queremos remarcar que ya al año siguiente de su descubrimiento se publicó un estudio sobre los mecanismos de herencia del sistema en una muestra de 60 familias y 237 hijos. (60)

El estudio de estos grupos eritrocitarios abrió un camino que luego se ha hecho más complejo, pero más rico en datos y en grado de certidumbre, mediante la introducción de los datos obtenidos a partir de la investigación de los factores leucocitarios y los factores séricos.

Entre los factores séricos tuvo una cierta importancia pionera el estudio de las haptoglobulinas descritas por Polonowski y Jayle en 1938, diferenciadas

sobre todo por los trabajos de Smithies y Walker en 1955 y 1956, quienes determinaron sus tres tipos y algunos mecanismos genéticos. (61)

Posteriormente, pero esta es historia muy reciente, se han conocido, y se estan introduciendo, otros factores, cada uno con sus polimorfismos y su utilidad, que han enriquecido ampliamente este campo.

Mención aparte merece la introducción en este campo del estudio del sistema HLA, descubierto sobre todo por los trabajos de Jean Dausset y su escuela y que ha permitido incrementar ampliamente la probabilidad de exclusión, hasta llegar a los altos valores aceptados actualmente. (62)

En España las modificaciones en la legislación a partir de la Constitución de 1978 y los cambios en el Código Civil (1981) han permitido un incremento de la casuística y por tanto de las posibilidades de investigación en este campo.

## NOTAS

-----

- (1) MATA P.: "Tratado de Medicina y Cirugía Legal" Madrid (Bailly Baillièrre) 1874, 5ª ed. t. I, p. 598.
- (2) Código de Hammurabi (edición de Federico Lara Peinado). Madrid (Edit. Nacional) 1982. v. pp. 19-20.
- (3) Ibid. p. 113. v.t. pp. 236, notas 496 y 497.
- (4) Ibid. p. 58
- (5) SIMONIN C.: "Medicina Legal Judicial" Barcelona (Espaxs) 1962, p. 480
- (6) Ibid. p. 481
- (7) Partida 4 Tit. 23, ley 4. v. CORBELLÀ J.: "Aspectos médico legales de las partidas" An. Med. Cir. 1966. 42 (194), 131-140.
- (8) Partida 6. Tit. 3. Ley 5.
- (9) v. CORBELLÀ J.: "Historia de la Medicina Legal en España" Barcelona (tesis) 1965. p. 145. v.t. CORBELLÀ J. "La medicina legal española en la Edad Media". An. Med. Forense. 1964-65. pp. 161-171.
- (10) CORBELLÀ J. (1965) loc. cit. p. 181.
- (11) SIMONIN. loc. cit. p. 1133
- (12) FRAGOSO Juan: "Tratado de las declaraciones que han de hacer los cirujanos acerca de muchas enfermedades y muchas maneras de muertes que suceden". Data del fines del S. XVI y ha sido impresa muchas veces en la "Cirugía Universal" de Fragoso (1581)
- (13) v. CORBELLÀ J. (1965) loc. cit. pp. 363-364
- (14) Noticia extensa de la obra de estos autores se encuentra en: USANDIZAGA Manuel: "Historia de la Obstetricia y la Ginecología en España" Santander (Aldus) 1944.
- (15) MONTAÑA I BUCHACA Daniel: "Aspectes sanitaris del terme i vila de Terrassa en els segles XVI, XVII i XVIII. Barcelona (Seminari Pere Mata. UB) 1987.

v.t. ESCUDÉ AIXELA Manuel: "Aspectos sanitarios del archivo de la iglesia de san Bartolomé y santa Tecla de Sitges en el siglo XVIII (1701-1800) Barcelona (tesis. UB) 1986.

(16) CAMPS CLEMENTE M.; CAMPS SURROCA M.: "Aspectes sanitaris de l'Arxiu de sant Joan de Lleida (segle XVII). Lleida (Seminari Pere Mata. UB) 1983

(17) MATA, loc.cit. I, 740

(18) Ibid. I, 596-599.

(19) Ibid. I, 737-738.

(20) Ibid. I, 734.

(21) HOFFMANN E. von: "Tratado de Medicina Legal" (trad. G. Sentiñón) (Rev. Med. Cir. Pract.) 1891 t. I, p. 98. v.t. p. 237.

(22) Ibid. p. 97

(23) BRITAIN R.P.; SAURY A.; GUIDET M.R.: "Bibliographie des travaux français de médecine légale" Lyon (Masson) 1970 p. 61, num. 42 a.

(24) Ibid. p. 53, num. 107.

(25) SIMONIN, loc. cit. p. 480.

(26) Castellano M. in: GISBERT CALABUIG J.A.: "Medicina Legal y Toxicología". Valencia (Ed. Saber) 1985. 3ª ed. p. 686. v.t. SIMONIN, loc. cit. p. 486.

(27) SIMONIN, loc. cit. p. 488. v.t. LOPEZ GOMEZ L.; GISBERT CALABUIG J.A.: "Tratado de Medicina Legal" Valencia (Ed. Saber) 1962, I, 263.

(28) LOPEZ GOMEZ L.; GISBERT CALABUIG J.A. loc. cit. p. 263.

(29) Ibid. pp. 264-265.

(30) MISERACHS RIGALT M.: "Observaciones a 1000 determinaciones de grupo sanguíneo hechas a habitantes de Cataluña". Ars Médica (Barcelona) 1934, X, (106). 303-305.

(31) v. PEREZ de BARRADAS J.: "Manual de Antropología" Madrid (Ed. Cult. Clas. y Mod.) 1946. v.p. 310.

(32) BOYD W.C.; BOYD L.G.: "New data on blood groups and other inherited factors in Europe and Egypt". Amer. J. Phys. Anthrop. 1937, 23, 49-70.

(33) Algunos datos de interés en este campo se hallan dispersos en el texto de MOURANT A.E.; KOPEC A.C.; DOMANIEWSKA-SOBCZAK K.: "The distribution of the human blood groups and the other polymorphisms". London (Oxford. U. Press) 1976, 2ª ed.

(34) AGOSTI L.: "Primeros datos estadísticos sobre el sistema M-N en España". Trab. Inst. Sahagún Antrop. 1946, 2, 321-326.

v.t. AGOSTI L.; IKIN E.W.; MOURANT A.E.: "Les groupes sanguins ABO, MN et Rh des Galiciens (Espagne N.O.) Rev. Hémat. 1950, 5, 325-328.

v.t. CARRION J.; AGOSTI L., HERNANDEZ JIMENEZ J.: "Sobre la distribución de los factores M y N entre los españoles". Hemat. Hemoter. 1951, 1 (1), 35-51.

(35) ALCOBÉ S.: "Grupos sanguíneos en nómadas del Sáhara Occidental". Trab. Inst. Sahagún Antrop. 1945, 1, 23-37

v.t. CARMONA A.D.: "Contribución al estudio de los grupos sanguíneos en la provincia del Sáhara". Trab. Hemat. Hemoter. 1962, 2, 76-95.

(36) v.t. GRIFOLS J.A.; MANAU Mª R.: "Los genotipos Rh de otros 350 dadores de sangre españoles". Med. Clin. 1952, 18, (4), 271-275.

v.t. GRIFOLS J.A.: "The Kell, Duffy and P blood group distribution in a sample of Barcelona blood donors (Summary). 5th Int. Congr. Blood Transfus. París. 1954, 225.

(37) GUASCH J.: "Nota sobre la distribución del factor Rh en España". Symp. Hematol. Hemoter. Barcelona-Madrid, (M.Servet) 1948, 463-478.

v.t. GUASCH J.: "El factor Rh en España" Rev. Esp. Pediatr. 1950, 6, 387-390.

v.t. GUASCH J.; FLORENSA A.; DIAZ de YRAOLA G.; GAVILANES C.; RIO R. del; TABUENCA J.; RAICHS A.: "Los factores hemáticos en España excepto el País Vasco". Med. Clin. 1952, 18 (4) 268-271.

(38) HORS P.: "Seroantropología e historia de los agotes". Hemat. Hemoter. 1951, I, (3-4):3-40.

v.t. HORS P.; GOMEZ MARCOS F.: "Seroantropología de los vaqueiros". Hemat. Hemoter. 1951, I, (3-4), 90-96.

v.t. HORS P.; SARANDESES A.: "Seroantropología de Galicia" Hemat. Hemoter. 1951, I, (3-4) 97-98.

v.t. HORS P.: "Seroantropología de leoneses y maragatos". Hemat. Hemoter. 1951, I, (3-4) 99-100.

- (39) MATA DE LA CAMPA M.: "Investigaciones sobre el factor Rh". Valencia (tesis) 1949 (95 pp.) cit. MOURANT loc. cit. p.844  
v.t. MATA DE LA CAMPA M.: "Investigaciones sobre el factor Rh". Rev. Esp. 1949, 35, 318-321.
- (40) ELOSEGUI C.; CARRION J.; YRAOLA E.; HORS P.: "Contribución al estudio seroantropológico de los vascos" Rev. Soc. Argent. Hemat. Hemoter. 1950, 2, 25-29.  
v.t. ELOSEGUI C.; HORS P.: "Sistema Kell y Duffy. Primeras aportaciones" Hemat. Hemoter. 1951, I, (3-4) 86-89  
v.t. ELOSEGUI C.; HORS P.: "Factor Rh en Madrid" Hemat. Hemoter. 1951, I, (3-4) 101
- (41) DIAZ de YRAOLA G.; GUTIÉRREZ GOICOECHEA J.M.: "Contribución al estudio de la distribución regional de los grupos sanguíneos". Acta Clin. (Sevilla) 1951, 5, 1039-1043.
- (42) MISERACHS RIGALT M.: " Los grupos sanguíneos y el factor Rh en Cataluña". An. Inst. Corachan, 1950, 2, 187-194.
- (43) PARRILLA HERMIDA M.: "Frecuencia de los grupos sanguíneos en Galicia". Med. Cir. guerra 1953, 15, 381-383.
- (44) RACE R.R.; LAWLER S.D.; BERTINSHAW D.; GRIFOLS LUCAS J.A.; GRIFOLS LUCAS V.; IBARZ M.; OPPENHEIMER W.: "Los genotipos Rh de 223 dadores de sangre españoles". Med. Clin. 1949, 13 (5) 325-326. En relación con este trabajo queremos señalar que las muestras se recogían en Barcelona y se enviaban por vía aérea a Londres, donde eran analizadas.
- (45) PONS J.: " Taste sensivity to phenylthiourea in Spaniards" Human Biol. 1955. 27. 153-160.  
v.t. PONS J.: " A contribution to the heredity of the PTC taste character". Ann. hum. Genet. 1959-60, 24, 71-76.
- (46) PONS J.: " Relaciones entre grupos sanguíneos y líneas dermopapilares en negros de la Guinea española". Madrid (Inst. Est. Africanos) 1957.
- (47) PONS J.: " Grupos sanguíneos en asturianos". Rev. fac. Cienc. Oviedo. 1964, 5, 135-141.  
v.t. PONS J.; FUSTÉ M; DIAZ J.M.; PLANAS J.: "Haptoglobin types in the population of Castilla" Acta genet. Stat. med' 1968, 18, 579-583

- (48) PLANAS J., CASTRO S. de; ARRIBAS J.M.: "Haptoglobin types in the population of Castilla" Acta genet. Stat. med. 1965, 15, 140-144.  
v.t. PLANAS J.; FUSTÉ M.; VIÑAS J.: "Contribución al estudio de los caracteres hemáticos en la población española (haptoglobinas, grupos sanguíneos A1, A2, B, O y Rh) Genet. Iber. 1966, 18, 185-203.  
v.t. PLANAS J.; PONS J.; TRIGINER J.: "Haptoglobin types in the population of Asturias (Spain). Acta genet. Stat. med. 1966, 18, 155-158.  
v.t. PLANAS J.; FUSTÉ M.; DIAZ J.M.; PONS J.: "Blood groups (Rh, ABO) in the population of Gran Canaria (Canary Islands, Spain) Human Hered. 1969, 19, 185-189.
- (49) VALLS MEDINA A.: "Estudio antropogenético de la capacidad gustativa para la feniltiocarbamida" Madrid (Inst. Sahagun) 1958.
- (50) BOYD y BOYD v. nota 23.  
v.t. CHALMERS J.N.; IKIN E.W.; MOURANT A.E.: "Basque blood groups" Nature, 1948, 162, 27.  
v.t. CHALMERS J.N.; IKIN E.W.; MOURANT A.E.: "The ABO, MN and Rh blood groups of the Basque people" Amer. J. phys. Anthropol. 1949, 7, 529-544.
- (51) RUFFIÉ R.; DUCOS J.; BIERME R.: "Note préliminaire sur la répartition des groupes sanguins dans les populations autochtones des hautes vallées pyrénéennes". 5th. Int. Congr. Blood Transfus. Paris, 1954, 241-243.  
v.t. RUFFIÉ J.: "Etude séro-anthropologiques des populations autochtones du versant nord des pyrénées". Bull. Soc. Anthropol. Paris. 1958, 9, (10) 3-91.
- (52) RUFFIÉ J.; DUCOS J.: "Investigaciones de las sustancias de grupo en las manchas de sangre", Med. Clin. 1952, 18, (4) 275-283.
- (53) v. nota 31
- (54) PROKOP O.: " Grupos sanguíneos humanos". Barcelona (Científico- Med.) 1970. pp. 10-11.
- (55) Ibid. pp. 15 y 21.
- (56) Ibid. pp. 133 y 144.
- (57) LOPEZ GOMEZ L., GISBERT CALABUIG J.A. (1962) loc. cit. I, pp 261 y sigs.
- (58) PROKOP O. loc. cit. pp. 133 y 154.
- (59) Ibid. pp. 38-39 y 43-45.

(60) Ibid. pp. 45 y 51 y 57 y sigs.

(61) LOPEZ GOMEZ L.; GISBERT CALABUIG J.A. loc. cit. I; 260.

(62) Los trabajos de Jean DAUSSET y su equipo, son muy numerosos en este campo. Quizá el más representativo, por su valor inicial sea: DAUSSET J.: "Leuco-agglutinins. IV. Leuco-agglutinins and blood trasfusion". Vox sang. 1954, 5, 190-198.

v.t. DAUSSET J.; PLA M. (eds.) "HLA Complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme" Paris (Flammarion) 1985.

El primer trabajo español de aplicación del sistema HLA a la investigación de paternidad data de 1978. v. CASTILLO R.; GELABERT A.; HUGUET E.: "Aportaciones recientes sobre la investigación de la paternidad mediante el estudio de los grupos sanguíneos leucocitarios". Rev. Esp. med. leg. 1978, 5 (14-15), pp. 28-35.



Capítulo 3

-----  
PRINCIPALES ASPECTOS JURIDICOS DE LA INVESTIGACION  
=====

BIOLOGICA DE LA PATERNIDAD.  
=====

Juan Bautista MARTI LLORET y Manel GENE  
-----

La investigación biológica de la paternidad en España ha experimentado un reciente florecimiento en cuanto a casuística o volumen de peritajes debido a los cambios efectuados en materia de filiación en el Código Civil y en la Ley de Enjuiciamiento Civil. Ambos fundamentados en los planteamientos progresistas de los conceptos familia e individuo de la Constitución Española de 1978.

LEGISLACION ANTERIOR A 1981  
-----

Hasta 1981 los artículos del Código Civil referentes a paternidad y filiación databan del siglo pasado y tenían su fundamento en el Código Napoleónico de 1804. (Exceptuando el período de la República durante el cual la Constitución de 1931 admitía la prueba biológica de la paternidad, especificando además que los padres tenían para con sus hijos habidos fuera del matrimonio los mismos deberes que para los habidos en él). Dicho Código posee un status por el cual el padre es aquel que determina la Ley y que no siempre coincide con la verdad biológica del progenitor. Además la filiación, que como hecho natural se da en todas las personas, como hecho jurídico no siempre existe. La filiación es trascendental por sus repercusiones morales y patrimoniales, por lo que el problema supera al de las personas involucradas para convertirse en asunto de interés público y social en el que interviene el Estado.

Hasta la llegada del actual Código los tipos de filiación eran reconocidos en nuestro ordenamiento jurídico del siguiente modo: Hijos legítimos (procreados durante el matrimonio, o concebidos antes pero nacidos después de la celebración de éste) e hijos ilegítimos

(engendrados por personas no ligadas por vínculo matrimonial). Los ilegítimos se dividían a su vez en: 1ª.- Naturales, si los padres podían contraer matrimonio en el momento de la concepción; 2ª.- No naturales, si el matrimonio era imposible por: a) Impedimento de parentesco (= incestuoso); b) Estar uno de los dos ligado al vínculo matrimonial (= adulterino); o c) Estado religioso (= sacrilego).

Los legítimos tenían derecho a llevar los apellidos de padre y madre, a recibir alimentos, y a la legítima y demás derechos sucesorios.

En los naturales el reconocimiento era voluntario para el padre y tenían derecho a lo mismo que los legítimos a excepción de la porción hereditaria que sería la que se determinase en el Código Civil.

En los ilegítimos no naturales estaba prohibido el reconocimiento y las acciones judiciales de paternidad.

La doctrina defendía la familia legítima, anteponiendo un hipotético bien social, al derecho individual determinado por la verdad biológica. La protección de unos y otros era totalmente discriminatoria de modo que el hijo, sin ningún tipo de intervención, adquiriría una serie de culpas desde su nacimiento.

Los supuestos en que se permitía la investigación de paternidad eran muy limitados. Por un lado existía la posibilidad del padre de impugnar una paternidad que le era atribuida como legítima. Por otro lado el hijo podía reclamar una paternidad legítima que no le era reconocida. La resolución de estos problemas se apoyaba en la teoría de las presunciones legales procedente del Derecho Romano en materia de filiación. Básicamente se trataba de que el marido de la madre debía ser considerado como padre si no existía una evidencia clarísima de lo contrario. Históricamente tenía su razón de ser. Hay que tener en cuenta que no se disponía de pruebas biológicas objetivas que pudieran fundamentar la investigación de paternidad en la herencia genética.

El padre podía impugnar una paternidad ya que el Código admitía la prueba de la "imposibilidad física" del marido para tener acceso con su mujer en los primeros 120 días de los 300 que hubieron precedido al nacimiento. Las causas de "imposibilidad" eran múltiples. Por ejemplo: la impotencia, la separación geográfica (ausencia), etc.

En la prueba de la filiación legítima el hijo debía probar: el matrimonio de los padres, su concepción durante el matrimonio y su filiación paterna y materna. Se probaba el matrimonio por el acta y la filiación materna. Los otros puntos se resolvían por las "presunciones legales". En relación al tiempo de la concepción, el artículo 108 del Código Civil especificaba que se presumen hijos legítimos los nacidos después de los 180 días siguientes a la celebración del matrimonio y antes de los 300 siguientes a su disolución o de la separación de los conyuges.

El legislador resolvía los problemas de paternidad mediante la cómoda aplicación de las presunciones legales, ignorando y dificultando con ello, cualquier tentativa de demostración biológica. Queda patente que la verdad biológica no interesaba.

Se seguía el criterio de no poner en duda la legitimidad, considerándola como el máximo beneficio que se le podía dar al niño, en un intento de asegurar la supervivencia de la unidad familiar como célula primaria de la estructura social humana. Además se producía la circunstancia paradójica de que el criterio de las presunciones persistía aunque la madre hubiese declarado contra el marido o hubiese sido condenada como adúltera (cabe destacar que el adulterio estaba tipificado en el Código Penal como delito).

Por otro lado los hijos ilegítimos no podían acudir a los tribunales reclamando el reconocimiento de su filiación, existiendo la prohibición expresa de la investigación de la paternidad. No se admitía más prueba que el reconocimiento voluntario. La prohibición pretendía ser un principio de derecho fundado en la tranquilidad de las familias y en una moral pública hipócrita de defensa de la reputación de los ciudadanos. Esta visión queda reflejada en nuestra jurisprudencia. Un ejemplo de ello lo constituye la sentencia del 18 de Enero de 1968 en la que se expresa literalmente: "El admitir un hijo adulterino supone una lesión a los derechos inmutables que la persona tiene de usar y disfrutar de los apellidos".

Resumiendo diremos que hasta la reforma del Código civil en materia de filiación llevada a cabo en 1981, la investigación biológica de la paternidad, sólo era posible en los casos de matrimonio en los que no se daban los requisitos de presunción con lo que el padre podía rehusar la legitimidad y el hijo podía pedir la investigación. Y también en los casos de viudas que se casaban antes de 301 días del fallecimiento de su marido ya que se planteaba un posible caso de dos presunciones legítimas. También era posible la investigación por vía

penal en determinados delitos (violación, estupro o rapto) en los que el estudio biológico sería una prueba más de culpabilidad para esclarecer un delito.

#### LEGISLACION ACTUAL

-----

No se experimenta un cambio importante en materia de filiación hasta la instauración de la Constitución Española de 1978. El espíritu de la Constitución actual es un calco de la Constitución de la IIª República (1931) que en su artículo 43 señala que los padres tienen para con los hijos habidos fuera del matrimonio los mismos deberes que los habidos en él.

El artículo 39.2 de la Constitución de 1978, referente a la protección de la familia y de la infancia, perteneciente al capítulo 3º "De los principios rectores de la política social y económica", especifica literalmente: "Los poderes públicos aseguran, asimismo, la protección integral de los hijos, iguales éstos ante la Ley, con independencia de su filiación y de las madres cualquiera que sea su estado civil. La Ley posibilitará la investigación de la paternidad".

Este primer paso de nuestra Constitución culminó con la modificación de los artículos comprendidos en el Título V del Código Civil "De la paternidad y filiación", siendo redactada la totalidad del articulado de este título, sus capítulos y rúbricas conforme a la Ley 11/1981, de 13 de Mayo.

1º.- Artículo 108: La filiación puede tener lugar por naturaleza y por adopción. La filiación por naturaleza puede ser matrimonial y no matrimonial. Es matrimonial cuando el padre y la madre están casados entre sí.

La filiación matrimonial y la no matrimonial, así como la adoptiva plena, surten los mismos efectos, conforme a las disposiciones de este Código.

2º.- Artículo 127: En los juicios sobre filiación será admisible la investigación de la paternidad y de la maternidad mediante toda clase de pruebas, incluidas las biológicas.

El juez no admitirá la demanda si con ella no se presenta un principio de prueba de los hechos en que se funde.

Destacamos el hecho de que la reforma introduce la filiación extramatrimonial en el Código Civil, substituyendo la antigua clasificación. Disminuye las antiguas diferencias de nomenclatura entre hijos legítimos e ilegítimos, manteniendo la diferencia terminológica de hijos matrimoniales y no matrimoniales, aunque con igualdad de derechos.

También destaca el artículo 127 por dejar las puertas abiertas a la utilización de las pruebas biológicas en los casos de impugnación y reclamación de paternidad. Sin embargo persisten una serie de restricciones determinadas por la no obligatoriedad de someterse a las pruebas. Restricciones que nos recuerdan el antiguo principio de reconocimiento voluntario de la paternidad ilegítima. En este sentido nuestra legislación todavía no se halla a la altura de las de países más avanzados y con más tradición en esta materia, en los que la prueba es obligatoria.

La no obligatoriedad de someterse a las pruebas está fundamentada en la propia Constitución, concretamente en su artículo 18.1 en el que se garantiza el derecho a la intimidad personal. Se entiende que la información que se deriva de un estudio de este tipo podría atentar la intimidad.

La negativa a someterse a estas pruebas también se fundamenta en circunstancias de tipo técnico. En la actualidad el material biológico más informativo para llevar a cabo una investigación de paternidad es la sangre. La extracción de una muestra de sangre de madre, hijo(s) y supuesto(s) padre(s) mediante una venopuntura puede ser interpretada como una lesión o una agresión si se efectúa en contra de la voluntad del interesado, amparándose en la Declaración Universal de Derechos Humanos.

Otra restricción incluida en el artículo 127 es la necesidad de que exista un principio de prueba en el que se funde la demanda para iniciar la acción por vía jurídica. Este condicionante la puede alejar de la verdad biológica y del precepto constitucional. Es además poco clara al dejar al arbitrio judicial la decisión de lo que constituye o no un principio de prueba, ya que no se especifica en el artículo.

Sin embargo es necesario señalar que, a pesar de las múltiples restricciones que todavía persisten, la visión actual de los juristas tiene, por lo general, un espíritu abierto a la verdad biológica. Destacamos, por su importancia, una sentencia del Tribunal Supremo, con fecha 5 de Noviembre de 1987, referente a un caso de impugnación de filiación matrimonial y reclamación de

filiación no matrimonial, en la que en su texto se expresa literalmente: "... y cuya verdadera filiación quedó demostrada sin género de dudas por la prueba biológica, además de...". Y en otro párrafo señala: "En él existe una contundente prueba pericial biológica que asegura al actor un 99.98% de probabilidades de ser el padre de la niña, por lo que el hecho básico de la paternidad biológica, no discutido expresamente por otras pruebas, está demostrado".

## LA INVESTIGACION DE PATERNIDAD EN EUROPA

---

Si analizamos la manera de enfocar el problema en el plano internacional, vemos que la mayoría de países contemplan en la actualidad, de una u otra forma, la posibilidad de investigación biológica. Se evidencian tres planteamientos distintos y bien definidos, siguiendo los estudios llevados a cabo por los Profesores Villanueva y Castellano:

1<sup>o</sup>.- Un primer grupo en el que la legislación no busca la verdad ni la igualdad, inspirado en el código Napoleónico de 1804. Grupo en el que predomina una visión parecida a la de España antes de la entrada en vigor de la actual Constitución. Aquí se incluyen países como Bélgica y Luxemburgo.

2<sup>o</sup>.- Un segundo grupo, más reciente, abierto a la verdad y no a la igualdad. Es el que engloba los antiguos códigos civiles de Alemania (1900) o de Suiza (1912).

3<sup>o</sup>.- El tercer grupo, más reciente, es el que se abre a la verdad biológica y a la igualdad. Está formado por las legislaciones de los países socialistas, las nuevas leyes escandinavas, las modificaciones alemanas (1969), austríacas (1970), de los Países Bajos, francesas (1972) e italianas (1975). Son legislaciones con un espíritu semejante pero con matices diferenciados entre sí.

En los códigos alemán y suizo referentes a la filiación matrimonial, el niño no será legítimo si la paternidad del marido con relación al niño era imposible.

En lo referente a la filiación extramatrimonial sólo se plantean problemas de orden procesal en cuanto a si se puede traer a un tercero al proceso. Es decir que en la legislación germana predomina la verdad biológica, de modo que la justicia acepta las pruebas biológicas de hemogenética en toda su dimensión, tanto en la exclusión de un sujeto como posible padre, en las

que el grado de certeza suele ser matemático de 100 %, como en la no exclusión. Teniendo en cuenta que en este último caso se trata de una predicción estadística de probabilidad de paternidad en expresión numérica (Essen-Möller) o sus correspondientes predicados verbales (Hummel), en las que no se llega a la verdad matemática del 100 % pero se pueden alcanzar valores superiores al 99.73 % en los que la paternidad se halla prácticamente probada, con un grado de veracidad racional o biológico. (ver capítulo de cálculos de exclusión y afirmación de paternidad)

En derecho familiar han puesto en igualdad al hijo matrimonial y extramatrimonial. La vinculación jurídica de la filiación se puede llevar a cabo por reconocimiento y por acción judicial del Estado. El demandado es protegido en relación a la necesidad de la existencia previa de una duda seria de la paternidad, para efectuar la prueba.

Los Códigos francés e italiano, son más restringidos en la aceptación de la investigación (violación, rapto, seducción, concubinato, posesión de estado de hijo).

Dentro del grupo de leyes más avanzadas, en relación a su tradición en esta materia, tenemos las escandinavas. Desde el punto de vista histórico existe constancia de que un tribunal escandinavo admitió en el siglo XVIII una tara hereditaria (la braquidactilia) como prueba de la paternidad de un individuo enfermo sobre un niño que padecía el defecto. En la actualidad las legislaciones escandinavas han adoptado el sistema de la "paternidad más verosímil". Es decir que consideran como padre el que haya tenido relaciones con la madre en el período crítico, a no ser que se demuestre que su paternidad es poco verosímil. Si la madre ha tenido relaciones con varios hombres en el momento de la concepción, el acusado será aquel cuya paternidad sea netamente más verosímil que la de los demás. Y si no se demuestra esta verosimilitud el hijo quedará a cargo del estado (evidentemente, la madre está obligada a revelar la identidad de sus amantes).

#### LA INVESTIGACION DE PATERNIDAD EN CATALUÑA

---

Un caso especial, digno de un estudio aparte, es la permanencia de la libre investigación de la paternidad admitida por el derecho foral catalán (compilación catalana). La compilación catalana aborda

la regulación de la filiación con un enfoque jurídico abierto y progresista, estableciendo la libre investigación de paternidad extramatrimonial. Está basado en el Derecho Canónico que admite, desde hace varios siglos, cualquier prueba para la resolución de problemas de esta índole (Decretales de Gregorio IX de 1692). Se trata de un articulado más moderno y próximo a la línea general del derecho comparado que el anterior código civil español, y curiosamente mucho más próximo a nuestro derecho histórico, propiamente hispano, que el del código (Napoleónico), que implantó a nuestro país un régimen foráneo y ajeno, por completo a nuestra mentalidad y a nuestros precedentes jurídicos. Recordemos, por ejemplo, que en nuestros Códigos Medievales, la cualidad de bastardo no era causa de inferioridad y los hijos naturales estaban asimilados a los legítimos.

El Tribunal de Casación de Cataluña en sentencia de 17 de Julio de 1937 estableció que en Cataluña pueden emplearse toda clase de pruebas para determinación de la paternidad de los hijos fuera de matrimonio, incluso la indiciaria y sin duda la pericial biológica.

En el párrafo 2º del artículo 1º de la compilación dice que se tomará en consideración la tradición jurídica catalana encarnada en las antiguas leyes, costumbres y doctrina que de aquellas se deriven.

En la jurisprudencia sobre filiación en Cataluña se ha mantenido en general la constante de que la filiación extramatrimonial se rige por el Derecho Canónico y Derecho Romano con independencia del Derecho civil español, reconociendo la libre investigación de la paternidad. Hay múltiples sentencias que se pronuncian en este sentido, por ejemplo la del Tribunal Supremo del 5 de Julio de 1944, la de la Audiencia Territorial de Barcelona del 13 de Febrero de 1964, etc.

Otra diferencia significativa entre el código civil español y la legislación del derecho foral catalán se establece en relación al período otorgado para impugnar la paternidad.

El artículo 136 del código civil español dice literalmente: "El marido podrá ejercitar la acción de impugnación de la paternidad en el plazo de un año contado desde la inscripción de la filiación en el Registro Civil. Sin embargo, el plazo no correrá mientras el marido ignore el nacimiento. Si el marido falleciere antes de transcurrir el plazo señalado en el párrafo anterior, la acción corresponde a cada heredero por el tiempo que faltare para completar dicho plazo.



Fallecido el marido sin conocer el nacimiento, el año se contará desde que lo conozca el heredero."

La compilación catalana concede un plazo de cuatro años para poder ejercitar la acción de impugnación de la paternidad.

ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACION BIOLÓGICA DE LA  
-----  
PATERNIDAD EN RELACION A SUS ASPECTOS JURIDICOS.  
-----

Un estudio de las demandas de investigaciones biológicas de la paternidad llevado a cabo en el Laboratorio de Hemogenética Forense del Departamento de Medicina Legal, Laboral y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, a partir de una casuística superior a los 100 casos estudiados entre 1976 y 1985, demuestra que el 80% de las mismas son consecuencia de una impugnación de la filiación establecida en virtud de la aplicación de la presunción de la paternidad matrimonial. Este 80% de impugnaciones se distribuye en un 50% en el que la acción es iniciada por el padre legal del hijo impugnado y el 30% restante en el que la iniciativa procede de la madre.

Las reclamaciones de paternidad constituyen un 20% de las investigaciones, en ellas el hijo carece de filiación paterna y consta como hijo extra-matrimonial. La mayoría de estas reclamaciones procede de hijos que la anterior legislación había calificado como hijos ilegítimos no matrimoniales. El 20% se distribuye en un 15% en el que la iniciativa de la reclamación procede de la madre y un 5% en la que procede del supuesto padre.

BIBLIOGRAFIA

=====

CODIGO CIVIL

Madrid (Tecnos) 5ª ed. 1986.

CONSTITUCION ESPAÑOLA

Madrid (Tecnos) 3ª ed. 1986.

HUGUET E.; GENE M.; ERCILLA G.; CORBELLA J.

"Estado actual de la investigación de la paternidad en Barcelona".

Annals de Medicina. Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears. En prensa.

LEY DE ENJUICIAMIENTO CIVIL.

Madrid (Tecnos) 4ª ed. 1986.

VILLANUEVA E.; CASTELLANO M.

"La investigación de la paternidad ante la perspectiva constitucional".

Revista Española de Medicina Legal. 1981. VII (26-27): 5-29.

## Capítulo 4

-----

PROCEDIMIENTOS DE INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD.  
=====

MARCADORES GENETICO-MOLECULARES. TECNICAS DE ESTUDIO DE  
=====

LOS DIFERENTES MARCADORES EMPLEADOS.  
=====

Angel CARRACEDO y M<sup>a</sup> Sol RODRÍGUEZ

-----

La variabilidad y diferencia de valor de los métodos que se han empleado para investigar la paternidad hace que antes de nada sea necesario proceder a su sistematización, que, como se ve en la tabla 1, podemos realizar dividiéndolos en dos grandes grupos: los métodos orientativos o de empleo ocasional y los métodos basados en el análisis de caracteres heredables.

Tabla 1

Métodos de investigación de la paternidad

1. Métodos orientativos o de empleo ocasional:
  - Elementos de juicio de orden obstétrico
  - Esterilidad varonil
2. Estudio de caracteres heredables:
  - Genético-moleculares: Sangre
    - Saliva
    - Orina
    - Tejidos
  - Citogenéticos
  - Físicos
  - Funcionales
  - Clínicos

En lo que se refiere a los primeros, puede decirse que algunos de ellos, como la esterilidad perfectamente comprobada o la situación previa de embarazo de la mujer, tienen indudablemente una total fuerza probatoria, pero son situaciones que rara vez se presentan. Otros, como la fecha del coito dentro del ciclo ovular o la correlación entre grado de desarrollo fetal y duración del embarazo, son meramente orientativos. Cabe afirmar por ello, que son procedimientos que por su propia naturaleza no pueden utilizarse sistemáti-

camente, requieren una valoración retrospectiva carente la mayoría de las veces de una apoyatura diagnóstica fiable, y, en todo caso, son utilizables tan sólo como procedimientos excluyentes de la paternidad.

Los métodos basados en el análisis de los caracteres heredables son también de valor muy desigual. Algunos de ellos, como la herencia de aptitudes, son meramente anecdóticos; otros, como los basados en la herencia de caracteres físicos, poseen graves inconvenientes, como su variación continua o la varianza ambiental tan elevada que poseen, y, por último, los basados en la herencia de enfermedades, además de no poder ser aplicados sistemáticamente por su rareza, poseen el problema de su elevada tasa de mutación y, en muchos casos, de su expresividad tardía.

Por todas estas limitaciones no es de extrañar que el método más utilizado actualmente sea el basado en el estudio de marcadores genético-moleculares, que son un conjunto de caracteres que poseen una herencia mendeliana simple (es decir, habitualmente, para cada uno de estos marcadores todo individuo posee dos alelos, uno procedente de su madre y otro de su padre biológico), son discontinuos, con penetrancia y expresividad totales, casi siempre presentes al nacimiento o incluso antes y en absoluto sujetos a ningún tipo de influencia ambiental.

Desde que a principios de siglo se describieron los primeros sistemas polimórficos, el campo de los marcadores genético-moleculares se ha ido haciendo cada vez más complejo, sobre todo en lo que se refiere a los marcadores genéticos enzimáticos y proteicos, cuyo número, sobre todo en los últimos quince años, se ha incrementado de un modo extraordinario.

La aplicación del estudio de la saliva, orina y tejidos a la investigación de la paternidad es limitada; en los dos primeros casos porque la muestra es difícil de obtener en niños, y en cuanto a los tejidos, por la objeción legal y ética que se plantea en la recogida de muestras para su análisis y que hace que sólo el pelo sea utilizable. Además, el número de marcadores no sanguíneos es realmente escaso y únicamente merecen ser considerados la amilasa (AMY-1), esterasa, proteínas estructurales y caracter secretor en la saliva; el pepsinógeno (Pg) en la orina y las carboxi-metil-queratinas (SCMK) en pelo, ciertamente con mayor valor en el campo de la criminalística que en el de la investigación de la paternidad.

Hoy por hoy, el interés se centra en la sangre de un modo casi exclusivo. En la tabla 2 se pueden ver

los principales marcadores genético-moleculares sanguíneos.

Tabla 2

Marcadores genético-moleculares sanguíneos

Eritrocitos: Antígenos de membrana  
Enzimas  
Leucocitos: Antígenos HLA  
Enzimas  
Plasma: Proteínas y enzimas séricos

Las técnicas que se utilizan para el análisis de los marcadores genético-moleculares son también variadas. La mayor parte se analizan por técnicas electroforéticas (todos los polimorfismos enzimáticos de eritrocitos y leucocitos y casi todas las proteínas y enzimas séricas polimórficas), pero otros se analizan por técnicas de aglutinación (antígenos eritrocitarios o lipoproteínas), inhibición de la aglutinación (inmunoglobulinas) y linfocitotoxicidad (HLA).

Comentaremos brevemente los métodos más importantes de una forma muy general, ya que sólo profundizar un poco en cada uno de ellos sería imposible de abarcar en un capítulo tan breve como el que aquí pretendemos.

AGLUTINACION  
-----

El método fundamental para el análisis de antígenos eritrocitarios es la aglutinación (1-4). Básicamente consiste en la propiedad de los hematíes de aglutinarse al ser enfrentados con determinados antisueros. La reacción tiene lugar al existir en la membrana del hematíe determinados antígenos que se combinan con los anticuerpos (antisueros) que se añaden, formándose unas aglomeraciones o aglutinados claramente visibles. En su forma más simple el método de aglutinación se realiza en tubos de ensayo o placas. Hay cuatro tipos de factores que pueden, básicamente, influir en la reacción: los eritrocitos, el antisuero, el medio y las condiciones físicas bajo las que la reacción tiene lugar.

a) Eritrocitos: La importancia del tipo, número y localización de los antígenos sobre la membrana de los eritrocitos se ilustra con el ejemplo de los antígenos ABO y Rh. El número de receptores ABO puede estar cercano a un millón por célula y son fácilmente aglutinados con los anticuerpos apropiados. Los antígenos Rh poseen sólo de 20.000 a 30.000 receptores

por célula y son además intramembranosos, y por ello son menos fácilmente aglutinados con el anticuerpo apropiado, lo cual puede ser importante en circunstancias límite (manchas de sangre envejecidas, por ejemplo).

b) Anticuerpos: Son utilizados como tales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o de origen animal e incluso aglutininas vegetales. Son suministrados comercialmente con una calidad controlada, aunque se suelen utilizar antisueros procedentes de al menos dos casas comerciales diferentes.

No todos los anticuerpos actúan igual. Los anticuerpos Ig G requieren a menudo antiglobulina para su demostración, mientras que los anticuerpos Ig M no. La presencia de complemento se requiere a veces en algunas reacciones. También una alta concentración de fibrinógeno o globulina sérica puede inducir a la formación de falsos agregados.

c) Medio: Medios con bajo pH y baja fuerza iónica pueden acelerar la unión de los anticuerpos a los hematíes. Cada vez se utilizan más soluciones de baja fuerza iónica (LISS), sobre todo en el análisis de antígenos eritrocitarios en manchas de sangre. Varios enzimas, así como macromoléculas pueden también incrementar la aglutinación.

d) Condiciones físicas: La temperatura y el tiempo de incubación, así como la duración y velocidad de la centrifugación, afectan notablemente la reacción de aglutinación.

En condiciones normales los eritrocitos permanecen separados a una distancia de 25 nm. Esto se atribuye a la existencia de cargas negativas en la superficie de los hematíes que, lógicamente, impiden su contacto. La presencia de estas cargas negativas se puede demostrar colocando los hematíes en un campo eléctrico y observando como migran hacia el polo positivo. Estas cargas negativas son atribuibles al contenido en ácido siálico ya que se anula la migración de las células por tratamiento con neuraminidasa. El grado de carga negativa sobre la superficie del eritrocito se denomina potencial zeta, un término que expresa, pues, la diferencia de potencial entre las cargas negativas de la superficie de los hematíes y los cationes del medio. El potencial zeta se expresa en -mV. El rango óptimo para los anticuerpos Ig M es de -22 a -17 mV y para Ig G de -11 a -4,5 mV. Cuanto más pequeños son los valores absolutos de potencial zeta, tanta menor distancia habrá entre los eritrocitos.

La aglutinación puede ser inducida de dos formas: reduciendo la distancia entre los hematíes o proporcionando puentes entre anticuerpos.

#### 1.- Reducción de la distancia intercelular.

Si los hematíes se tratan con enzimas como neuraminidasa, tripsina, papaína, bromelina o ficina se reduce su contenido en ácido siálico y los valores del potencial zeta son más bajos, de ahí que sean más fácilmente aglutinados por anticuerpos apropiados. El problema es que el ácido siálico es uno de los determinantes de los antígenos M y N, entre otros, y el tratamiento con enzimas de estas células puede destruir estos antígenos.

La albúmina puede ayudar también a la aglutinación. No se sabe exactamente como interviene, aunque la teoría más aceptada es que actúa como los condensadores eléctricos y posee cargas positivas que neutralizan las cargas negativas de los hematíes.

Del mismo modo la centrifugación obliga a los eritrocitos a aproximarse y facilita así la aglutinación.

#### 2.- Puentes entre anticuerpos.

Los anticuerpos Ig M con dimensiones mayores de 35 nm son capaces de alcanzar más de un eritrocito para formar agregados y se conocen como anticuerpos completos.

Los anticuerpos Ig G con dimensiones menores de 25 nm pueden aglutinar únicamente hematíes con distancias intercelulares menores. El uso de anti-Ig G, anticuerpos contra fracciones de complemento o anti-transferrina puede servir como puente entre los anticuerpos o fracciones de complemento ya unidos a eritrocitos individuales y facilitar así la hemaglutinación.

En este último sentido el método más utilizado es el Test de la Antiglobulina o Test de Coombs (5). Este test permite, gracias a un suero antiglobulina humana revelar la presencia de un anticuerpo específico fijado sobre el antígeno correspondiente a la superficie del hematíe en el caso en el que esta fijación no se traduzca por aglutinación directa de los hematíes.

La aglutinación artificial por suero antiglobulina aparece igualmente si alguna fracción del complemento (como C3d) está presente en la superficie del hematíe, ya que la antiglobulina posee anticuerpos

específicos contra ciertas fracciones del complemento. Existen dos modalidades del Test de Coombs: el directo y el indirecto.

El Test de Coombs directo permite reconocer la fijación en vivo de una inmunoglobulina a la superficie del glóbulo rojo, en el caso de anemias hemolíticas autoinmunes o de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

El Test de Coombs indirecto es útil en la determinación de algunos fenotipos eritrocitarios, y se realiza fijando en primer lugar los anticuerpos sobre los hematíes por incubación de la suspensión globular con el suero estudiado, y, a continuación, después de un lavado cuidadoso (para eliminar todo resto de Ig sérica que inhibiría la antiglobulina), poniendo en contacto la suspensión de hematíes así tratada con suero antiglobulina que provoca una aglutinación en caso de reacción positiva.

Finalmente hemos de indicar que, en algunos casos, se pueden producir agregados no inmunes, de los que lo más conocido es la formación de "rouleaux", que se induce habitualmente por elevadas concentraciones de dextrano, PVP, fibrinógeno o globulina y pueden ser diferenciados de la aglutinación por su aspecto al microscopio o por la dispersión de los hematíes después de una suspensión en suero salino.

#### INHIBICION DE LA AGLUTINACION

-----

Esta reacción se utiliza a menudo para detectar la presencia de antígenos solubles en saliva, suero u otros fluidos. Estos antígenos comparten la misma especificidad antigénica que se encuentra en los hematíes y son capaces de neutralizar los correspondientes anticuerpos en el antisuero. El antisuero neutralizado no aglutinará los hematíes. Consecuentemente, la ausencia de aglutinación en este método indica un test, positivo y significa que ese antígeno está presente en el fluido que se analiza.

Un ejemplo de su aplicación es el análisis en saliva del carácter secretor y el tipado de Ig (grupos Gm y Km) en plasma (6).

#### CITOTOXICIDAD

-----

Esta prueba consiste esencialmente en determinar si cambia o no la permeabilidad de las células después de su incubación con anticuerpos y



complemento. El anticuerpo citotóxico, después de su combinación con la célula receptora, activa los componentes del complemento y produce modificaciones en la permeabilidad de la membrana celular. Estas alteraciones de la permeabilidad pueden influir en la capacidad de la célula para excluir un colorante, como el azul de tripano, que penetra en la célula y es visible por simple examen microscópico (7).

Esta técnica, que será explicada extensamente en el correspondiente capítulo, es la de elección en el análisis de los antígenos leucocitarios (HLA).

## ELECTROFORESIS

-----

Se conoce como electroforesis a la separación de moléculas o partículas con una carga determinada en un campo eléctrico.

Es conocido que toda proteína tiene una carga eléctrica dada, que viene determinada por los pK parciales de los aminoácidos que la constituyen.

Se denomina "pI" (punto isoeléctrico) de una proteína al pH para el cual esa proteína tiene movilidad cero en un campo eléctrico. El pI depende solamente de la composición de la proteína y es una constante físico-química. Aunque la mayor parte de las proteínas humanas poseen pI más bien ácidos (por debajo de 7), hay una enorme variabilidad entre ellas ya que oscilan desde un pI de 2,4 (orosomucoide) hasta un pI de 11,70 (lisozima placentaria).

La carga neta de una proteína depende del pH del medio. Cuando el pH del medio es igual a su pI la proteína no se moverá (carga neta = 0). Si la proteína se coloca en un medio con un pH más bajo que su pI, tendrá una carga neta positiva y en un campo eléctrico migrará hacia el cátodo (electrodo negativo). Si se coloca en un pH más alto que su pI, perderá protones y tendrá una carga neta negativa por lo que migrará de cátodo a ánodo (electrodo positivo).

Existen muchos tipos de métodos electroforéticos. Inicialmente se pueden dividir en dos grandes grupos: la electroforesis sin soporte ("carrier free methods") y la electroforesis con soporte. Dentro de las primeras cabe incluir a la isotacoforesis, la electroforesis en tubos rotantes y los denominados "moving boundary methods" (8). Dentro de los segundos destacamos la electroforesis de zona en medios con efecto tamiz, la electroforesis de zona en medios libres, la electroforesis en gradiente de poro, la focalización isoeléctrica y

otros métodos derivados de la misma, la electroforesis continua y la inmunolectroforesis entre otras.

En Biología Forense, como en otras disciplinas en las que la electroforesis se utiliza de forma aplicada tienen sólo interés algunos tipos, sobre todo analíticos, y no suelen interesar, en principio, ni métodos preparativos ni electroforesis libres sin soporte salvo para cuestiones puntuales o campos muy concretos de investigación. Por ello es común dividir los métodos electroforéticos que utilizamos en dos grupos: los basados en técnicas de electroforesis convencional y los basados en la focalización isoeléctrica. Ambos métodos son de tipo analítico y utilizan soportes, si bien sus principios son diferentes. En la electroforesis convencional (9) influye en la separación de las proteínas no sólo la carga neta de las mismas en relación con el pH del medio, sino también el tamaño molecular de la proteína (por el efecto tamiz del medio) y la interacción de la proteína con el soporte.

El equipo electroforético para electroforesis convencional consiste en una fuente de alimentación, con voltaje y amperaje regulable y una cubeta de electroforesis preferiblemente refrigerada. Como soporte electroforético se puede utilizar acetato de celulosa, almidón, agarosa o poliacrilamida.

Su uso en la actualidad está restringido al análisis de polimorfismos que poseen en los productos de sus alelos una marcada diferencia en tamaño molecular, acompañada o no por una marcada diferencia de pI, y también para algunos sistemas enzimáticos en los que la presencia de almidón es necesaria para el revelado. La electroforesis convencional es todavía el método de elección para el análisis de las haptoglobinas (electroforesis vertical en poliacrilamida), glioxalasa (electroforesis mixta de agarosa y almidón), adenosin-desaminasa, adenilatokinasa y 6-fosfogluconato-deshidrogenasa (electroforesis en acetato de celulosa) y algunos otros sistemas enzimáticos eritrocitarios (fosfoglicolato-fosfatasa o uridin-monofosfokinasa) o leucocitarios, que se analizan por electroforesis en almidón.

La mayor parte de los marcadores se analizan hoy día por medio de la focalización isoeléctrica (10-13) en geles de poliacrilamida y agarosa.

La focalización isoeléctrica difiere de la electroforesis convencional en que la separación tiene lugar en un gradiente de pH lineal, continuo y estable. Este gradiente de pH se consigue añadiendo al gel una serie de aminoácidos aminocarboxílicos, derivados

habitualmente del ácido acrílico, que son los que crean ese gradiente. Se suministran comercialmente en distintos rangos de pH y se denominan genericamente anfólitos (Ampholine, Servalyte, Pharmatyte, Bio-lyte, etc).

Todas las proteínas que coloquemos sobre el gel se dirigirán en teoría hacia su pI y allí focalizarán, concentrándose además.

Como soporte se emplea la poliacrilamida y la agarosa y se suele añadir, además, sacarosa o glicerol como estabilizantes. Es más utilizada la poliacrilamida porque es más cómoda que la agarosa. La poliacrilamida es un polímero sintético constituido a base de acrilamida y N-N'-metilenbisacrilamida (BIS o bisacrilamida) que en determinadas condiciones (con TEMED y persulfato amónico o con riboflavina y luz UV) polimerizan y forman un gel cuyo tamaño de poro y estabilidad variará en función de la concentración total de polímero denominada T ( $T = (\text{acrilamida} + \text{BIS})/100$ ) y de la concentración relativa de BIS y acrilamida denominada C ( $C = \text{BIS}/(\text{acrilamida} + \text{BIS})$ ). Como alternativas a la bisacrilamida se pueden emplear DATD (N-N'-dialil-tartardiamida), la BAC (N-N'-bisacrililcistamina) y la DHEBA (N-N'-(1,2-dihidroxietilen)bisacrilamida). Se pueden añadir además detergentes no iónicos o urea, o separadores para mejorar la separación de isoproteínas e isoenzimas.

Los anfólitos que se añaden para crear el gradiente de pH deben de poseer una excelente capacidad tampón, una buena conductividad, una movilidad 0 en el pH isoeléctrico, una buena solubilidad, no deben influenciar en los sistemas de detección (por ejemplo deben de poseer una baja absorbancia a 280 nm), no deben tampoco tener ninguna influencia sobre la muestra, y la deriva catódica, que inevitablemente producirán, debe de ser la menor posible. El número de constituyentes que posean tiene que ser igualmente el mayor posible.

Con los anfólitos suministrados comercialmente pueden distinguirse isotipos que difieran entre si sólo 0,0025 unidades de pH, ya que se pueden conseguir rangos bastante estables de sólo una unidad de pH o incluso algo menores.

El principio de separación de la focalización isoeléctrica es, además, diferente al de la electroforesis convencional ya que sólo interviene en la separación la diferencia de pI y no el tamaño de la molécula, por lo que interesa que los geles tengan estabilidad mecánica, pero no importa que tengan un tamaño de poro reducido ya que un efecto tamiz exagerado enlentecería la focalización sin ninguna ventaja adicional.

El equipo necesario para la focalización isoelectrica consiste en una fuente de alimentacion que proporcione un voltaje elevado (ya que la resolucion es proporcional al voltaje) y en la que se puedan regular no solo la intensidad y el voltaje sino tambien la potencia. Es necesario tambien un equipo de refrigeracion, ya que la aplicacion de voltajes elevados obliga a ello.

En los últimos años se ha mejorado enormemente la resolucion de la focalización isoelectrica, que ya habia supuesto una revolucion total en comparacion con la electroforesis convencional con la introduccion de los gradientes de pH inmovilizados (IPG) (14-16). En ellos las inmovilinas (Immobiline); que se suministran comercialmente con diferentes pK, se unen covalentemente a la matriz del gel. El gradiente de pH se forma añadiendo inmovilinas de dos diferentes pK a soluciones con distinta densidad generándose al mismo tiempo un gradiente de densidad y un gradiente de pH. Se pueden fabricar, así, geles que difieran entre ánodo y cátodo únicamente 0,1 unidades de pH, de modo que la resolucion de bandas puede ser inferior a 0,001 unidades de pH.

En la práctica sustituciones simples de aminoácidos neutros en proteínas de tamaños moleculares normales pueden ser fácilmente detectadas.

Además el gradiente es totalmente estable con el tiempo, su conductividad es uniforme y la deriva catódica queda totalmente abolida.

Actualmente se ha introducido en el campo analítico el uso de la denominada focalización isoelectrica híbrida (HIEF), que consiste en la rehidratación de geles IPG con anfólinas. Esto está suponiendo una segunda revolucion en el análisis de polimorfismos genéticos (17) y sus aplicaciones en Biología forense pueden también revolucionar este campo (18).

La HIEF elimina el frente de sales típico de los IPG, acortan mucho el tiempo de recorrido (solo tres o cuatro horas en comparacion con las 12 horas de los IPG normales) y, sobre todo, facilitan mucho la solubilización de las proteínas y su absorción en la matriz, lo cual es de gran interés en el análisis de manchas. Los geles híbridos poseen otras muchas ventajas adicionales que pueden verse en las referencias (19) y (20).

La utilización de IPG y HIEF obliga al uso de fuentes de alimentacion que proporcionen 5000 V, pero no se necesita nada nuevo en relacion con la focalización isoelectrica.

También en la actualidad se están introduciendo sistemas computerizados como el PhastSystem (Pharmacia) que emplea geles de dimensiones reducidas (5 x 5 cm) (21), y los laboratorios más avanzados en esta materia disponen ya de sistemas totalmente automatizados para la formación de geles tanto en IPG como en HIEF.

Los métodos de electroforesis bidimensional, sobre todo los ISO-DALT (como IEF-SDS, IPG-SDS o HIEF-SDS) tan útiles para la resolución de mezclas complejas de proteínas tiene sin embargo pocas aplicaciones en Biología forense.

La Inmunolectroforesis, incluyendo la inmunofijación, así como los otros sistemas de detección de proteínas y enzimas serán discutidos en los correspondientes capítulos.

## BIBLIOGRAFIA

-----

1. Goudemand, M., Ch. Salmon. Immuno-hématologie et immunogénétique. Flammarion Médecine-Sciences. Paris (1980).
2. Zmijewski, Ch.M., W.E. Haesler. Blood banking science. Appleton-Century-Crofts. New York (1982).
3. Wiener, A.S. Advances in blood grouping. Grune & Stratton. New York. London (1965).
4. Bryant, N.J. An introduction to immunohematology. W.B. Saunders Company. Philadelphia (1982).
5. Coombs, R.R.A., A.E. Mourant, P. R. Race. A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinings. Br.J. Exp. Pathol 26: 255 (1945).
6. Grubb, R. The genetic markers of human immunoglobulins. Springer-Verlag. New York (1970).
7. Ferrone, S., B.G. Solheim. HLA typing: methodology and clinical aspects. CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida (1982).
8. Hjhertén, S. Free zone electrophoresis. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB. Uppsala (1967).
9. Smith, I. Chromatographic and electrophoretic techniques. William Heinemann Medical Books Ltd. London (1976).
10. Arbuthnott, J.P., J.A. Beeley. Isoelectric focusing. Butterworths. London-Boston (1975).
11. Catsimpoolas, N., J. Drysdale. Biological and biomedical applications of isoelectric focusing. Plenum Press. New York-London (1977).
12. Righetti, P.G. Progress in isoelectric focusing and isotachoforesis. North-Holland Publishing Company. Amsterdam (1975).
13. Righetti, P.G. Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Elsevier biomedical press. Amsterdam-New York (1983).
14. Pascali, L.V., G. Conte. Improved classification of alpha-1-antitrypsin in immobilized pH gradients containig sucrose. Electrophoresis 6: 402-404 (1985).

15. Cleve, H., W. Patutschniek, W. Postel, J. Weser, A. Görg. Analysis of the genetic variants of the human Gc system (VDBP) by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 3:342-345 (1982).
16. Cossu, G., M. Manka, P.G. Righetti, E. Gianazza, V. Baudin, H. Wajeman, A. Vianchi-Bosisio. Detection of neutral amino acid mutations by immobilized pH gradients: the case of the Tgamma variant in fetal hemoglobin Sardinia. *Electrophoresis* 7: 213-216 (1986).
17. Altland, K., U. Rossmann. Hybrid isoelectric focusing in rehydrated immobilized pH gradients with added carrier ampholytes: demonstration of human globins. *Electrophoresis* 6: 314-325 (1985).
18. López-Rodríguez, I., A. Carracedo, M.D. Montiel, M.S. Rodríguez-Calvo, M.V. Lareu, L. Concheiro. Improved diagnosis of Orosomuroid (ORM) phenotypes by hybrid isoelectric focusing (HIEF). *Enviado a Canadian Journal of Forensic Science*.
19. Altland, K., A. Banzhoff. Separation by hybrid isoelectric focusing of normal human plasma transthyretin (prealbumin) and a variant with a methionine for valine substitution associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis* 7: 529-533 (1986).
20. Altland, K., P. Becher, A. Banzhoff. Paraffin oil protected high resolution hybrid isoelectric focusing for the demonstration of substitutions of neutral amino acids in denatured proteins: the case of four human transthyretin (prealbumin) variants associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis* 8: 293-297 (1987).
21. Carracedo, A., C. Andrade-Vide, M.S. Rodríguez-Calvo, M.D. Montiel, M.V. Lareu. Fast isoelectric focusing of some polymorphic proteins and enzymes in miniaturized gels using an automated system. *Enviado a J. Forensic Sciences*.

## Capítulo 5

---

### ASPECTOS GENETICO-POBLACIONALES

---

J. Luis B. CAEIRO y Olga CANABAL

---

En este capítulo pretendemos centrar nuestra atención en aquellos aspectos teóricos básicos que, como punto de partida, nos permitirán analizar la estructura genética de la población objeto de estudio, y sin los cuales resulta imposible desarrollar una metodología estadística ulterior, encaminada a efectuar el diagnóstico biológico de la paternidad, para grupos familiares pertenecientes a dicha población. No ostante, se plantea la necesidad de introducir (aunque sea al nivel más elemental) una serie de conceptos genéticos básicos que puedan servir como punto de referencia inicial para el lector no iniciado en la problemática, de cara a una comprensión más adecuada de los aspectos propios de este capítulo.

### GENERALIDADES

---

#### Bases citogenéticas.

---

Las células humanas contienen en su núcleo 46 cromosomas correspondientes a 23 pares, de los cuales un par incluye los cromosomas sexuales (gonosomas) X e Y, y de cuya combinación se determina el sexo del individuo, en tanto que los 22 pares restantes corresponden a los autosomas. (Tjio y Levan, 1956). Los diferentes pares autosómicos son clasificados y numerados del 1 al 22, en orden decreciente, de acuerdo con su longitud cromosómica.

Los dos cromosomas de cada par presentan la misma longitud y participan de las mismas funciones genéticas; se dice, pues, que son homólogos entre sí. No obstante, los cromosomas sexuales (X e Y) aunque determinan el sexo del individuo corresponden a un par heteromórfico, donde el cromosoma X es netamente más largo que el Y.



Una situación de especial relevancia la constituyen las células germinales o gametos (espermatozoides y óvulos) originados siempre por un tipo especial de división (meiosis) a partir de las correspondientes células madres, en las gónadas (testículos y ovarios, respectivamente), que pasan de una dotación cromosómica de 23 pares (diploide) a una dotación haploide, constituida por 23 cromosomas correspondientes a un único ejemplar de cada uno de los 23 pares. Es decir, cada tipo cromosómico (el 1, 2, ... etc.) puede estar representado indistintamente por uno u otro cromosoma. Teniendo en cuenta la segregación de los 23 pares, y que ésta se efectúa independientemente, entre un par y otro, obtenemos 2 elevado a 23 tipos posibles de combinaciones, es decir 8.388.608 tipos gaméticos posibles, que pueden ser originados por un individuo.

### Alelismo

-----

Cuando observamos los diferentes individuos de una población, se hacen patententes similitudes y diferencias, que se manifiestan a diferentes niveles. Por ejemplo, desde la pigmentación cutánea, morfología cefálica o patrones de huellas dactilares, hasta el tipo de antígenos eritrocitarios, tipos de hemoglobina o predisposición a padecer ciertas enfermedades, son algunas manifestaciones que están reflejadas en mayor o menor medida (según el tipo de rasgo) por factores genéticos, de tal modo que responden a diferentes modelos de heredabilidad, lo que viene a significar que los rasgos de un individuo están determinados por las características genéticas de los padres.

Para un rasgo concreto, las unidades básicas que controlan su heredabilidad corresponden a los genes. Evidentemente diferentes rasgos estarán regulados por genes diferentes, como pauta general. Dichos genes se ubican en los cromosomas, dispuestos linealmente y repartidos entre los 23 pares. La porción básica que ocupa un gen en un cromosoma se denomina locus, y corresponde a un fragmento (submicroscópico) cromosómico, concreto y fijo. Por consiguiente habrá loci autosómicos (la inmensa mayoría) cuando se ubiquen en un autosoma, en tanto que cuando se localicen en un gonosoma (X o Y) se dirá que es un locus ligado al sexo. Obviamente, cada par de cromosomas homólogos presentan un conjunto de loci concreto, e idéntico para ambos. Así habrá rasgos cuyos loci se ubiquen en el cromosoma 1 otros en el 2, otros en el 3 ...etc. (no obstante, habrá caracteres que puedan deberse a la confluencia simultánea de loci situados en diferentes pares cromosómicos). Por esta razón, en un individuo humano

(con 23 pares cromosómicos en sus células), cada locus estará "duplicado" por existir una dotación diploide (si exceptuamos los loci adscritos a gonosomas).

Consideremos un ejemplo: la Glutamato Piruvato Transaminasa (GPT, E.C. 2.6.1.2) es una enzima del metabolismo celular cuyo locus se sitúa en el cromosoma 16. Tomamos como base los datos referidos al estudio genético-poblacional en la población gallega (B.Caeiro et al., 1987), observamos que en la población coexisten dos tipos moleculares de GPT: GPT 1 y GPT 2. Ambos tipos moleculares son la expresión de dos formas alternativas para el locus que controla la GPT. Al nivel cromosómico, cada una de las formas alternativas con las que el locus se expresa se denomina alelo. Por ello en un individuo que presenta (referido a los cromosomas 16) el mismo tipo de alelos, se le denominará homocigoto (homocigoto GPT 1-1 u homocigoto GPT 2-2), en tanto que si presenta los dos alelos diferentes, se denominará heterocigoto (GPT 2-1). Los gametos originados a partir de un individuo homocigoto presentarán en todos los casos el mismo tipo de alelos. Los individuos heterocigóticos segregarán independientemente los cromosomas 16 a la hora de formar gametos, de ahí que unos gametos llevarán el alelo GPT1 y otros el alelo GPT2, en las proporciones  $1/2$ ,  $1/2$ .

Llegado este punto debemos efectuar una consideración fundamental, los caracteres morfológicos o fisiológicos, en general, están regulados genéticamente por varios loci, cada uno de los cuales puede presentar varias opciones alélicas, determinando un modelo de heredabilidad (morfogenética) de tipo polímero, que en la mayoría de los casos no se conoce con precisión ni el número de loci ni el número de alelos de cada loci implicados en su expresión. Por ejemplo, caracteres como la estatura o el coeficiente intelectual (IQ) responden a una regulación genética en su expresión, en la que, a mayores, existe una influencia ambiental, de modo que dos individuos genéticamente idénticos para los loci que regulan estos caracteres, pueden desarrollar estaturas o valores de IQ diferentes, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrolle el individuo. Ambos aspectos (herencia polímera e influencia ambiental) suponen serios inconvenientes en su utilización en el diagnóstico biológico de la paternidad. A tal fin los marcadores genético-moleculares (Enzimas eritrocitarias y leucocitarias, proteínas plasmáticas y salivares, antígenos eritrocitarios y leucocitarios) se configuran como los caracteres más adecuados, dado que su expresión genética está regulada, en general, por un único locus con un número de alelos conocido, a la vez que ésta es independiente de las condiciones ambientales en que se

desenvuelve el individuo, de ahí que fundamentalmente centraremos nuestra atención en tal tipo de caracteres.

### Genotipos y Fenotipos

---

En el ejemplo anterior hemos introducido los términos "homocigoto" y "heterocigoto" según que la combinación resultante de los cromosomas homólogos fuese de uno u otro tipo. A cada una de las combinaciones alélicas posibles se le denomina genotipo, respecto a un locus concreto. Así, un mismo individuo podrá ser homocigoto para un locus, independientemente de que sea heterocigoto con relación a otro locus diferente. Si cada alelo se expresa separada e independientemente de la expresión de otro alelo del mismo locus, en dicho caso diremos que ambos alelos son codominantes entre si. Por ejemplo, para un locus dialélico podremos distinguir tres tipos de individuos, como en el caso de la GPT: GPT 1-1, GPT 2-2 y GPT 2-1. Estas tres categorías de expresión de las combinaciones alélicas son denominadas fenotipos. En este caso el fenotipo refleja fielmente el genotipo cromosómico inherente.

Sin embargo, puede suceder que un alelo esté enmascarado en su expresión fenotípica por la presencia de otro alelo en su combinación genotípica. Por ejemplo, un individuo heterocigoto Aa puede pertenecer a la misma categoría fenotípica que un individuo homocigoto AA, cuando en realidad las categorías genotípicas son diferentes. En dicho caso diremos que el alelo "A" es dominante sobre el alelo "a" o, en otras palabras, que el alelo "a" es recesivo respecto al "A". Asimismo, los alelos recesivos en muchos marcadores genético-moleculares, se denominan alelos silentes. En tales circunstancias no se puede inferir el genotipo en función de la categoría fenotípica dado que hay fenómenos de enmascaramiento genético.

### ESTRUCTURA GENETICA DE LA POBLACION

---

Nos interesa referirnos a la población, considerada como una unidad global, contemplando simultáneamente a todos los individuos que forman parte de la misma, a fin de determinar las características que configuran la estructura genética poblacional. Para ello, consideraremos un locus autosómico cuyos alelos presenten relaciones de codominancia, que por tratarse del tipo más sencillo e idóneo, nos proporciona un adecuado punto de partida en el desarrollo teórico.

## Tipos de cruzamientos.

---

Consideremos inicialmente una población de gran tamaño, en la cual las distintas clases fenotípicas se encuentren homogéneamente distribuidas, es decir, que no exista segregación de los individuos según que pertenezcan a uno u otro fenotipo. Con relación a un locus (autosómico), los hombres y mujeres pueden casarse al azar, independientemente de la categoría fenotípica a que pertenezcan. En dicho caso hablamos de cruzamientos panmíticos o panmixia. Cuando, en el caso contrario, existan preferencias a la hora de establecer estos cruzamientos, en función de la clase fenotípica a la que pertenezcan, hablaremos de cruzamientos dirigidos. Se denominará cruzamiento dirigido positivo en el caso de que ambos individuos pertenezcan a la misma clase fenotípica, se denominará cruzamiento dirigido negativo cuando se escoja al otro individuo entre clases fenotípicas diferentes de la propia.

Evidentemente, el concepto de panmixia o de cruzamientos dirigidos es relativo, es decir, está referido siempre a un locus concreto. De este modo, en una población determinada podría haber cruzamientos al azar para el locus de la GPT, en tanto que, simultáneamente, podrían existir cruzamientos dirigidos en función del color de la piel, por poner dos ejemplos.

## Frecuencias alélicas.

---

Consideremos previamente un ejemplo práctico. La Aminolevulinato Dehidrasa (ALADH, E.C. 4.2.1.24) es un marcador genético eritrocitario correspondiente a un locus autosómico dialélico, con relaciones de codominancia. Un estudio efectuado en una muestra de 500 individuos representativos de la población gallega (Caeiro y Rey, 1985) configura la siguiente distribución fenotípica:

ALADH 1-1	421
ALADH 2-1	75
ALADH 2-2	4

---

Total	500
-------	-----

Las frecuencias de los fenotipo 1-1, 2-1 y 2-2, no es sino la incidencia relativa de tales fenotipos, esto es: 421/500 1-1; 75/500 2-1 y 4/500 2-2 (0.842 1-1; 0.100 2-1; 0.008 2-2). Por tratarse de alelos codomi-

nantes entre sí, existe una total correspondencia entre las categorías fenotípicas y las combinaciones genotípicas, de ahí que el valor de las frecuencias genotípicas coincida con el de las frecuencias fenotípicas.

¿Cuál es el número de alelos de la muestra? Si cada individuo aporta dos alelos (en homocigosis o en heterocigosis), cuando consideremos una muestra de N individuos, existirán 2N alelos. En nuestro caso,  $2 \times 500 = 1000$  alelos totales.

Llamemos "p" y "q" a las frecuencias alélicas de ALADH.1 y ALADH.2 respectivamente. Los valores de p y q, es decir, los valores de las frecuencias alélicas serán las frecuencias relativas de dichos alelos, en un total de 2N. Cada individuo homocigoto ALADH 1-1 aporta dos alelos ALADH.1, en tanto que cada heterocigoto ALADH 2-1 solo aporta un alelo ALADH.1; los homocigotos ALADH 2-2 no aportan en ningún caso alelos ALADH.1. Por consiguiente, el número total de alelos ALADH.1 en la muestra será  $2 \times 421 + 75 = 917$ , que referidos a un total de 1000 alelos (2N), configura un valor de  $p = 0.917$ . Análogamente, de acuerdo con el mismo razonamiento, habrá  $2 \times 4 + 75 = 83$  alelos ALADH.2 que configura un valor de  $q = 0.083$ .

Si nos referimos a la muestra de los 500 individuos, dichas frecuencias alélicas corresponden a cálculos precisos (el valor de p y q en la muestra es exactamente el obtenido).

Sin embargo, se trata en realidad, de conocer los valores de las frecuencias alélicas referidas a la población total, a través de una muestra estadística adecuadamente seleccionada que sea representativa de la población general. Por consiguiente, se extrapolan los valores muestrales de p y q, y se refieren a los valores poblacionales, en cuyo caso, tales frecuencias alélicas no son sino una estima. Como toda estima estadística, es necesario calcular el error típico (s.e.) cometido. Para un locus dialélico codominante:

$$\begin{aligned} \text{s.e.}(p) &= \pm \sqrt{(p(1-p)/2N)} = \text{s.e.}(\text{ALADH.1}) \\ &= \pm \sqrt{(0.917(0.083)/1000)} = \pm 0.0087 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{s.e.}(q) &= \pm \sqrt{(q(1-q)/2N)} = \text{s.e.}(\text{ALADH.2}) \\ &= \pm \sqrt{(0.083(0.917)/1000)} = \pm 0.0087 \end{aligned}$$

Por consiguiente las frecuencias alélicas referidas con su error típico serán:

$$\begin{aligned} p &= \text{ALDH.1} = 0.917 \pm 0.0087 \\ q &= \text{ALDH.2} = 0.083 \pm 0.0087 \end{aligned}$$

Observamos que a medida que el número de individuos muestreado es mayor, el valor del denominador es mayor, y por consiguiente, el error típico absoluto cometido es menor. No obstante, para un mismo número de individuos muestreados, el error típico relativo cometido es diferente, dependiendo del valor del numerador p.q, es decir, dependiendo de los valores de las frecuencias alélicas. Así, cuanto menor sea la frecuencia alélica, mayor será el error típico relativo cometido, dado que el error típico relativo viene dado por:

$$\begin{aligned} \text{s.e. relativo (p)} &= \text{s.e. absoluto/frec. alélica} \\ &= \sqrt{(p(1-p)/2N)/p} \end{aligned}$$

En la medida que p es menor el cociente se hace mayor. Así, en nuestro caso:

$$\begin{aligned} \text{s.e. rel(p)} &= 0.0087/0.917 = 0.0095 \\ \text{s.e. rel(q)} &= 0.0087/0.083 = 0.1048 \end{aligned}$$

Observamos que en el caso del alelo ALADH.1 el error típico relativo apenas alcanza el 1% del valor de su frecuencia alélica, en tanto que en el caso de ALADH.2 supera el 10%. De ahí que nos parezca oportuno hacer especial hincapié en estos aspectos, dado que cualquier estima debe ir acompañada de su correspondiente error, con el fin de valorar con mayor precisión estadística los datos manejados.

#### Equilibrio genético

-----

En la población general las frecuencias alélicas coinciden con los valores de las frecuencias de los gametos que portan el alelo ALADH.1 o ALADH.2 para este locus. Si en dicha población no existen cruzamientos dirigidos, la unión de los gametos de uno y otro tipo en la fecundación, para formar los cigotos, podría ajustarse a una distribución de frecuencias concordante con la probabilidad de sucesos aleatorios independientes.

Así, en nuestro ejemplo, los individuos homocigotos 1-1 se presentarán con una frecuencia relativa teórica  $p \times p = p^2$  (la probabilidad de que al elegir aleatoriamente dos gametos de la población - de cara a su fecundación - ambos sean del tipo 1). Los heterocigotos 2-1 tendrán la siguiente frecuencia:  $p.q + q.p = 2pq$  (la probabilidad de que el gameto masculino sea 1 y el femenino 2 más la probabilidad de que el gameto femenino sea 1 y el masculino 2). Análogamente los individuos 2-2:  $q \times q = q^2$ .

Bajo la hipótesis (Ho) de sucesos aleatorios independientes podemos calcular las frecuencias fenotípicas absolutas teóricas, expresadas como el producto de las frecuencias teóricas relativas por el número de individuos considerados en la muestra. En el ejemplo que nos ocupa, las frecuencias teóricas absolutas serían:

$$ALADH\ 1-1 : p \cdot N = (0.917)^2 \cdot 500 = 420.445$$

$$ALADH\ 2-1 : 2pq \cdot N = 2(0.917)(0.083) \cdot 500 = 76.111$$

$$ALADH\ 2-2 : q \cdot N = (0.083)^2 \cdot 500 = 3.444$$

La confrontación de las distribuciones de frecuencias fenotípicas observadas (empíricas) y teóricas (esperadas) nos permite verificar la hipótesis Ho, de apareamientos aleatorios en la población. Dicho valor se cuantifica mediante el estadístico Ji cuadrado (X<sup>2</sup>) expresado como:

$$X^2 = \sum \frac{((\text{frec.fenot.obs.} - \text{frec.fenot.esp.})^2 / \text{frec.fenot.esp.})}{\text{frec.fenot.esp.}} = \frac{((421 - 420.445)^2 / 420.445)}{420.445} + \frac{((75 - 76.111)^2 / 76.111)}{76.111} + \frac{((4 - 3.444)^2 / 3.444)}{3.444} = 1.4067$$

El número de grados de libertad correspondientes se establece como : número de clases fenotípicas - número clases alélicas; en este caso, 3-2 = 1 g.l. Para 1 g.l. el valor 1.4067 se corresponde con valores de probabilidad comprendidos entre 0.3 y 0.5, lo que para un nivel de significación de  $\alpha = 0.05$ , nos permite considerar que no existen diferencias significativas en la distribución de frecuencias empíricas y teóricas, por lo que se desprende que la población se halla en equilibrio genético para este locus.

Planteado en otros términos: consideremos una población de gran tamaño, en la que no operen factores tales como la mutación o selección, para un locus determinado. Si los individuos de dicha población se cruzan entre sí al azar (panmíticamente), el valor de las frecuencias alélicas se mantiene, indefinidamente, de generación en generación, en tanto sigan manteniéndose los cruzamientos al azar. Este teorema, planteado independientemente en 1908 por el inglés Hardy y el alemán Weinberg, constituye el punto central de la condición de equilibrio genético, de ahí que se le denomine indistintamente equilibrio Hardy-Weinberg.

En tales condiciones la estructura de la población se puede conocer y predecir, puesto que las frecuencias fenotípicas estarán exclusivamente determi-

nadas por los valores de las frecuencias alélicas.

Consideremos un locus autosómico dialélico (A,a) con frecuencias "p" y "q" respectivamente. De acuerdo con las premisas poblacionales anteriormente expuestas observaremos:

Tipo de Cruzamiento	Frecuencia Cruzamiento	Frecuencia descendencia		
		AA	Aa	aa
AA x AA	4 p 3	4 p 3	0 3	0
AA x Aa	4p q 2 2	2p q	2p q 2 2	0
AA x aa	2p q 2 2	0 2 2	2p q 2 2	0 2 2
Aa x Aa	4p q 3	p q	2p q 3	p q 3
Aa x aa	4pq 4	0	2pq	2pq 4
aa x aa	q	0	0	q
TOTALES	I	II	III	IV

Desarrollando el sumatorio de las frecuencias relativas en las respectivas columnas obtendremos:

$$I : p^4 + 4p^3q + 2p^2q^2 + 4pq^3 + 4q^4 + q^4 = (p^2 + 2pq + q^2)(p^2 + 2pq + q^2) = (p + q)^2 (p + q)^2 = 1$$

$$II: p^4 + 2p^3q + p^2q^2 = p^2 (p^2 + 2pq + q^2) = p^2 (p + q)^2 = p \cdot 1 = p$$

$$III: 2p^3q + 4p^2q^2 + 2pq^3 = 2pq (p^2 + 2pq + q^2) = 2pq (p + q)^2 = 2pq \cdot 1 = 2pq$$

$$IV : p^2q^2 + 2pq^3 + q^4 = q^2 (p^2 + 2pq + q^2) = q^2 (p + q)^2 = q \cdot 1 = q$$

Por consiguiente en la generación siguiente las frecuencias de las clases fenotípicas serán:

$$p^2 \text{ AA} \quad 2pq \text{ Aa} \quad q^2 \text{ aa}$$





frecuencias fenotípicas absolutas empíricas (obtenidas en la muestra) con los valores correspondientes a las frecuencias fenotípicas absolutas teóricas, en función de que la hipótesis  $H_0$  sea aceptada o rechazada estadísticamente.

#### Dominancia y Recesividad.

Consideremos como ejemplo típico, los antígenos eritrocitarios del sistema ABO. El alelo O se comporta como un alelo recesivo frente a los alelos A o B, que entre sí son codominantes.

Como quiera que hay fenómenos de enmascaramiento genético, no existe una total correspondencia entre las categorías fenotípicas y genotípicas. En tales circunstancias no podemos calcular las frecuencias alélicas de una muestra, dado que no conocemos las frecuencias genotípicas reales.

Sean  $p$ ,  $q$ , y  $r$  las frecuencias alélicas (que no conocemos) en una muestra para los alelos A, B, y O, respectivamente:

Fenotipo	Genotipo	Frecuencias
(O)	OO	$r^2$
(A)	AA + AO	$p^2 + 2pr$
(B)	BB + BO	$q^2 + 2qr$
(AB)	AB	$2pq$

Si la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, la distribución de frecuencias se ajustará al modo anterior.

El número de individuos de la clase fenotípica (O) será: frecuencia fenotípica relativa  $\times$  N número total de individuos muestreados. Por lo que:

$$(O) = r^2 \times N$$

de donde deducimos el valor estimado de  $r$ , esto es:

$$\hat{r} = \sqrt{(O)/N}$$

Por otra parte, sabemos que  $p^2 + 2pr + r^2 = (p + r)^2$ , por

lo que podemos estimar el valor de p como se indica:

$$\hat{p} = \sqrt{((A)/N) - \hat{r}}$$

Y de igual modo:  $\hat{q} = 1 - \hat{p} - \hat{r}$

De este modo se estiman los valores de las frecuencias alélicas bajo la hipótesis de que para dicho locus, la población se encuentra en equilibrio genético. Sin aceptar de entrada esta hipótesis, resulta totalmente imposible calcular los valores de las frecuencias alélicas para casos como este.

La Varianza del alelo recesivo se calcula como:

$$V(r) = (1 - r)^2 / 4N = (r(1 - r)) / 2N + ((1 - r)^2) / 4N$$

El error típico de la estima de r será:

$$s.e.(r) = \sqrt{((r(1 - r)) / 2N) + (((1 - r)^2) / 4N)}$$

"Proporciones de Snyder"

Cuando se presenta en la población un locus dialélico con relaciones de dominancia y recesividad, y puede garantizarse la existencia de apareamientos panmíticos, las frecuencias de los cruzamientos posibles y de la descendencia, se ajustan a un modelo de proporciones, denominado "Proporciones de Snyder".

Tipo de Cruzamiento	Frecuencia de Cruzamiento	Descendencia		Proporc.
		Dominante	Recesivo	
Dom x Dom	$\frac{2}{2} (1-q)$	$\frac{2}{2} p (1+2q)$	$\frac{2}{3} pq$	$\frac{S}{2}$
Dom x rec	$\frac{2}{4} q (1-q)$	$\frac{2}{4} 2pq$	$\frac{3}{4} 2pq$	$\frac{S}{1}$
rec x rec	$\frac{1}{4} q$	$\frac{1}{4} 0$	$\frac{1}{4} q$	$\frac{So}{1}$

Las proporciones de Snyder (S2, S1, So) relacionan la frecuencia de los individuos recesivos obtenidos a partir de cada tipo de cruzamiento. De este modo:

$$S_2 = p^2 q^2 / (1 - q^2)$$

$$S_1 = 2pq^3 / 2q^2 (1 - q^2)$$

$$S_0 = q^4 / q^4 = 1.000$$

La verificación experimental de las proporciones de Snyder, en una muestra determinada, puede ser perfectamente controlada. Tal verificación nos viene a demostrar la condición de equilibrio genético, lo cual, a su vez, nos permite calcular las frecuencias del alelo recesivo asumiendo apareamiento aleatorio, dado que, este supuesto ha sido previamente considerado.

Finalmente, el Equilibrio Hardy - Weinberg constituye el punto central en el estudio de las poblaciones a nivel genético; dado que su verificación nos permite predecir la estructura genotípica de la población a través de los valores de las frecuencias alélicas. No obstante, en nuestro caso ha sido indispensable considerar condiciones idealizadas, que se refieren a la ausencia de selección, tamaño elevado de la población (con ausencia de deriva genética y consanguinidad) y, sobre todo, ausencia de mutación. Fundamentalmente no existen diferencias significativas con la realidad, en la que pueden operar (en mayor o menor medida) los diferentes factores evolutivos mencionados. Esto es así debido a que en el Diagnóstico Biológico de la Paternidad, solo se tienen en cuenta básicamente dos generaciones (padres/hijos), de ahí, que en tan corto número de generaciones, la incidencia real de tales agentes es prácticamente nula, por lo que hemos estimado innecesario el desarrollo teórico de las posibles modificaciones del equilibrio genético por estos factores evolutivos, dentro de este capítulo.

BIBLIOGRAFIA

CAEIRO, J.L.B.; REY, D.  
"Genetic Heterogeneity of Delta-Aminolevulinate  
dehidrase and Phosphoglycolate phosphatase in North-West  
Spain".  
Hum. Hered. 35:21 (1985).

CAEIRO, J.L.B.; CARRACEDO, A.; BOAN, F.  
"Genetic polymorphism of GPT and GLO-I in Galicia  
(Northwest Spain): A comparative Study".  
Anthrop. Anz. 45: 63 (1987).

LI, C.C.:  
Human Genetics. Principles and Methods  
McGraw-Hill; New York (1969).

SNYDER, L.H.:  
"Studies in human inheritance X. A table to determine  
the proportion of recessives to be expected in various  
mattings involving a unit character".  
Genetics 19: 1 (1934).

TJIO, J.H. & LEVAN, A.:  
"The chromosome number of man".  
Hereditas 42:1 (1956).

## Capítulo 6

-----

### EL SISTEMA HLA EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

=====

Guadalupe ERCILLA

-----

Los marcadores genéticos pueden definirse como características identificables transmitidas de padres a hijos controlados rigurosamente por genes situados en un par de cromosomas homólogos. Estos marcadores, para ser útiles en la investigación de la paternidad deben seguir las reglas de la herencia mendeliana.

Unidad de herencia: La unidad de herencia (o gen) se transmite intacta a través de generaciones.

Segregación alélica: Un par de genes (uno procedente del padre y otro de la madre, situados en distintos cromosomas) nunca se encuentra en el mismo gameto sino que siempre se heredan por separado en dos gametos diferentes.

Herencia independiente: Los diferentes pares de genes se heredan independientemente unos de otros, si esto no sucede se dice que los genes están ligados o que existe un desequilibrio de asociación entre ellos y deben ser considerados como una unidad de herencia.

Siguiendo a Thompson y Thompson (1) la utilidad de un estudio genético de un marcador viene determinado por:

- 1.- Un único e inequívoco patrón de herencia
- 2.- Una exacta clasificación de los diferentes fenotipos por técnicas reproducibles y fiables
- 3.- Una relativa alta frecuencia de cada uno de los alelos
- 4.- Ausencia de factores ambientales, edad, interacción con otros genes u otras variables en la expresión de la característica.

## EL SISTEMA HLA

-----

El sistema HLA está constituido por una serie de genes situados en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21.3, que codifican los antígenos HLA de clase I y clase II. Existen tres productos de clase I con un polimorfismo detectable serológicamente, son los pertenecientes a los loci A,B y C (revisado en 2). Estos antígenos están presentes en la mayoría de las células del organismo, pero para análisis serológicos los linfocitos son las células de elección. Los genes de clase II codifican los antígenos DR, DP y DQ que sólo se expresan normalmente en algunas células (linfocitos B, macrófagos,...)

Estos genes están muy próximos entre sí por lo que constituyen una unidad de herencia, ya que se heredan habitualmente como un bloque, que se denomina haplotipo.

Para los estudios de paternidad se considerará el haplotipo como unidad de herencia.

## NOMENCLATURA

-----

Cada uno de los denominados loci o lugares del DNA que pueden ser diferentes y cuyos genes determinan el polimorfismo se denominan por una letra (Tabla I). Cada antígeno viene definido por un número precedido de la letra del locus a que pertenece, así el antígeno B18 es el antígeno denominado 18 y pertenece al locus B.

En el fenotipo de una persona se identifican como máximo dos antígenos de cada locus.

En ocasiones el número va precedido de la letra "w" indicativo de que la especificidad no está definitivamente aceptada por el Comité Internacional, a excepción de los antígenos del locus C que siempre van precedidos de esta letra para distinguirlos de los factores del sistema del complemento que son designados de igual forma.

## DETERMINACION DE LOS ANTIGENOS HLA DE CLASE I.

---

Los linfocitos se aíslan de sangre periférica obtenida por punción venosa, en un gradiente de ficol según el método descrito por Boyum (3).

El tipaje celular propiamente dicho consisten en incubar los linfocitos de la persona cuyos antígeno HLA se quieren determinar con una batería de sueros de especificidad conocida (4).

La incubación se efectúa en placas Terasaki en dos fases: en un primer tiempo se incuban los linfocitos (3000 células / $\mu$ l y 1  $\mu$ l de antisuero en cada pocillo (30 min, 22°C); se añade en cada pocillo 5  $\mu$ l de suero de conejo como fuente de complemento y se procede a una nueva incubación (60 min, 22°C). La reacción se revela con eosina al 5% (3  $\mu$ l) y formaldehído al 30%, pH 7. (9 $\mu$ l). La lectura de la reacción se realiza en microscopio invertido de contraste de fase y se valora el porcentaje de células teñidas.

Se considera una reacción positiva cuando el porcentaje de células teñidas supera el 50% del control negativo, si se utilizan buenos antisueros el porcentaje de células teñidas por la eosina supera el 90%

## UTILIDAD DEL ESTUDIO DEL SISTEMA HLA EN INVESTIGACION

---

### LA PATERNIDAD

---

Los antígenos HLA se expresan de forma codominante, es decir que si existe el gen que codifica el producto se expresa. No se han detectado anomalías en la expresión genética que cursen con déficits inmunológicos.

En el feto los antígenos HLA se expresan a partir de la sexta semana de la gestación y pueden ser detectables en las células amnióticas por lo que es posible efectuar su determinación en el período fetal (5).

No se han descrito mutaciones de estos antígenos.

Su especificidad no varía con la edad y su expresión permanece estable.



El sistema HLA es el sistema humano más polimórfico de los descritos. Ello quiere decir que el número de variedades antigénicas posibles de un gen es muy elevado. Si consideramos la combinación de los tres genes que codifican los antígenos de clase I el número de variedades es del orden 10.368, aunque algunas son más frecuentes que otras debido a que están en desequilibrio de asociación (unidad de herencia).

La eficiencia bioestadística del sistema es de difícil cálculo ya que las combinaciones teóricamente posibles madre-hijo-supuesto padre son superiores a 10 elevado a 12. Una estimación aproximada entre genotipos más frecuentes en de nuestra casuística la sitúan en un valor de Essen-Möller de 8,22 equivalente a un valor medio ponderado de probabilidad de paternidad de 98,35%

#### HERENCIA DE LOS ANTIGENOS HLA

-----

Para la investigación de la paternidad, y como primera fase se determinan solamente los antígenos de clase I.

Cada cromosoma 6 de un individuo codifica el alelo correspondiente a los loci A, B y C. y como cada persona tiene dos cromosomas homólogos se podrán detectar como máximo 6 antígenos HLA de clase I que constituirán su fenotipo. En ocasiones sólo se pueden definir un número menor debido a la ausencia de un antisuero específico o a que un antígeno está en doble dosis (homocigoto).

La herencia de los antígenos de un cromosoma constituye una unidad de herencia, como se observa en la Tabla I, donde se especifican las cuatro posibilidades de combinación según una herencia mendeliana.

Existe un pequeño porcentaje, 0,8 % en nuestra población (6), que puede presentar un haplotipo recombinante, es decir que haya tenido lugar un entrecruzamiento entre genes de dos cromosomas de un mismo individuo, como podría ser el fenotipo HLA A3,A30,Cw4,Cw5,B18,B44 de un hijo de la familia de la tabla I, el cual ha heredado el haplotipo d de la madre y una parte del haplotipo b (el antígeno A3) y una parte del haplotipo a (los antígenos Cw4 y B44). En el caso de un estudio de paternidad este fenómeno puede ser

detectado ya que se posee el genotipo de la madre y del "supuesto padre biológico" y se tiene en cuenta para el

tratamiento probabilístico de los datos.

## FRECUENCIAS ANTIGENICAS

---

El planteamiento estadístico de la probabilidad de paternidad en caso de no poderse excluir al "posible padre" se basa en comparar la frecuencia de las características genéticas halladas en este individuo en relación a la frecuencia de las mismas características en la población general. Dicho en otras palabras. ¿ qué probabilidad se tiene de encontrar un hombre con las mismas características genéticas que las que debería tener el padre biológico?, según se deduce del estudio y dando por cierto que el hijo es hijo de la madre.

Dada la necesidad de establecer esta comparación con la dotación genética de la población general es importante conocer cuales son las frecuencias de las características genéticas estudiadas en nuestra población ya que existen diferencias raciales en cuanto a la distribución de determinados genes. En 1972 el taller de Histocompatibilidad estuvo dedicado a analizar la frecuencia del polimorfismo HLA en distintas poblaciones (7).

Las frecuencias de los antígenos HLA en nuestra población fueron determinadas en nuestro laboratorio en 1975 (8), resultados que han sido confirmados por otros estudios (9) y en poblaciones con un componente importante de endogamia como vascos (10) y ceretanos (11).

En poblaciones endogámicas, con un alto grado de consanguinidad, la frecuencia de la distribución de los antígenos HLA varía, algunos son muy frecuentes mientras que otros están prácticamente ausentes. En estas poblaciones es difícil establecer conclusiones en estudios de paternidad.

## ANALISIS DEL SISTEMA HLA EN LA EXCLUSION DE PATERNIDAD

---

Después de haber efectuado la tipificación HLA del hijo, la madre y el "supuesto padre", se determinan los haplotipos de la madre y el hijo, y se deduce el haplotipo que ha transmitido al hijo el padre biológico. En este punto se pueden dar dos situaciones:

a) Que el supuesto padre no posea los antígenos HLA requeridos para constituir el haplotipo del padre

biológico. En este caso se podrá establecer la exclusión de la paternidad:

#### CASO 1

Hijo	HLA A2, A29, B44, B49, Cw4, Cw-
Madre	HLA A2, A11, B44, B35, Cw4, Cw-
Padre	HLA A2, A 3, B 7, B15, Cw6, Cw-

El hijo ha heredado el haplotipo HLA A2, B44, Cw4 de la madre. El haplotipo que ha heredado del padre biológico debe presentar los antígenos A29, y B49, ninguno de los cuales presenta el padre estudiado.

Los antígenos del locus C no son en este caso informativos ya que tanto la madre como el hijo podrían ser homocigotos para el antígeno Cw4. Por lo tanto no se cumplen los criterios para establecer la paternidad por lo cual puede ser excluido como padre biológico.

#### CASO 2

Hijo	HLA A 1, A24, B17, B-, Cw6, Cw-
Madre	HLA A 1, A29, B17, B5, Cw6, Cw1
Padre 1	HLA A 3, A28, B60, B-, Cw3, Cw8

El hijo ha heredado el haplotipo HLA A1, B17, Cw6 de la madre. El otro haplotipo heredado de su padre biológico podría ser HLA A24, B-, Cw- o bien HLA A24, B-, Cw6; HLA A24, B17, Cw-; HLA A24, B17, Cw6 ninguno de los cuales es posible en el padre estudiado. A pesar de compartir el genotipo B-, con el padre, éste no posee el antígeno A24 que presenta el hijo y en su lugar tiene los antígenos A3 y A28 bien definidos. Respecto al locus C, el hijo no posee ninguno de los antígenos Cw3 o Cw8 que debía haber heredado del padre. La exclusión como padre biológico puede quedar establecida.

b) Que el padre posea los antígenos HLA correspondientes a los haplotipos paternos posibles:

Hijo	HLA A30, A33, B18, B14, Cw5, Cw-
Madre	HLA A11, A33, B35, B14, Cw4, Cw-
Padre	HLA A30, A29, B44, B18, Cw5, Cw-

Se observa que el hijo ha recibido el haplotipo HLA A33, B14, Cw- de la madre y que el otro haplotipo del hijo HLA A30, B18, Cw5 puede establecerse a partir de los antígenos detectados en el padre cuyos haplotipos serían: HLA A30, B18, Cw5 y HLA A29, B44, Cw-.

Por lo tanto el individuo estudiado como posible padre puede ser el padre biológico.

Se deberá proceder al cálculo de probabilidad de paternidad teniendo en cuenta la frecuencia de este haplotipo en la población general. (ver capítulo de cálculos), según la ecuación de Essen-Möller y considerando la posibilidad de que también los antígenos HLA podrían estar asociados de otra forma, constituyendo otros haplotipos: HLA A30,B44,Cw-/A29,B18,Cw5 o los haplotipos HLA A30,B44,Cw5/A29,B18,Cw-, y una tercera alternativa sería HLA A30,B18,Cw-/A29,B44,Cw5.

El sistema HLA (locus A,B,C) tiene una probabilidad a priori de exclusión teórica del 98,62%, en nuestra experiencia del estudio de paternidad en 100 casos el porcentaje de exclusión utilizando exclusivamente el sistema HLA ha sido de 94,11. En la figura 3 se puede observar la eficacia de la probabilidad de exclusión teórica y real obtenida en este estudio.

Si se compara la eficacia del estudio del sistema HLA con otros marcadores de polimorfismo genético, se observa que es el más eficaz porque es el sistema más polimórfico. Sin embargo no es aconsejable utilizarlo como único marcador ya que en 2 casos de 34 exclusiones el sistema HLA no fue informativo; haciéndose la exclusión por otros sistemas.

El estudio de la investigación de la paternidad debe efectuarse con diferentes sistemas polimórficos independientes y analizados individualmente y en su conjunto para garantizar la imparcialidad de los resultados.

## REFERENCIAS

-----

- 1.- THOMPSON JS, THOMPSON MW.  
Genetics in Medicine.  
Philadelphia, WB Saunders, 1973
- 2.- ERCILLA MG  
Sistema HLA. Asociación con enfermedades.  
Lab 2000. 1987. 8:5-9.
- 3.- BOYUM A  
Separation of leukocytes from blood and bone marrow  
Scand. J. Clin. Invest. (suppl) 1968. 21:97-99.
- 4.- TERASAKI PI, MC CLELLAND JD.  
Microdot assay of human serum cytotoxins  
Nature 1974. 206:998.
- 5.- POLLACK MS, MAURER D, LEVINE LS ET AL  
Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia  
(21 Hidroxilase deficiency) by HLA typing.  
Lancet 1979. 1: 1107-1108.
- 6.- ERCILLA MG, ARRIAGO F, MARTORELL J, CASTILLO R,  
VIVES J.  
Recombinación genética dentro del sistema HLA.  
Sangre 1980. 25:999-1008.
- 7.- DAUSSET J, COLOMBANI J.  
Histocompatibility Testing 1972  
Copenhaguen. Munksgaard. 1972.
- 8.- VIVES J, ERCILLA MG, CASTILLO R, ROZMAN C.  
A study of the HLA system in the spanish population  
in Histocompatibility Testing p 233.  
Copenhaguen. Munksgaard. 1975.
- 9.- MORENO M.E., KREISLER J.M.  
HLA phenotype and haplotype frequencies in a sample  
of the Spanish population.  
Tissue Antigens. 1977. 9:105-110

10.- GARCIA MASDEVAL MD, ARRIETA A, ERCILLA MG, VIVES J.  
Estudio genético del sistema HLA en la población  
vasca  
Sangre 1982. 27: 182-189.

11.- ALUJA P, ERCILLA MG, FONT A  
Estudio del polimorfismo del sistema HLA en  
población autóctona de La Cerdaña.  
Actas del IV Congreso Español de Antropología  
Biológica 1985, 623-625

TABLA I  
NOMENCLATURA DEL SISTEMA HLA

Sistema	HLA
Loci	A, B, C, DR, DP, DQ
Antigenos	A1, A2, ... B5, B7, ... Cw1, ... DR1, ...
Fenotipo	A3, A10, B7, B8, Cw3, Cw-, DR2, DR3, DQw2
Genotipo	A3, B7, Cw3, DR2, DQw1 // A10, B8, Cw-, DR3, DQw2

Tabla II  
HERENCIA DEL SISTEMA HLA

	Fenotipo	Haplotipos
PADRE	HLA A29, A3, Cw4, Cw-, B44, B7	a: HLA A29, Cw4, B44 b: HLA A3, Cw-, B 7
MADRE	HLA A1, A30, Cw6, Cw5, B57, B18	c: HLA A1, Cw6, B57 d: HLA A30, Cw5, B18
HIJO 1	HLA A1, A29, Cw4, Cw6, B18, B44	a: HLA A29, Cw4, B44 c: HLA A1, Cw6, B18
HIJO 2	HLA A29, A30, Cw4, Cw5, B44, B57	a: HLA A29, Cw4, B44 d: HLA A30, Cw5, B18
HIJO 3	HLA A1, A3, Cw6, Cw-, B7, B57	b: HLA A3, Cw-, B 7 c: HLA A1, Cw6, B57
HIJO 4	HLA A3, A30, Cw5, Cw-, B7, B18	b: HLA A 3, Cw-, B 7 d: HLA A30, Cw5, B18

FIGURAS

Figura 1.- Alelos del sistema H.L.A.

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	BW48	CW1	DW1	DR1	DQW1 DPW1
A2	B7	B49(21)	CW2	DW2	DR2	DQW2 DPW2
A3	B8	DW50(21)	CW3	DW3	DR3	DQW3 DPW3
A9	B12	B51(5)	CW4	DW4	DR4	DPW4
A10	B13	BW52(5)	CW5	DW5	DR5	DPW5
A11	B14	BW53	CW6	DW6	DRW6	DPW6
AW19	B15	BW54(W22)	CW7	DW7	DR7	
A23(9)	B16	DW55(W22)	CW8	DW8	DRW8	
A24(9)	B17	BW56(W22)		DW9	DRW9	
A25(10)	B18	BW57(17)		DW10	DRW10	
A26(10)	B21	DW58(17)		DW11(W7)	DRW11(5)	
A28	BW22	BW59		DW12	DRW12(5)	
A29(W19)	B27	BW60(40)		DW13	DRW13(W6)	
A30(W19)	B35	BW6(40)		DW14	DRW14(W6)	
A31(W19)	B37	BW62(15)		DW15		
A32(W19)	B38(16)	BW63(15)		DW16	DRW52	
AW33(W19)	B39(16)	BW64(14)		DW17(W7)	DRW53	
AW34(10)	B40	BW65(14)		DW18(W6)		
AW36	BW41	BW67		DW19(W6)		
AW43	BW42	BW70				
AW66(10)	B44(12)	BW71(W70)				
AW68(28)	B45(12)	BW72(W70)				
AW69(28)	BW46	BW73				
	BW47					
		BW4				
		BW6				

9.º Taller de Histo-compatibilidad. Múnich, 1984.



Figura 2.- Técnica para la determinación de los antígenos H.L.A.

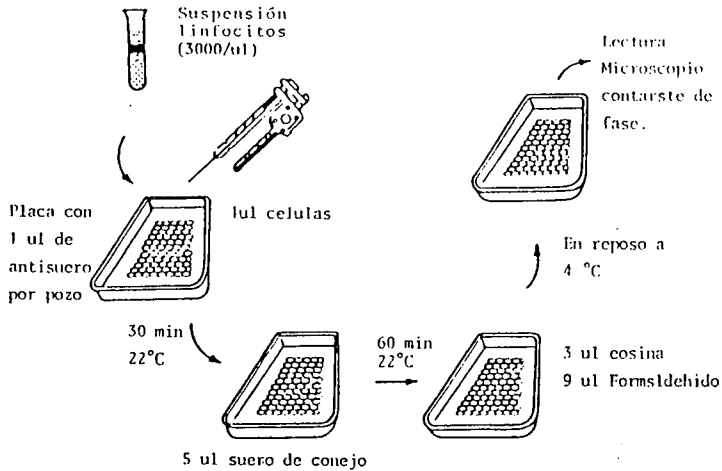
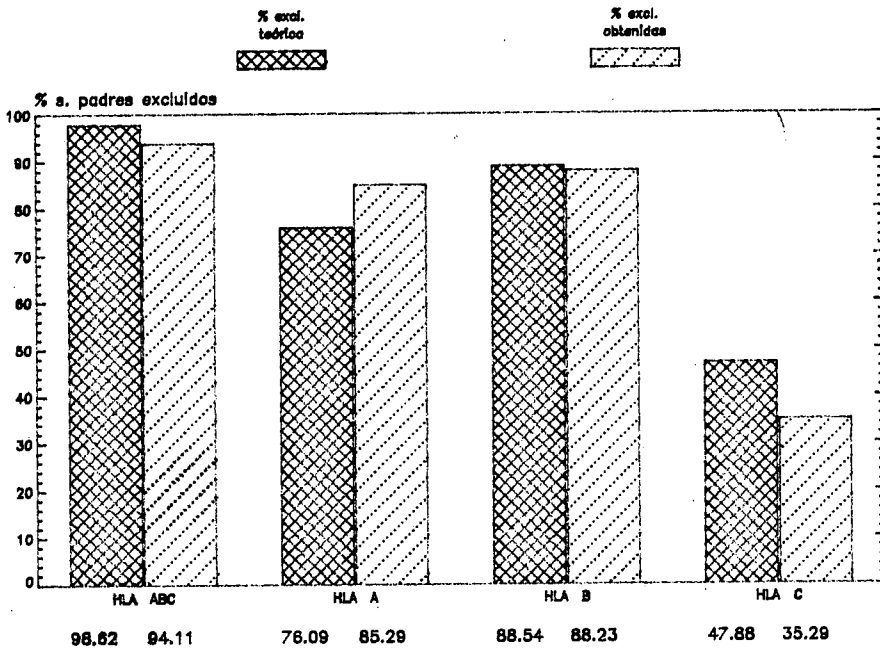


Figura 3.- Probabilidades teóricas y prácticas de exclusión del sistema HLA (100 casos).



## Capítulo 7

-----

### MARCADORES GENÉTICOS ERITROCITARIOS

=====

Emilio HUGUET y Manel GENE

-----

Los marcadores genéticos eritrocitarios constituyen históricamente los primeros caracteres humanos de transmisión mendeliana simple que se objetivaron en el hombre.

Los antecedentes de su conocimiento son difíciles de encontrar por ser la sangre de todos los seres vivos que la poseen roja, mamíferos, aves y reptiles, un elemento relacionado desde tiempo inmemorial con la vida y la muerte, la hechicería, el curanderismo, la magia, los conjuros, los filtros amorosos, las profecías y como es natural la propia medicina.

La primera interpretación documentada, es la de LANDOINE que se dio cuenta que al mezclar los hematíes de especies animales distintas solían aglutinarse. Esto sucedía en 1875 y fue relacionado con fenómenos semejantes que se objetivaban al mezclar bacterias y anticuerpos del suero. La primera observación de que ello sucedía con sangres de distintos individuos de la especie humana, fue comunicada en 1900 por LANDSTEINER, quien tomó muestras de sangre de él mismo y sus colaboradores y separó los hematíes del plasma. Al juntar los hematíes de cada individuo con el resto de plasmas, observó que podía clasificarlos en varios grupos ya que el fenómeno no era recíproco (si el plasma de un individuo aglutinaba los hematíes de otro, el plasma de este último no tenía porqué aglutinar forzosamente los hematíes del primero). La perfecta observación realizada le permitió elaborar una teoría completamente cierta a base de considerar la presencia de dos alelos que darían cuatro grupos. A los alelos los llamó A y B, de los que resultaban los grupos A, B, O y AB. Este último grupo fue postulado teóricamente ya que al ser menos frecuente, entre LANDSTEINER y sus colaboradores no había ninguno (eran dos O, dos A y dos B), siendo descrito en 1902 por sus discípulos DECASTELLO y STURLI.

Como en todo nuevo descubrimiento, pasaron varios años antes de que pudiera conocerse el alcance exacto del mismo. Para considerarlo como el primer marcador de transmisión mendeliana como exponíamos al principio hubo que trabajar mucho e investigar muchos aspectos relacionados con los grupos sanguíneos descubiertos. En 1909 BATESON escribía todavía: "Hay pocas pruebas, hasta la fecha, de herencia mendeliana de características normales en el hombre". HEKTOEN y GAY dieron el primer paso y demostraron su permanencia a través del tiempo. EPSTEIN y OTTENBERG sugirieron su heredabilidad y en 1910 von DUNGERN y HIRSZFELD realizaron un estudio de 72 familias con 348 hijos, llegando a la conclusión de que los grupos eran hereditarios. Fue HIRSZFELD quien apoyado por LANDSTEINER, implantó la nomenclatura actual, pero la presencia de ilegitimidades con padres AB de hijos O (cuatro casos en total), despistó a HIRSZFELD y von DUNGERN y elaboraron una teoría de dos pares de alelos que explicara los resultados y que al principio fue aceptada, pero al transcurrir el tiempo se vio que era errónea pues no explicaba correctamente la distribución fenotípica (si la teoría fuera correcta habría muchos más fenotipos AB). Es entonces cuando en 1924 el matemático BERNSTEIN postula la teoría de los tres alelos que resulta ser la cierta y se aclara de una vez para siempre la transmisión mendeliana del sistema ABO veinticuatro años después de su descubrimiento.

Poco después, en 1927 LANDSTEINER y LEVINE descubrieron el sistema MN constituido por un par de alelos M y N que formaban tres fenotipos posibles M, N y MN, equivalentes a los tres genotipos MM, NN y MN. En 1947 WALSH y MONTGOMERY describieron en una mujer que tuvo un hijo macerado un anticuerpo que llamaron anti-S y que los trabajos de RACE, SANGER, WALSH y MONTGOMERY en 1949 asociaron al sistema MN. Al descubrirse en 1951 por LEVINE, KUHMICHEL, WIGOD y KOCH el anticuerpo anti-s se vio que se trataba de un sistema dialélico codominante completamente ligado al MN con el que no se observó en 123 familias estudiadas ningún crossing over.

El mismo año en que se descubrió el sistema MN (1927) y como fruto de experimentos casi idénticos inmunizando conejos LANDSTEINER y LEVINE encontraron el tercer sistema al que llamaron P, en el que pudieron definir un sólo alelo, al hallar tan sólo un antisuero. En la actualidad a las personas P+ se las llama P1 y a las P-, P2.

En 1940 LANDSTEINER y WIENER culminan el descubrimiento del sistema Rh, en el que también colaboraron los trabajos de LEVINE y STETSON en 1939. El descubrimiento consistió en inmunizar conejos y cobayos

con sangre de monos *Macacus Rhesus* y observar que los anticuerpos resultantes no sólo aglutinaban los eritrocitos de los monos sino también el 85% de los humanos. De ahí el nombre del sistema (Rh) y que los individuos fueran clasificados en principio como positivos (el 85%) y negativos (el 15%). Los estudios posteriores revelaron que el sistema era mucho más complejo, ya en 1941 y en 1946 FISHER propuso la actual nomenclatura de tres pares de alelos C-c, D-d y E-e, definibles por los correspondientes antisueros. El descubierto por LANDSTEINER y WIENER era el anti-D, que es el principal. En 1945 MOURANT había descubierto el suero anti-e, que es el último que validaba la hipótesis ya que el suero anti-d no ha podido ser descrito y lamentablemente no se puede evidenciar un individuo de genotipo Dd, persistiendo la clasificación inicial de positivos y negativos respecto al alelo D: positivos los genotipos DD - Dd y negativo el genotipo dd.

COOMBS, MOURANT y RACE en 1946 al poco tiempo de haberse introducido el test de la antiglobulina, describieron un antígeno relativamente potente al que llamaron Kell que era el apellido de una madre sensibilizada por su hijo, el cual padeció una anemia hemolítica no explicable por los fenotipos Rh. Tres años después en 1949 LEVINE, BACKER, WIGOD y PONDER describieron el antisuero que definía el esperado alelo que poseen más del 95% de los individuos. Se le llamó Cellano por idénticos motivos que su alelo homólogo Kell; al ser descubierto en una mujer con ese apellido.

En 1946 MOURANT descubrió los grupos Lewis describiendo el alelo Lewis a. A pesar de que dos años después ANDRESEN encontró el anticuerpo que definía el antígeno antitético Lewis b, el sistema se resistía a que su herencia fuera desentrañada, ya que se comportaba como si no se transmitiera de forma mendeliana simple, o como si existieran genes recesivos. Años después se aclaró su relación con los individuos secretores y se descubrió que no se trataba de una característica de los hematíes sino del plasma que éstos absorben y se transforman. Esto hizo que no tuviera aplicación práctica en las investigaciones de paternidad de forma directa. Algunos autores lo utilizan para comprobar los individuos no secretores de sustancias ABH por la saliva, ya que son Lewis (a+).

CALLENDER y RACE en 1946 describieron otro grupo al que llamaron Lutheran (apellido del donante en el que se detectó el antígeno Lutheran a). En 1956 CUTBUSH y CHANARIN describieron el alelo antitético que fue llamado Lutheran b.

El propio CUTBUSH con MOLLISON y PARKIN describieron en 1950 un antígeno en un hemofílico politransfundido apellidado Duffy, al que llamaron Duffy a (Fy a). Al año siguiente IKIN, MOURANT, BLUMENTHAL y PETTENKOFER describieron el anticuerpo antitético, que fue llamado Duffy b (Fy b). La particularidad del sistema Duffy fue descubierta por SANGER, RACE y JACK, consistiendo ésta en que en la raza negra existe un tercer alelo del que no se conoce antisuero y que se presenta con una frecuencia fenotípica del 70% para los homocigotos. Al no existir antisuero no se pueden reconocer los heterocigotos con Fy a o Fy b, pero de todas formas la frecuencia génica debe estar entre el 0.8 y el 0.9

Esta última particularidad del sistema Duffy hace que su uso para la investigación de la paternidad deba realizarse con cautela, a sabiendas de la existencia de un gen Fy que se comporta como silencioso y que puede inducir a errores si no se le tiene en cuenta.

ALLEN, DIAMOND y NIEDZELA en 1951, por idéntico mecanismo al sistema Kell-Cellano (madre sensibilizada e hijo con enfermedad hemolítica), describieron el sistema Kidd (así se llamaba la señora) y este alelo por Jk a. En 1953 PLAUT, MOURANT, SANGER y RACE describieron el Jk b que faltaba para completar un sistema dialélico codominante.

Con posterioridad se describieron otros sistemas y caracteres eritrocitarios tales como los sistemas Diego, Dombrock, Yt, I, Xg y los antígenos Colton, Gregory, August, Gerbich, Bennet, Chido, etc., pero todos ellos tienen muy poco interés en vistas a su aplicación a la investigación biológica de la paternidad.

Los sistemas ABO y Rh juegan un importante papel en las transfusiones de sangre, por lo que su descubrimiento tuvo gran importancia clínica. El sistema Rh es responsable también de la mayoría de reacciones hemolíticas del recién nacido por lo que su interés es doble. El resto de grupos eritrocitarios tienen menor interés clínico, aunque son responsables de algunos casos de reacciones hemolíticas y de anticuerpos irregulares postransfusionales, por lo que algunos también juegan su papel, aunque en menor escala. Son útiles para la investigación de la paternidad además del ABO y Rh, el sistema MNSs, el sistema P, el sistema Kell-Cellano, el sistema Lutheran, el sistema Duffy y el sistema Kidd. No se debe emplear el sistema Lewis por los motivos ya mencionados.

## ASPECTOS TÉCNICOS.

---

Los marcadores eritrocitarios son productos directos o indirectos de los genes que se hallan en la membrana del hematíe como glicolípidos o glicoproteínas y que por la acción de los anticuerpos específicos (generalmente inmunoglobulinas IgG) producen el fenómeno conocido como aglutinación o agrupación de hematíes. Este es precisamente el procedimiento para ponerlos de manifiesto y aunque no todos los antígenos ni sistemas tienen el mismo grado de expresión, la técnica básica suele ser la misma: ya sea en tubo o en placa se hacen contactar hematíes lavados con antisueros específicos y tras llevarlos a la temperatura adecuada durante el tiempo necesario, se produce la aglutinación si el antígeno está presente en la superficie del hematíe. Prácticamente la única condición para poder determinar con seguridad los marcadores genéticos eritrocitarios es la indemnidad de los hematíes, lo cual es fácil de conseguir refrigerándolos y no demorando en exceso los análisis. La relación de alelos, número de fenotipos, número de genotipos, frecuencias génicas, probabilidad de exclusión y eficiencia bioestadística de cada uno de los marcadores eritrocitarios más empleados en la investigación de la paternidad se resumen a continuación:

### 1.- Sistema ABO.

---

Es un sistema de cuatro alelos A1, A2, B y O que determinan seis fenotipos A1, A2, B, A1B, A2B y O, y diez genotipos A1A1, A1O, A1A2, A2A2, A2O, BB, BO, A1B, A2B y OO. A pesar de que el número de alelos y genotipos es importante el hecho de que el alelo O se comporte como recesivo delante de los otros tres y que el alelo A1 enmascare al A2 nos deja con sólo seis fenotipos que en tres casos coinciden con el genotipo: OO, A1B y A2B, los dos últimos poco frecuentes. Estos hechos hacen que el sistema sea poco informativo y tenga una probabilidad de exclusión mucho menor a la que sería de esperar si fueran codominantes los cuatro alelos. Oscila según las frecuencias poblacionales de los alelos entre el 8 y el 15%. El alelo más frecuente es el O (0.67) seguido del A1 (0.2). Mucho menos frecuentes son el A2 (0.05) y el B (0.08). Por la recisividad del alelo O los fenotipos A y O están muy igualados y en algunas poblaciones el fenotipo A supera al O. En nuestro medio el valor Essen-Möller aproximado del sistema ABO es de 9.82. Es un sistema muy seguro de buena expresión y

fácil determinación además de rápida. Apenas se han descrito silencias (únicamente los fenotipos Bombay que son detectables por estudios familiares.)

## 2.- Sistema MNSs

-----

Es sin discusión el mejor sistema de marcadores eritrocitarios ya que es el de más probabilidad de exclusión a priori, por ser un sistema muy informativo al ser sus alelos codominantes. Presenta dos loci genéticos el MN y el Ss con un par de alelos cada uno. Deben estar muy próximos ya que la probabilidad de recombinación es prácticamente nula. Los dos alelos de cada locus hacen que cada individuo tenga cuatro alelos, lo que da un total de nueve fenotipos y diez genotipos:

fenotipos	genotipos
-----	-----
1.- MMSS	1.- MS/MS
2.- MMSs	2.- MS/Ms
3.- MMss	3.- Ms/Ms
4.- MNSS	4.- MS/NS
5.- MNSs	5.- MS/Ns
	6.- Ms/NS
6.- MNss	7.- Ms/Ns
7.- NNSS	8.- NS/NS
8.- NNSs	9.- NS/Ns
9.- NNss	10.- Ns/Ns

Su probabilidad de exclusión supera el 30% y su valor Essen-Möller es de 9.76. El alelo más frecuente es el s (0.62) seguido del M (0.58), el N (0.42) y el S (0.38). La aparición de alelos raros Mg y Su es muy rara pero debe tenerse en cuenta.

## 3.- Sistema P

-----

El sistema P posee dos alelos P1 y P2 de los que sólo se dispone de un antisuero (el anti P1), motivo por el cual aunque la frecuencia de los genotipos es de P1 0.45 y P2 0.55, la frecuencia fenotípica es de 80 P1 por cada 20 P2, al incluir los fenotipos P1 los genotipos P1P2. Su probabilidad de exclusión es de un

5%, tres veces menor que si pudieran reconocerse los genotipos P1P2. Puede prescindirse de su uso si ya se tiene una buena probabilidad de exclusión.

#### 4.- Sistema Rh

-----

Es el sistema más complejo y el primero en eficiencia bioestadística ya que su valor Essen-Möller es el más bajo de todos (9.72). Tiene tres locus genéticos muy cercanos sin apenas recombinación D C y E. En cada locus puede haber un par de alelos D y d, C y c, E y e. Ello hace que puedan formarse 8 tripletas distintas que nos darán 36 genotipos distintos. Lástima que la no determinación de los heterocigotos Dd reduce los fenotipos a 18.

Tripletas:	CDE	cDE
	CDe	cDe
	CdE	cdE
	Cde	cde
Fenotipos:	CCDEE	CCdEE
	CCDEe	CCdEe
	CCDee	CCdee
	CcDEE	CcdEE
	CcDEe	CcdEe
	CcDee	Ccdee
	ccDEE	ccdEE
	ccDEe	ccdEe
	ccDee	ccdee
Genotipos:	CDE/CDE	CdE/cDe
	CDE/CDe	CdE/cdE
	CDE/CdE	CdE/cde
	CDE/Cde	Cde/Cde
	CDE/cDE	Cde/cDE
	CDE/cDe	Cde/cDe
	CDE/cdE	Cde/cdE
	CDE/cde	Cde/cde
	CDe/CDE	cDE/cDE
	CDe/CdE	cDE/cDe
	CDe/Cde	cDE/cdE
	CDe/cDE	cDE/cde
	CDe/cDe	cDe/cDe
	CDe/cdE	cDe/cdE
	CDe/cde	cDe/cde
	CdE/CdE	cdE/cdE
	CdE/Cde	cdE/cde
	CdE/cDE	cde/cDE
	CdE/cDe	cde/cDe



La existencia de alelos Du y Cw, poco frecuentes pero que deben tenerse en cuenta, hace que en caso de exclusión en los loci C o D, deban descartarse las posibilidades de que se trate de uno de estos alelos.

#### 5.- Sistema Kell-Cellano

-----

Es un sistema de los que también invita a prescindir de él por sus bajas prestaciones. En realidad los sistemas P, Kell y Lutheran son tan poco informativos que sobreviven por tradición histórica y por su fácil determinación técnica. Tiene dos alelos el Kell (K) muy raro ya que su frecuencia génica es de 0.04 y el alelo Cellano (k) con una frecuencia altísima (0.96). Para encontrar un individuo Kell homocigoto hay que buscar entre miles de personas. La probabilidad de exclusión a priori es inferior al 4% y su eficiencia bioestadística es ridícula = 9.95 (el valor máximo es 10, que al ser logarítmico es el mínimo valor en eficiencia).

#### 6.- Sistema Lutheran

-----

Está formado por dos alelos codominantes Lu(a) y Lu(b) y lo dicho para el Kell vale también para el Lutheran. Muchos laboratorios prescinden de ambos. La frecuencia del alelo Lu(a) es del 0.045 y del Lu(b) del 0.955. Su probabilidad de exclusión a priori es del 4% y su eficiencia bioestadística es de 9.94

#### 7.- Sistema Duffy

-----

De estructura semejante al Lutheran está formado por dos alelos codominantes Fy a y Fy b y un alelo silencioso Fy muy frecuente en la raza negra, pero raro en población caucasoide. La frecuencia del alelo Fy a es de 0.39 y del alelo Fy b de 0.59. En blancos el alelo Fy se estima en el 0.01. Su probabilidad de exclusión a priori es del 18.57% y su eficiencia bioestadística de 9.89. Es un buen sistema con el inconveniente del gen silencioso.

## 8.- Sistema Kidd

-----

Es el sistema ideal de dos alelos codominantes y distribución prácticamente igual. Su tasa de silencias es muy baja. Los alelos se representan por Jk a y Jk b y sus frecuencias son respectivamente 0.51 y 0.49. Su probabilidad de exclusión a priori está a una centésima de la máxima para un sistema de dos alelos (18.74) y su eficiencia bioestadística es de 9.88

-----

Los marcadores eritrocitarios constituyen por tanto el grupo de marcadores históricamente más importante en la investigación de la paternidad y que durante decenios (hasta la década de los 60) tuvieron que solventar todas las investigaciones biológicas de la paternidad. En conjunto tienen una probabilidad de exclusión a priori del 75% y una eficiencia bioestadística de 9.02, equivalente a un valor medio ponderado de probabilidad de paternidad del 90%. El hecho que tanto los valores de exclusión a priori como el de eficiencia bioestadística estén por debajo de los que hoy día se utilizan, es quizá responsable de muchas de las ideas erróneas que sobre la investigación biológica de la paternidad circulan. Hasta hace unos quince años no se introdujeron los marcadores leucocitarios en la investigación de la paternidad, que junto a los plasmáticos y enzimáticos ayudaron a superar el 99% de exclusión a priori de que hoy se dispone con cierta facilidad. Hasta entonces con una probabilidad de exclusión a priori del 75% o lo que es lo mismo excluyendo tres de cada cuatro falsos padres se generó la idea, ya superada afortunadamente hace años, de que sólo podía valorarse la exclusión ya que la no exclusión no tenía ninguna relación con la paternidad positiva. Los individuos que recibieron información en ese sentido son reacios a admitir que en los últimos años los marcadores genéticos utilizados ya son muchos más y los eritrocitarios concretamente ya no son la base fundamental, sino un buen complemento del resto de marcadores, principalmente el sistema H.L.A y los marcadores plasmáticos y enzimáticos.

BIBLIOGRAFIA

=====

GELABERT A., ARGELAGUÉS E., PUIG Ll.  
Hemoterapia en hematología clínica.  
Barcelona (Toray) 1983

HUGUET E., GENÉ M., ERCILLA G., CORBELLA J.  
Estado actual de la investigación de la paternidad en  
Barcelona.  
Annals de Medicina (A.C.M.C.B.) en prensa

PROKOP O. (trad. Piga A.)  
Grupos sanguíneos humanos  
Barcelona (Científico-médica) 1970

RACE R.R., SANGER R.  
Los grupos sanguíneos humanos  
México (La Prensa Médica Mexicana) 1975

SANS J., CASTILLO R., LAFUENTE R., PARDO P., VIVES J.L.,  
WOESSNER S.  
Hematología clínica  
Barcelona (Doyma) 1982

## Capítulo 8

---

### PROTEÍNAS PLASMATICAS

---

Manel GENE y Emili HUGUET

---

El cuerpo humano está compuesto de billones de células, siendo éstas las unidades morfológicas y fisiológicas en la estructura de los seres vivos. Cada célula es comparable a un minúsculo laboratorio capaz de llevar a cabo la síntesis y descomposición de numerosas sustancias, a la temperatura normal del cuerpo. Las reacciones químicas se efectúan por la intervención de enzimas que actúan como catalizadores biológicos. Los enzimas son proteínas o contienen proteínas especiales comparables a máquinas moleculares capaces de efectuar todo tipo de transformaciones.

Las proteínas, juntamente con los hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos, etc..., forman parte de los componentes orgánicos de la célula. El protoplasma de una célula animal contiene de un 10 a 12% de proteínas.

El término proteína fue introducido por el químico sueco Berzelius en 1840. Etimológicamente este vocablo deriva del griego "proteo" que significa "yo ocupo el primer lugar" indicando que todas las funciones básicas en biología dependen de proteínas específicas, pudiéndose asegurar que no existe vida sin proteínas. Son la realización de la información contenida en el ácido desoxiribonucleico (DNA). Transforman dicha información en trabajo fisiológico, convirtiéndolas en componentes fundamentales de la maquinaria celular. En el cuerpo humano los distintos tipos de proteínas se distribuyen en relación a sus funciones.

#### ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS:

---

Las proteínas están formadas por largas moléculas compuestas por unidades repetidas que se enlazan mediante uniones covalentes. Estas unidades se llaman monómeros y la macromolécula resultante polímero.

Se trata de unos veinte aminoácidos diferentes que se asocian por uniones peptídicas. Esta veintena de monómeros da lugar a una cantidad innumerable de moléculas distintas, determinando así su especificidad y en ciertos casos la actividad biológica.

Las principales unidades que forman las moléculas de las proteínas son los aminoácidos naturales (abreviaciones establecidas por Brand y Edsall):

**Monoaminocarboxílicos:**

Glicina (Gli), Alanina (Ala), Valina (Val),  
Leucina (Leu), Isoleucina (Ile).

**Monoaminodicarboxílicos:**

Glutámico (Glu), Aspártico (Asp).

**Diaminomonocarboxílicos:**

Arginina (Arg), Lisina (Lys), Hidroxilisina  
(Hil).

**Con radicales hidroxilo:**

Treonina (Thr), Serina (Ser).

**Con radicales azufre:**

Cistina (Cys-Cys), Metionina (Met).

**Aromáticos:**

Fenilalanina (Phe), Tirosina (Typ).

**Heterocíclicos:**

Triptófano (Trp), Prolina (Pro), Hidroxiprolina (Hip).

Los ácidos orgánicos sustituyen un hidrógeno por un grupo amino (NH<sub>2</sub>), por ejemplo el ácido acético da lugar a la glicina o a la glicocola. La célula posee un pool de aminoácidos libres a partir de los cuales sintetiza proteínas. El grupo ácido de un aminoácido se combina con el básico del adyacente perdiendo una molécula de agua con lo que se condensan formando moléculas proteicas. Esto es lo que se denomina unión o puente peptídico. La unión de aminoácidos (desde cien a muchos miles) mediante enlaces peptídicos determinará los distintos polímeros naturales que tendrán pesos moleculares, generalmente, superiores a diez mil.

Las proteínas esenciales para cualquier forma de vida conocida tienen una determinada disposición en el espacio. La secuencia de aminoácidos condicionaría su estructura primaria y las fuerzas de unión entre diversas partes de la cadena obligan a tener una morfología en su conjunto de tipo helicoidal o de hoja plegada que se denomina estructura secundaria. Determinadas disposiciones en fragmentos de la cadena constituyen su estructura terciaria. Algunas propiedades biológicas de las proteínas están relacionadas con la estructura terciaria. La agregación de diversas cadenas forma la molécula de proteína siendo ésta su estructura

cuaternaria. A diferencia de las estructuras primaria, secundaria y terciaria que poseen una cadena polipeptídica aislada, en la estructura cuaternaria intervienen dos o más cadenas, iguales o diferentes, pero que en ambos casos se hallan unidas por uniones débiles de tipo no covalente. Así vemos que la estructura primaria, de unión peptídica, está completamente determinada por las uniones químicas o covalentes. Las estructuras secundarias y terciarias están determinadas por una serie de uniones más débiles. Iónicas o electrostáticas, uniones de hidrógeno, uniones más débiles por la interacción de cadenas colaterales no polares, y por la mutua repulsión del solvente o por la interacción de cadenas colaterales polares llamadas fuerzas de Van der Waals.

#### CARACTERISTICAS ELECTRICAS DE LAS PROTEINAS:

-----

La estructura molecular de las proteínas implica unas características eléctricas propias.

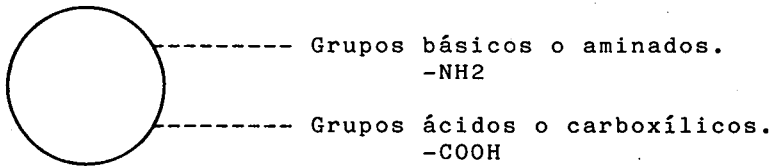
Previamente es necesario recordar los conceptos de ácido y de base. Según Brønsted y Lowry, ácido es toda substancia capaz de ceder un protón ( $H^+$ ) y base toda substancia capaz de aceptarlo. De modo que el grupo  $-COOH$  puede actuar como ácido y el grupo  $-NH_2$  puede hacerlo como una base. El que estos grupos cedan o acepten un protón dependerá de su constante de disociación  $K$ , que se expresa como  $pK$  ( $\log.1:K$ ), y que es la relación con el pH del medio.

Todos los aminoácidos son anfotéricos (o zwitterions), es decir que tienen grupos cargados tanto positiva ( $-NH_2$ ) como negativamente ( $-COOH$ ). Estos grupos se usan para las uniones peptídicas de los aminoácidos que constituyen la molécula de la proteína. Es decir que sólo persistirían los grupos terminales de las cadenas de aminoácidos  $-NH_2$  y  $-COOH$ , si no fuera por la presencia de aminoácidos dicarboxílicos y diamínicos, en los que queda, respectivamente, un grupo carboxilo o amino libre que puede disociarse e ionizarse en relación al medio en el que se hallan. Así tenemos que en los aminoácidos dicarboxílicos como el ácido aspártico y el glutámico, el grupo  $-COOH$  se disocia en  $COO^-$  y  $H^+$ . O sea que los grupos ácidos pueden perder protones ( $H^+$ ) y cargarse negativamente. En cambio los grupos básicos (Arginina y lisina) por ganancia de protones se cargan positivamente ( $-NH_2 + H^+ = -NH_3^+$ ).

Todos estos grupos llamados ionogénicos, junto con los grupos libres terminales contribuyen a las reacciones ácido-base de las proteínas y a sus.

propiedades eléctricas. La carga de una molécula proteica es el resultado de la suma de todas las cargas de los residuos laterales. El pH del medio influye sobre la carga de la molécula ya que la disociación de los diferentes grupos ácidos y básicos se produce a diferentes concentraciones de iones hidrógeno del mismo.

Resumiendo diremos que una proteína puede ser esquematizada "a groso modo" de la siguiente manera:



Es una macromolécula de características anfotéricas, es decir que se podrá comportar como ácido o como base, dependiendo de las circunstancias y de la naturaleza del medio con el que entra en reacción. Al mismo tiempo cada proteína tendrá un pH definido en el que el número de cargas positivas es igual al de cargas negativas, la carga neta global de la proteína será cero. Es decir que en un medio que posea dicho pH la proteína no se podrá comportar ni como ácido ni como base. Este pH se denomina punto isoeléctrico (pI). Cada proteína posee un pI característico y en él las propiedades fisicoquímicas de ésta (solubilidad, conductividad, etc.) se hallan modificadas. Por encima del pI predominan las cargas negativas y por debajo las positivas. El máximo de cargas positivas se halla a pH muy ácidos y el de negativas a pH muy alcalinos.

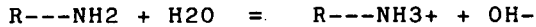
#### TECNICAS DE SEPARACION DE PROTEINAS:

-----

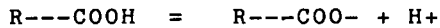
La trascendencia de las características eléctricas de las proteínas reside en ser el fundamento de sus técnicas de estudio en laboratorio, básicamente las de separación. Principalmente se estudian mediante técnicas de fundamentos electroforéticos. (Aunque existen múltiples procedimientos distintos de investigación).

La electroforesis fué un método analítico propuesto en 1930 por el bioquímico sueco Arne Tiselius debido al cual se le otorgó el premio Nobel en 1948. Se trata de un método de separación de una mezcla de partículas con carga eléctrica en solución, basado en

sus distintas velocidades de migración al estar sometida la solución a la acción de un campo eléctrico. El proceso de migración es guiado por la polarización, o carga eléctrica, neta que toman las distintas macromoléculas de características anfóteras que están ionizadas en el medio tampón empleado. Un tampón provoca la ionización de partículas que en este medio conductor sufren un desplazamiento bajo la acción de un campo eléctrico. Veremos que una proteína en medio tampón ácido, por debajo de su pI, tiene un bloqueo de las funciones ácidas y la disociación actúa sobre los grupos básicos:



La proteína cargada positivamente se desplazará hacia el cátodo (polo -) en un campo eléctrico continuo. Ocurriría lo contrario si se hallara en un medio básico.



La velocidad de migración de la partícula depende de su dimensión y de su carga, siendo factores que influyen de forma opuesta sobre la movilidad electroforética. El primero disminuye y el segundo aumenta. Influyen otros factores en dicho desplazamiento de manera que la velocidad de migración vendrá determinada por la siguiente fórmula basada en la Ley de Stokes:

$$v = \frac{Q E}{6 \pi \eta r}$$

- v= velocidad límite
- Q= carga
- E= campo eléctrico
- $\eta$ = viscosidad del medio
- r= radio de la partícula

El desplazamiento (d) será directamente proporcional al campo eléctrico (E), al tiempo de recorrido (t) y a la movilidad para el soporte utilizado. (  $d = E * t * u$  )

Sin extendernos más en este tema puesto que en la presente obra hay un capítulo dedicado a las técnicas de estudio de los diferentes marcadores empleados en investigación de paternidad, resumiremos diciendo que estas desigualdades en las velocidades de migración de las proteínas, objetivadas mediante técnicas sencillas como lo son las electroforéticas, son un reflejo de las



diferencias de estructura molecular entre unas y otras. Dicha estructura viene determinada genéticamente con lo que la electroforésis se convirtió en su medio de expresión.

A partir de aquí se sucedieron múltiples hallazgos derivados de estos principios. Fundamentalmente consistentes en la utilización de distintos soportes para efectuar las separaciones y en la combinación con otras técnicas analíticas de modo que fueron aumentado los grados de discriminación en el estudio de las proteínas. Destacaremos la invención de la inmuno-electroforesis por Grabar y Williams en 1953 ; La inmunoelectroforesis por Laurell en 1966; El isoelectroenfoque por Vesterberg en 1969; La isotacoforesis por Halung en 1970; La focalización isoeléctrica en gradientes de pH inmovilizados por Bjellquist y col. en 1982; etc.

Destacamos el isoelectroenfoque por ser una técnica analítica de fundamento electrofórico que, a diferencia de la electroforesis convencional en la que el soporte tenía un pH fijo determinado por el tampón, establece un gradiente de pH determinado. Dicho gradiente puede ser variable y más o menos estrecho. Si este gradiente comprende el pH correspondiente al punto isoeléctrico de la proteína ocurrirá que cuando ésta llegue a él durante su migración dejará de estar ionizada respecto al medio. Se comportará como eléctricamente neutra dejando de migrar y quedando focalizada. Aquí, por tanto, no se estudian diferentes velocidades de migración como ocurría en la electroforesis sino que se objetivan diferencias de punto isoeléctrico. Esto la convierte en una técnica mucho más discriminativa consiguiendo aumentar el grado de expresión genética traducido en pequeñas diferencias estructurales a nivel molecular.

#### ESPECIFICIDAD BIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS:

---

Otra gran característica de las proteínas es su especificidad biológica. Esta es especialmente manifiesta en su faceta inmunológica.

Cuando se inyecta una proteína de un animal a otro de especie distinta, éste, a su vez, elabora otras, de naturaleza globulínica, con la propiedad de reaccionar específicamente con la primera. La proteína inyectada actúa como antígeno y la del receptor como anticuerpo. Al suero del animal receptor que contiene anticuerpos se le denominará antisuero. El antisuero

puesto en contacto, en condiciones adecuadas, con la proteína que actúa de antígeno, tendrá capacidad para producir una precipitación. Esto tendrá una especial importancia para identificar proteínas y para fijarlas. Característica que se combinará con las técnicas de separación electroforética.

#### GENETICA MOLECULAR Y SINTESIS PROTEICA:

-----

En este apartado intentaremos exponer, del modo más simple posible, el proceso de síntesis de las proteínas.

La síntesis proteica requiere la presencia de un mecanismo determinante de la especificidad en la secuencia de aminoácidos que constituyen la cadena polipeptídica "o especificidad primaria de una proteína", especificidad que viene regulada genéticamente.

La información genética contenida en la molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) puede controlar la síntesis de proteínas específicas. El DNA se halla en el núcleo de las células formando la cromatina y los cromosomas (también existe DNA mitocondrial). Estos existen en número fijo para cada especie y en número par puesto que la mitad proviene del padre y la otra mitad de la madre. El DNA está formado por una doble cadena de fosfatos y de desoxirribosa dispuestos en forma helicoidal cuyos tramos forman parejas adenina (A)-timidina (T) o bien guanina (G)-citosina (C).

Desde un punto de vista estructural y funcional se define un gen como una unidad química funcional de la molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) que controla la formación de una determinada proteína.

En la síntesis de las proteínas también interviene el ácido ribonucleico (RNA) que es otro ácido nucleico parecido pero con una cadena más simple. La pentosa es una ribosa y en vez de timina existe uracilo (U). Los distintos tipos de RNA que intervienen en la transcripción son copias de los correspondientes locus en la molécula de DNA. Las regiones del DNA que determinan los genes estructurales, transcriben la información específica por medio de RNA-s mensajeros. Otras regiones del genomio denominadas determinantes para el RNA codifican los diferentes RNA-s ribosómicos y de transferencia.

Las unidades fundamentales que contienen la información para codificar un sólo aminoácido se llaman codones y están constituidas por tres nucleótidos (Triplettes). Esta información es transcrita en primer lugar en el RNA mensajero (RNA-m) que tiene una secuencia de bases complementaria, a modo de copia o molde, al DNA que sirve de modelo.

El RNA-m, al igual que el DNA, posee sólo cuatro bases, mientras que las proteínas pueden contener hasta 20 aminoácidos. La permutación de las cuatro bases permite obtener 64 triplettes (codones) con lo que es más que suficiente para codificar todos los aminoácidos.

El RNA mensajero sirve de intermediario, partiendo del DNA del núcleo y apoyándose en la superficie de los ribosomas. Allí forma un molde o negativo. A los triplettes de este molde se adaptarán las moléculas cortas de RNA-t (de transferencia) por una de las extremidades de su molécula y a la otra se irán colocando los aminoácidos formando una cadena que uniéndolos entre sí constituirán una molécula proteica.

#### PROTEINAS PLASMATICAS:

-----

La composición de la sangre total se distribuye del siguiente modo:

##### A/ CELULAS:

- Eritrocitos.
- Leucocitos.
- Trombocitos.

##### B/ PLASMA:

- Agua (91-92%).
- Sólidos (7-9%).
  - . Proteínas (7%).
  - . Compuestos inorgánicos (0.9%).
  - . Compuestos orgánicos.
  - . Secreciones internas.

La concentración total de proteínas en el plasma y sus proporciones varían de una especie a otra e incluso dentro de la misma especie. En caso de enfermedad se producen amplias variaciones. La sangre normal circulante en una persona sana contiene en su plasma 70 g./1000 de proteínas. Estas proteínas totales

se han clasificado con distintas nomenclaturas a lo largo de la historia en relación a sus métodos de detección, fraccionamiento y propiedades químicas.

En función de su movilidad electroforética en solución alcalina se distinguen los siguientes tipos de proteínas plasmáticas:

- 1.- Albúminas ( $\pm$  43 g./1000).
- 2.- Globulinas alfa-1 y alfa-2 ( $\pm$  6 g./1000).
- 3.- Globulinas beta-1 y beta-2 ( $\pm$  7 g./1000).
- 4.- Globulinas gamma ( $\pm$  11 g./1000).
- 5.- Fibrinógeno ( $\pm$  3 g./1000).

Cada uno de estos bloques está compuesto por multitud de proteínas con distintas funciones, características moleculares estructurales, etc. aunque con una cierta homogeneidad de grupo. Por ejemplo las distintas albúminas y globulinas son esferoproteínas con pesos moleculares que oscilan alrededor de 70.000 y 150.000 respectivamente, mientras que el fibrinógeno tiene una macromolécula líneal con un peso muy superior (400.000).

En el estudio de proteínas resulta difícil responder a la pregunta de cuáles se consideran plasmáticas. Se han establecido múltiples criterios, en parte porque se caracterizan débilmente y/o porque no se conoce su función.

Putnam (1975) presenta una propuesta para estandarizar los criterios que deben reunir las proteínas para ser consideradas proteínas del plasma:

- 1.- La proteína debe estar presente en el plasma después del período neonatal.
- 2.- Su síntesis debe llevarse a cabo en el hígado o en el sistema retículo endotelial.
- 3.- Su función primaria, si se conoce, debe actuar en el sistema vascular.
- 4.- La proteína debe ser secretada al flujo sanguíneo y no estar en él como resultado de daño corporal o permeabilidad capilar.
- 5.- Su concentración debe ser superior en la sangre que en los otros tejidos, excepto en las células especializadas en su síntesis.
- 6.- Deben tener una apreciable vida media en plasma y no ser transitorias.
- 7.- Su polimorfismo no deberá ser estudiado en sus tejidos de origen.
- 8.- Una verdadera proteína plasmática no debe ser resultado de productos de proteólisis, ni de catabolismo de otras proteínas. Sin embargo, los verdaderos precursores y sus formas activas, como

el plasminógeno y la plasmina, deben ser consideradas ambos como proteínas del plasma.

Entre las distintas funciones de los principales tipos de proteínas plasmáticas destacamos:

- 1.- Mantener el equilibrio físico coloidal de la suspensión de células de la sangre.
- 2.- Función de vehículo o transporte, regulando el transporte del agua del plasma y de otros productos que se fijan a la molécula y se liberan posteriormente en determinados órganos.
- 3.- Regular el pH de la sangre, actuando como tampones amortiguadores del pH sanguíneo.
- 4.- Aportar aminoácidos nutritivos a diversos tejidos con receptores para aislarlos del volumen proteico circulante.
- 5.- Intervenir en la lucha antiinfecciosa y en la coagulación.

#### PROTEINAS PLASMATICAS EN INVESTIGACION BIOLOGICA DE ----- PATERNIDAD: -----

Hasta el momento hemos enmarcado las proteínas plasmáticas en el ámbito de la biología y la medicina. Sin embargo el interés que despiertan en investigación de paternidad no viene determinado por sus funciones fisiológicas ni otras características clínicas sino por el hecho de que constituyen una serie de marcadores genéticos transmitidos a través de familias como los grupos sanguíneos antigénicos eritrocitarios y/o leucocitarios, aportando una contribución importante a la definición de la individualidad biológica.

El concepto de polimorfismo nace en las proteínas plasmáticas por la observación de pequeñas diferencias puntuales a nivel de su estructura molecular primaria que son la expresión de diferencias genéticas que se transmiten por una herencia mendeliana simple. Estas diferencias se expresan por métodos indirectos considerando sus propiedades cinéticas o sus propiedades inmunológicas (generalmente técnicas de separación sencillas de fundamento electroforético). Es decir que una misma proteína, con unas funciones específicas en el organismo de una especie, puede poseer una molécula con pequeñas variaciones que vienen determinadas genéticamente y cuya heredabilidad cumple los requisitos idóneos para la determinación de la paternidad.

Sorprendentes analogías en la posición de los aminoácidos y de los puentes disulfuro que constituyen lo que se considera una misma proteína, conducen a la idea que un gen ancestral debió evolucionar por duplicaciones seguidas de mutaciones. Desde el punto de vista electroforético, toda substitución de aminoácido (en casos de mutaciones puntuales a nivel de DNA) que afecte a uno de los cinco residuos cargados (ácido aspártico, ac. glutámico, arginina, lisina, histidina) será detectable por electroforesis. De este modo será posible reconocer en una población, no sólo el fenotipo variante del fenotipo salvaje (= el más frecuente) sino que además veremos los fenotipos de los individuos heterocigotos. La electroforesis convencional clásica se limita a distinguir las diferencias de cargas entre proteínas, de modo que toda substitución de aminoácido en el seno de un edificio macromolecular que no se traduzca en un remplazamiento polar no podrá ser discriminada por esta técnica. A la inversa, cada banda electroforética puede ser considerada como heterogénea, encerrando una población de moléculas diferentes que sólo tengan en común la carga. Se llama electromorfos a aquellas clases electroforéticas compuestas.

Se calcula que, en teoría, la proporción de alelos detectados por electroforesis representa únicamente alrededor de un tercio de los que existen realmente. Un cierto número de técnicas o de perfeccionamientos permiten de manera directa o indirecta visualizar otros tipos de situaciones de aminoácidos en una proteína dada, y por la misma, descomponer los electromorfos. (electroforesis en condiciones óptimas, inmunoelectroforesis, isoelectrofocusing, etc).

Se entiende por polimórfico el sistema genético que presenta dos o más alelos (variantes genéticas) en los que la frecuencia del más raro supera una frecuencia en la población del 0.01, (= 1%).

No todas las proteínas plasmáticas son polimórficas o, por lo menos, no les han descrito todavía su polimorfismo. Se considera la existencia de alrededor de 45 sistemas de polimorfismos proteicos séricos. Estos cumplen los requisitos de ser marcadores que caracterizan a la especie y que, por su multiplicidad, definen al individuo dentro de ella. Presentan patrones hereditarios bien definidos. Los fenotipos se pueden estudiar con relativa facilidad, utilizando pequeñas cantidades de muestra. Los fenotipos no se afectan por agentes externos, sus frecuencias varían entre razas y poblaciones. Los fenotipos son detectados desde el momento del nacimiento sin variaciones con la edad.

Resumiendo diremos que son marcadores genéticos monofactoriales que permiten el estudio de la individualidad biológica. Son objetivos, discontinuos, sin varianza ambiental y de expresividad y penetrancia totales.

En líneas generales se aceptan como principales ventajas de los polimorfismos séricos sus características de expresividad y penetrancia totales, entendiendo como tal el hecho de que son codominantes y no poseen alelos silentes o los poseen muy raramente. No precisan células vivas para su estudio por lo que la muestra puede ser almacenada por congelación. Todo ello los convierte en sistemas muy seguros.

Respecto a los inconvenientes destacamos que no tienen el grado de polimorfismo que puedan tener otros grupos de marcadores más potentes como el H.L.A. Por otro lado el material utilizado es costoso y la relación precio-información no es la ideal. En tercer lugar se podría decir que su procedimiento es lento y laborioso aunque esta característica es bastante relativa por su subjetividad y por la comparación con otras técnicas que no son más rápidas.

Se han descrito muchos polimorfismos en proteínas plasmáticas y es previsible que se vayan describiendo más en el futuro. Sin embargo, las proteínas más utilizadas actualmente en investigación de paternidad son: la alfa-1-Antitripsina (Pi.), Componente Específico de Grupo (Gc.), Transferrina (Tf.), Orosomucoide (ORM.), Properdin Factor B (Bf.), Haptoglobina (Hp.), Plasminógeno (PLG), Factor 3 y 4 del Complemento (C3 y C4), Amilasa (AMY.), inmunoglobulina Gm. (Gm.), etc.

A continuación exponemos de modo sintético las características de algunos de los principales sistemas de proteínas plasmáticas (o séricas) polimórficas empleadas en investigación de paternidad.

#### ALFA-1-ANTITRIPSINA

-----

NOMBRE: ALFA-1-ANTITRIPSINA.  
Sinónimos: Alfa-1- 35 S Glycoprotein  
Alfa-1- Seromucoide de Schultze  
(es una globulina, del grupo de las alfa  
1 glicoproteínas)  
Símbolos: Alfa-1- AT.  
Pi. (= Protease Inhibitor)

#### A.A.T.

Peso Molecular: Aprox. 50.000

Asignado al cromosoma n<sup>o</sup>: 14, extremo distal (Confirmado en 1982).

Concentración en plasma de sujeto sano: 200-400 mgr./dl.  
Valor promedio: 290 mgr./dl.

Sintetizada: En hígado.

Está presente en suero, secreciones bronquiales, orina, leche.

Punto Isoeléctrico: Cercano a 4.

**Función Biológica:** Inhibidora de proteasas inespecíficas de origen leucocitario y bacteriano (Tripsina, quimiotripsina, calicreína, plasmina, elastasa y otras). Es responsable del 90% de la actividad proteolítica del suero (inhibiendo principalmente la tripsina). Juega un papel importante en estados infecciosos e inflamatorios.

**Fisiopatología:** Aumento en procesos inflamatorios.

Los déficits de Alfa-1-Antitripsina son de origen genético y van asociados a los alelos S y Z.

En 1963, los suecos Laurell y Erikson establecieron por primera vez la relación entre la Alfa-1-AT y el enfisema pulmonar. El déficit tiene un carácter familiar ligado al alelo Z. En los individuos heterocigotos que poseen el alelo Z el poder antitripsico y los niveles plasmáticos de la proteína son del 50-60% de los del individuo sano, pero sin manifestaciones clínicas. En el homocigoto la actividad es prácticamente nula (10-15%) con manifestaciones clínicas importantes por la disminución de la inhibición de enzimas proteolíticos de origen endógeno. Básicamente la clínica es de enfisema pulmonar grave y hepatopatías de tipo cirrótico y neoplásico, entre otras enfermedades de considerable gravedad. Cada alelo controla la producción de una determinada cantidad de AAT. Por ejemplo los tipos E,F,G,I,M cursan con concentraciones normales, los tipos P,S,W poseen niveles bajos, el Z cifras mínimas y el (-) cantidades virtualmente indetectables.

**Técnicas de fenotipado:** Se estudió mediante múltiples técnicas de tipo electroforético, especialmente en electroforesis en geles de almidón y con inmunolectroforesis bidimensionales. Sin embargo la focalización isoelectrica en geles de poliacrilamida con rangos de pH comprendidos entre 2.5 y 6 permiten una mejor definición de los fenotipos y permiten subtipar el alelo M (el más frecuente). Posteriormente la utilización de gradientes de pH inmovilizados ha aumentado considerablemente el grado de discriminación de éstos. Se utiliza fundamentalmente para el estudio de las variantes del alelo Pi.M.

**Alelos descritos:** Han sido descritos más de 50 alelos



distintos de esta proteína, sin embargo los más frecuentes son los: M, S y F. El M es el más frecuente de los tres y es la inicial de "medium" por tener una movilidad electroforética media. El siguiente en frecuencia es el S, respondiendo a la inicial de "slow", por ser el de menor movilidad. El F es más anódico y de mayor movilidad por lo que responde a la inicial de "Fast". En líneas generales el M sirve de referencia para la denominación de los demás alelos descritos, puesto que los más anódicos tienen asignadas letras anteriores del abecedario, mientras que a los más catódicos (Entre los que se encuentra el anteriormente mencionado Z) se les denomina con letras posteriores alfabéticamente. La focalización isoeléctrica y especialmente la que utiliza gradientes de pH inmovilizados, ha permitido subtipar el tipo M en ocho subtipos de los cuales los más frecuentes son el M1, M2 y M3. También se ha descrito la existencia (altamente infrecuente) de alelos silentes Pi. "0" ó Pi. (-) mediante estudios familiares (Son alelos desprovistos de expresividad electroforética).

Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:

Frecuencias genéticas en Galicia (Carracedo y cols., 1987):

Pi. M1: 0.660  
M2: 0.114  
M3: 0.060  
S: 0.149  
Z: 0.009  
F: 0.005  
I: 0.001

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 31,34.

Valor Essen-Möller (E.M. value): 9.7627

Frecuencias genéticas en Barcelona (Gené y cols., 1986):

Pi. M1: 0.600  
M2: 0.190  
M3: 0.099  
S: 0.104  
Z: 0.002  
F: 0.002

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 34,64.

Valor Essen-Möller (EM. value): 9.7594

Existe una aleloclina en Europa para el alelo Pi.S, consistente en una progresiva disminución de su frecuencia poblacional que se extiende desde las poblaciones del Sud Oeste Europeo hacia el Norte del continente.

## PROTEINA Gc.

-----

**NOMBRE:** Gc. Globulina.  
**Sinónimos:** Group Specific Component (Componente específico de grupo).  
Gc. Factor.  
Vitamin D Binding Protein.  
Post albumins 2+3  
**Símbolos:** Gc.  
VDBP.  
**Peso Molecular:** Aprox. 50.800  
**Asignado al cromosoma n°:** 4; brazo largo, cercano al centrómero (confirmado en 1982).  
**Concentración en plasma de sujeto sano:** 30-55 mgr./100ml.  
**Valor promedio:** 40 mgr./100 ml.  
**Sintetizada en hígado.**  
**Punto isoeléctrico (pI):** Aproximadamente entre 4.95 y 5.10.  
**Función biológica:** Es una pro-vitamina D3. Función de fijación y transporte de la vit D.  
**Fisiopatología:** Disminuye en afecciones hepáticas graves.  
**Técnicas de fenotipado y alelos descritos:** Se ha estudiado mediante múltiples técnicas electroforéticas, especialmente en geles de poliacrilamida y en agarosa, con inmunofijación. La utilización de técnicas de focalización isoeléctrica en geles de poliacrilamida con rangos de pH 4-6, con inmunofijación o sin ella, permiten una mayor discriminación (se subtipa el alelo 1 en 1S y 1F y se objetivan mejor la multitud de alelos raros o poco frecuentes que este sistema posee). El empleo de gradientes de pH inmovilizados pK: 4,6-6,2, ofrece el mayor poder discriminativo, y suele estar indicado en la identificación de fenotipos poco frecuentes.  
El subtipo 1F es más frecuente en pigmeos y en negros.  
Los alelos raros se han denominado en relación a los más frecuentes 1S, 1F y 2. Los mutantes de la banda del 2 se denominan Gc 2 + un "apellido compuesto", consistente en una A si es más anódica o C si es más catódica y un número en relación a la distancia mayor o menor del 2 normal. Los mutantes de doble banda 1 también tendrán este "apellido compuesto" en relación a una mayor o menor separación anódica o catódica del tipo 1 normal. Existen laboratorios de referencia a nivel internacional para resolver problemas de identificación de variantes poco frecuentes.  
Se han descrito alelos silentes, sin embargo su frecuencia es inferior al 0.00%

Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:

Frecuencias genéticas en Galicia para los alelos más frecuentes (Carracedo y cols. 1987):

Gc 1S: 0.571

1F: 0.119

2: 0.308

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 29.01

Valor Essen-Möller (EM. value): 9.8001

Frecuencias genéticas en Barcelona (Gené y cols. 1986):

Gc. 1S: 0.548

2S: 0.131

2: 0.320

Probabilidad de exclusión a priori (CE.): 30.12

Valor Essen-Möller (EM. value): 9.8300

### TRANSFERRINA

-----

NOMBRE: Transferrina

Sinónimos: Siderofilina

Beta-1S-globulina

Betal-metal combining globulin

(es una Beta-1-globulina)

Símbolos: Tf.

Peso Molecular: Aprox. 76.000

Asignado al cromosoma n<sup>o</sup>: 3, en el brazo corto (confirmado en 1982)

Concentración en plasma: 200-400 mgr./100 ml.

Valor promedio: 290 mgr./100 ml.

Sintetizada en hígado.

Función biológica: Unión y transporte de hierro. También se une a otros metales: cobre, manganeso, cinc, etc.

Fisiopatología: Disminución en nefrosis y neoplasias malignas.

Técnicas de fenotipado: Se ha estudiado mediante técnicas electroforéticas, especialmente en geles de agarosa aunque no permite el subtipado de su alelo más frecuente (el Tf. C). La técnica de elección es la focalización isoeléctrica con geles de poliacrilamida con rangos de pH: 5-7. La técnica más discriminativa es la utilización de gradientes de pH inmovilizados, y su utilización suele estar indicada en identificación de fenotipos "raros", o poco frecuentes.

Alelos descritos: Se han descrito muchos alelos distintos para esta proteína. Existen más de 40 alelos distribuidos entre los subtipos de Tf C, Tf.B y Tf.D. El alelo C es el más frecuente y se

ha dividido en múltiples subtipos entre los cuales los más frecuentes son el Tf.C1, el Tf.C2 y el Tf. C3.

Se ha decrito un índice de silencias maternas del 0.12% y no se han encontrado paternas.

Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:

Frecuencias genéticas en Galicia (Carracedo y cols. 1987):

Tf. C1: 0.774  
C2: 0.179  
C3: 0.040  
C6: 0.001  
B: 0.004

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 17.87

Valor Essen-Möller (EB. value): 9.8873

Frecuencias genéticas en Barcelona (Gené y cols. 1986):

Tf. C1: 0.783  
C2: 0.169  
C3: 0.043  
B: 0.004

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 17.05

Valor Essen-Möller: 9.8657

El tipo C es el más frecuente en todas las poblaciones. El tipo B (mutante rápido) sobrepasa raramente la frecuencia 0.01 salvo en algunas poblaciones de América. La frecuencia D (mutante lento) se encuentra sobre todo en negros y amarillos, aunque su frecuencia no pasa del 0.1 (presente en algunos lugares de Africa)

#### OROSOMUCOIDE

-----

NOMBRE: Orosomucoide  
Sinónimos: Alfa-1-glicoproteína ácida  
Alfa-1-seromucoide  
(pertenece al grupo de las Alfa-1-globulina)  
Símbolos: ORM.  
Alfa1S.  
Oro.  
Or.  
Alfa1-AGP  
Peso Molecular: Aprox. 44.000  
Asignado al cromosoma n°: 9 (Confirmado. 1982).  
Recombina con la AK.1; ALA-D y ABO.  
Concentración en plasma de sujeto sano: 55-140 mgr./100ml.  
Valor promedio: 90 mgr./100 ml.  
Sintetizada en: Hígado

Punto isoelectrico (pI): 2.7 (extremadamente ácido)  
Función biológica: Su papel biológico todavía no está claro. Se une a transporte de fármacos y altera su vida media. Tiene capacidad de inactivar la heparina.

Fisiopatología: Aumento en procesos infecciosos, inflamatorios y procesos con proliferación de células malignas.

Técnicas de fenotipado: Se han propuesto múltiples técnicas de estudio desde 1962 (Schmid y cols.) hasta la actualidad (1987. Weidinger y cols.; Carracedo y cols.; Thymann y cols.). Inicialmente se estudió mediante electroforesis horizontal en gel de almidón con inmunofijación (objetivando los alelos S y F). Posteriormente se ha analizado mediante técnicas de focalización isoelectrica en geles de poliacrilamida, con y sin inmunofijación y con y sin previa desialización de la muestra con neuraminidasa. Siempre con rangos de pH particularmente ácidos. El método propuesto como el que más variantes comunes adicionales puede ofrecer es la focalización isoelectrica con gradientes de pH inmovilizados (4.2-5) e inmunofijación, previa desialización de la muestra.

Alelos descritos: En la actualidad todavía no hay uniformidad de criterios entre los principales autores sobre el tema. Sin embargo la mayoría coinciden en una denominación de los dos principales tipos en F (Fast) y S (Slow), ó 1 y 2. Los restantes alelos suelen obtenerse a partir del subtipado de los dos anteriores.

Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:  
Frecuencias genéticas en Galicia (Carracedo y cols. 1987):

ORM 1: 0.460.

ORM 2: 0.540.

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 18.67.  
Valor Essen-Möller (EM value): 9.8874

#### HAPTOGLOBINA

-----

NOMBRE: Haptoglobina

Sinónimos: Seromucoide Alfa-2  
(es una Alfa-2-glicoproteína)

Símbolos: Hp.

Peso Molecular: Aprox. 85.000 para la Hp1 y Aprox.  
170.000 para la Hp.2.

Asignado al cromosoma nº: 16, brazo largo. (confirmado. 1982)

Concentración en plasma: 100-260 mgr./100 ml. Estas tasas disminuyen y pueden ser prácticamente nulas cuando la hemoglobina entra en el plasma, entonces contribuye a disminuir las pérdidas en hierro en el organismo.

Valor promedio: 160 mgr./dl.

Sintetizada en hígado.

**Función biológica:** Se fija de manera irreversible a la hemoglobina. El complejo Hb.-Hp. tiene una importante actividad oxidante. Este complejo se destruye en hígado. (Es una transportadora de hemoglobina)

**Fisiopatología:** Disminuye en afecciones hepáticas y en anemias hemolíticas. Aumenta en inflamaciones.

**Técnicas de fenotipado:** Las principales técnicas con las que se ha tipado esta proteína son la electroforesis en gel de acrilamida y en almidón, con las que se ven el alelo 1 (más anódico) y el 2 (más catódico). Su subtipado se estudia mediante técnicas de focalización isoeléctrica.

**Alelos descritos:** Los alelos descritos inicialmente son el 1 y el 2, que actualmente se han dividido en subtipos, aunque se han descrito numerosos tipos poco frecuentes o "raros". Sus alelos están en todas las poblaciones aunque con importantes diferencias en cuanto a sus frecuencias. Se observan altas frecuencias de Hp1 en Africa Central, Amerindios del Sur e Islas del Pacífico. Y bajas frecuencias de Hp1 en Asia. En cuanto a los subtipos, en Europa el 1S es dos veces más frecuente que el Hp. 1F. El 1F es muy raro en Mongoloides mientras que en Africa es más frecuente que el 1S.

El estudio bioquímico de la secuencia de los 83 aminoácidos de las cadenas alfa de la Hp. muestra que la diferencia entre el 1S y 1F depende de un aminoácido. En el 54 el 1S posee una Glicina mientras que el 1F tiene una Lisina. Es el resultado de un crossing-over no homólogo entre dos cadenas 1S y 1F. El alelo dos es resultante de una duplicación parcial. Es una mutación relativamente reciente en la evolución y por lo que sólo existe en el hombre. Se ha descrito un índice de silencias maternas del 0.08% y paternas del 0.13%

**Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:**

Frecuencias genéticas en Galicia (Carracedo y cols. 1987):

Hp. 1: 0.4261

Hp. 2: 0.5739

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 18.47

Valor Essen-Möller (EM value): 9.8896



Frecuencias genéticas en el Sur de Alemania  
(Weidinger y cols. 1984):

Bf.S : 0.802  
Bf.F : 0.176  
Bf.S 0.7: 0.009  
Bf.F1 : 0.004  
Bf.Sb : 0.006

### PLASMINOGENO

-----

**NOMBRE:** Plasminógeno

**Sinónimos:** Profibrinolisisina

**Símbolos:** Pmg.

Pg.

PLG.

**Peso Molecular:** Aprox. 81.000 (variaciones considerables entre los distintos autores)

**Asignado al cromosoma n<sup>o</sup>:** 4, extremo del brazo corto.  
(sin confirmar)

**Concentración en plasma de sujeto sano:** 38-57 mgr./100ml.

**Valor promedio:** 30 mgr./ 100 ml.

**Función biológica:** Proenzima de plasmina (de fibrinolisisina). Es un proactivador.

**Fisiopatología:** Disminución intensa en fibrinolisis.

**Técnicas de fenotipado:** Se ha estudiado mediante técnicas electroforéticas. Especialmente mediante focalización isoeléctrica en geles de poliacrilamida, con y sin inmunofijación (rangos de pH:5-8).

**Alelos descritos:** Se ha descrito un índice de silencias maternas del 0.39% y paternas del 0.13%

**Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:**

Frecuencias genéticas en Galicia (Carracedo y cols. 1987):

PLG 1: 0.800

PLG 2: 0.199

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 13.44

Frecuencias genéticas en Barcelona (Gené y cols. 1986):

PLG 1: 0.784

PLG 2: 0.215

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 14.04

Valor Essen-Möller (EM. value): 9.8965



### FACTOR 3 del COMPLEMENTO

---

NOMBRE: Factor 3 del complemento.  
Sinónimos: Componente C3  
Globulina- Beta1-C  
Símbolos: C3  
Peso Molecular: Aprox. 185.000  
Asignado al cromosoma nº: 19 (sin confirmar)  
Concentración en plasma de sujeto sano: 50-150 mgr/100ml.  
Valor promedio: 110 mgr./100ml.  
Función biológica: Factor de complemento. Transformando en el suero en globulinas Beta1A y Alfa2D. (Juega un papel importante en la resistencia a las infecciones bacterianas)  
Fisiopatología: Disminuye en las enfermedades auto-inmunes. (Glomerulonefritis, Lupus eritematoso, etc)  
Técnicas de fenotipado: El polimorfismo genético de la fracción C3 fué descrito en 1968 por dos grupos de investigación distintos. Se ha estudiado principalmente por electroforesis en gel de agarosa.  
Alelos descritos: Habitualmente consta de tres fenotipos determinados por dos alelos (F y S, en relación a la velocidad de migración). Se ha descrito un número considerable de alelos cuya frecuencia es débil (raros), y no existe uniformidad de criterios en su nomenclatura, por parte de los principales autores. Alper propone una denominación F y S, con un "apellido" consistente en un número relacionado con su velocidad de migración. De este modo F1 sería una variante más rápida que F, y S1 más lenta que S.  
Sus frecuencias varían notablemente entre poblaciones. Por ejemplo el C3 F está prácticamente ausente en lapones, amarillos y amerindios, y es muy baja en los negros.  
Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:  
Frecuencias genéticas en Galicia (Goedde y cols.):  
C3. F : 0.208  
C3. S : 0.783  
C3. S 0.5 : 0.007  
Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 14.76  
Valor Essen-Möller (EM value): 9.9200

## AMILASA

-----

El polimorfismo de la amilasa está constituido por el sistema amilasa 1 (salival) que posee un mínimo grado de polimorfismo y tasas pequeñas en plasma que obligan a estudiarla en saliva, y por el sistema amilasa 2 (pancreática) cuyo grado de polimorfismo es superior, al igual que sus tasas en sangre. Por otro lado es necesario precisar que se trata de un enzima que no se ciñe estrictamente a los criterios estándar establecidos por Putnam (1975) para que una proteína sea considerada proteína plasmática. Sin embargo la situamos en este capítulo por ser el plasma el fluido biológico en el que se procede a su fenotipado.

**NOMBRE:** Amilasa 2.

**Sinónimos:** Amilasa pancreática.

Alfa (1→4) Glucan-4-Glucanohidrolasa.

**Símbolos:** AMY 2

**Asignado al cromosoma nº:** 1, brazo corto (confirmado. 1982)

**Concentración en plasma:** (Total) 90-324µ/l.

**Sintetizada en:** Células acinares del páncreas y en menor proporción, en hígado y en trompas de ovario.

**Está presente en plasma y orina.**

**Función biológica:** Hidrolizar los carbohidratos.

**Fisiopatología:** Aumenta en pancreatitis, parotiditis, rotura de embarazo tubárico y en isquemia mesentérica.

Disminuye en hepatitis y hepatopatías crónicas.

**Técnicas de fenotipado:** Se ha estudiado mediante electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo su polimorfismo se objetiva mejor mediante focalización isoeléctrica en geles de poliacrilamida en distintos rangos de pH. (Hay autores que proponen un gradiente total de 5-9.5 y otros de 3.5-9.5. Sin embargo siempre deben contener el rango 6-8 puesto que se estima que comprende su punto isoeléctrico). A diferencia del resto de proteínas, que se objetivan mediante fijado y teñido, la amilasa se revela con un sustrato de almidón mediante el cual se reproduce su actividad fisiológica sobre el gel (mediante un sobregel con agarosa y almidón o con un papel impregnado de una solución tampón que también contiene almidón. Luego se tiñe con yodina o lugol).

**Alelos descritos:** Existen diversas denominaciones de los tres principales alelos. Entre ellas destacamos la denominación de AMY A, B y C. y también la de AMY2 1, 2 y 3. (Se ha descrito un cuarto alelo muy raro el AMY2 4).

Características poblacionales y sus correspondientes valores en estudios de paternidad:

Posee un pequeño grado de polimorfismo puesto que el alelo AMY2 1 posee frecuencias superiores al 0.95 para la población blanca, mientras que el AMY2 2 se sitúa alrededor del 0.05 y el AMY3 es una característica de la raza negra.

Frecuencias genéticas en Galicia (Blazquez J.L. y cols. 1987):

AMY 2. 1: 0.9708

2: 0.0292

Probabilidad de exclusión a priori (C.E.): 2.75

-----

BIBLIOGRAFIA

=====

BLOMBACK B.; HANSON L.Å.

"Plasma Proteins"

Chichester. Ed. John Wiley & Sons. 1979.

CARRACEDO A.; CONCHEIRO L.; RODRIGUEZ CALVO M.S.;  
MONTIEL M.D.

"Plasma protein and red cell enzyme groups in Galicia,  
North West Spain"

Z. Rechtsmed. (1987) 98: 133-140.

CARRACEDO A.

"Typing of serum protein genetic markers in bloodstains  
using isoelectric focusing"

in: Lee H.C.; Gaensslen R.E. eds.

"Advances in Forensic Science"

Foster City, California. Biomedical Publications. 1985.

DE ROBERTIS E.D.P.; NOWINSKI W.W.; SAEZ F.A.

"Biología Celular"

Buenos Aires. Ed. El Ateneo. 1973.

EGOZCUE J.; ANTICH J.; BALLESTA F.; GOYANES V.;  
IZQUIERDO L.; TAMPARILLAS M.; TAVARES A.

"Genética médica"

Barcelona. Ed. Espaxs. 1978.

FARRERAS P.; CISCAR F.

"Diagnóstico hematológico. Laboratorio y clínica"

Barcelona. Ed. Jims. 2ª ed. 1974.

GAENSSLEN R.E.

"Sourcebook in Forensic Serology, Immunology and Biochemistry"

Washington D.C. U.S. Government Printing Office. 1984.

GENE M.

"Estudio de los marcadores genéticos moleculares: alfa-1-antitripsina (Pi.); Group Specific Component (Gc.) y Transferrina (Tf.) en el Area Metropolitana de Barcelona (Region I).

Barcelona. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 1985.

GOUDEMAM M.; SALMON C.H.

"Immuno-hématologie et immunogénétique"

Paris. Ed. Flammarion. 1980.

HUGUET E.; GENE M.; ERCILLA G.; CORBÉLLA J.

"Estado actual de la Investigación de la Paternidad en Barcelona"

Annals de Medicina. Acadèmia Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears. En prensa.

PASCALI V.L.

"Isoelectric Focusing Techniques and their application to serum protein genetic marker typing"

in: Lee H.C.; Gaensslen R.E. eds.

"Advances in Forensic Science"

Foster City, California. Biomedical Publications. 1985.

SEGER J.; LUCOTTE G.

"La pratique de l'électrophorèse appliquée à la détection des polymorphismes humains".

Paris. Ed. Masson. 1981.

## Capítulo 9

---

### POLIMORFISMOS ENZIMATICOS DEL ERITROCITO

---

Angel CARRACEDO, M<sup>a</sup> Victoria LAREU y Francisco BARROS

---

#### 1.- GENERALIDADES

Los polimorfismos enzimáticos del interior del hematíe, constituyen uno de los principales grupos de marcadores genéticos que son aplicables a la investigación biológica de la paternidad, tanto por el elevado poder discriminativo que poseen como por la seguridad de su fenotipado.

El primer paso en el descubrimiento de los polimorfismos enzimáticos se produjo cuando, en 1957, Hunter y Markert (1), consiguieron demostrar que la actividad de algunos enzimas como esterases, tirosinasas y fosfatasas podía ser detectada después del desarrollo electroforético, sobre geles de almidón, de extractos tisulares, si se empleaban técnicas específicas de desarrollo histoquímico, que fueron denominadas "zimogramas".

Ya en aquel entonces la electroforesis analítica en geles de almidón, sobre todo desde los trabajos de Smithies en 1955 (2) había alcanzado un notable desarrollo, y la nueva técnica descubierta del zimograma fue rápidamente adaptada al estudio de diferentes enzimas de fuentes diversas.

Vesell y Bearn en 1957 y 1958 (3,4) observaron la existencia de heterogeneidad en la lactato y en la malato deshidrogenasa, y pronto fueron descubiertos otros muchos fenómenos de heterogeneidad. Markert y Moller en 1959 (5) propusieron denominar a estas formas isoenzimas, término que hoy día es de uso común.

Como el resto de las proteínas, y en un sentido funcional, los enzimas pueden poseer una simple cadena polipeptídica o formas multiméricas con dos o más subunidades polipeptídicas. Los enzimas eritrocitarios suelen ser multiméricos, y pueden ser separados en dos categorías: aquellos que poseen dos o más subunidades en una proporción específica, y aquellos (como la ESD o la LDH) que contienen subunidades con proporciones variables. Cuando la subunidad posee aminoácidos

idénticos se denominan "homómeros" y cuando no son idénticos se denominan "heterómeros".

Las diversas formas moleculares de los enzimas pueden ser originadas de formas muy diversas (Markert, 1968) (6). Un enzima consistente en una simple cadena polipeptídica codificada por un único gen puede existir en varias formas si el locus génico es multialélico. Dos o más loci diferentes pueden controlar la síntesis de diferentes cadenas polipeptídicas que pueden funcionar independientemente o conjuntamente.

El número de combinaciones de polímeros funcionales también puede variar. La actividad puede estar asociada a una única forma polimérica (como un tetrámero), o más de una puede ser activa (como un dímero y un tetrámero).

Finalmente muy diversas modificaciones post-traslacionales pueden originar una heterogeneidad molecular.

Ejemplos de posibles estructuras para varias formas de enzimas multiméricos, se exponen a continuación.

	Monómero	Dímero	Trímero	Tetrámero
Homómero	$\alpha 1$	$\alpha 1\alpha 1$	$\alpha 1\alpha 1\alpha 1$	$\alpha 1\alpha 1\alpha 1\alpha 1$ $\alpha 1\alpha 1\alpha 1\alpha 2$
Heterómero		$\alpha 1\alpha 2$	$\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ $\alpha 1\alpha 2\alpha 2$	$\alpha 1\alpha 1\alpha 2\alpha 2$
Homómero	$\alpha 2$	$\alpha 2\alpha 2$	$\alpha 2\alpha 2\alpha 2$	$\alpha 1\alpha 2\alpha 2\alpha 2$ $\alpha 2\alpha 2\alpha 2\alpha 2$

Tabla 1: subunidades de isoenzimas homoméricas y heteroméricas en heterocigotos, en los que un alelo determina la subunidad polipeptídica 1 y otro alelo la subunidad polipeptídica 2. (según Dykes, 1985) (7).

En este capítulo nos ocuparemos únicamente de los polimorfismos de enzimas eritrocitarios, que poseen bases genéticas perfectamente definidas y son habitualmente utilizados en la investigación biológica de la paternidad, si bien de una forma esquemática, orientado un poco en base a la experiencia personal de los autores.

Se pueden encontrar excelentes revisiones de estos marcadores en Harris (1975) (8), Harris y Hopkinson (1976) (9), Becker (1975) (10) y Saferstein (1976) (11).

## 2.- ENZIMAS ERITROCITARIOS POLIMORFICOS.

Solamente incluiremos en el siguiente listado los sistemas polimórficos en caucasoides, entendiéndose por polimorfismo la existencia en un locus determinado de dos o más alelos, siendo la frecuencia del más común de 0,99 ó menor.

No se incluyen enzimas polimórficos no eritrocitarios o que no se determinen ordinariamente en eritrocitos (como la Pep A).

E.C.	Enzima	Locus
1.1.1.44	Fosfogluconato deshidrogenasa	PGD
1.1.1.49	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Gd
2.6.1.2	Transaminasa-glutámico-pirúvica	GPT
2.7.4	Uridín monofosfo-kinasa	UMPK
2.7.4.7	Adenilato-kinasa	AK1
2.7.5.1	Fosfoglucomutasa	PGM1
2.7.7.12	Galactosa-1-fosfato uridil-transferasa	GALT
3.1.3.18	Fosfoglicolato fosfatasa	PGP
3.1.1.1	Esterasa D	ESD
3.1.3.2	Fosfatasa ácida	ACP1
3.3.1.1	S-Adenosil-homocistein-hidrolasa	SAHH
3.5.4.4	Adenosin desaminasa	ADA
4.2.1.24	Delta-Aminolevulinato deshidrasa	ALADH
4.4.1.5	Glioxalasa I	GLO

## 3.- CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES

### 1.1.1.44 Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD) (6-PGD)

Otras denominaciones: 6-fosfogluconato deshidrogenasa, 6-fosfo-D-gluconato: NADP+2-oxido-reductasa.

Reacción que cataliza:  
 $6\text{-fosfogluconato} + \text{NADP} = \text{D-ribulosa-5-fosfato} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$

Distribución tisular: en todos los tejidos.

Estructura: dimérica.  
Ubicación cromosómica del locus: cromosoma 1.  
Referencias (12-15).

1.1.1.49 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Gd) (Glc6PD)

---

Otras denominaciones: D-Glc6P: NADP+1-oxido-reductasa  
Reacción que cataliza:  
D-glucosa-6-fosfato + NADP = 6-fosfogluconato + NADP

Distribución tisular: en todos los tejidos.  
Estructura: dimérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma X.  
Referencias (16-19).

2.6.1.2 Transaminasa-glutámico-pirúvica (GPT)

---

Otras denominaciones: Alanin-aminotransferasa,  
transaminasa glutámico-alanina, transaminasa  
glutamato-piruvato, L-aspartato: 2-oxoglutarato  
aminotransferasa.  
Reacción que cataliza:  
L-Alanina + 2-oxoglutarato = Piruvato + L-glutamato

Distribución tisular: en todos los tejidos.  
Estructura: dimérica.  
Ubicación cromosómica: locus autosómico (probable-  
mente cromosoma 4).  
Referencias (20-23).

2.7.4 Uridin monofosfo-kinasa (UMPK)

---

Otras denominaciones: uridin monofosfato kinasa.  
Reacción que cataliza:  
Uridín monofosfato + ATP = Uridín difosfato + ADP

Distribución tisular: hematíes, leucocitos y fibro-  
blastos.  
Estructura: monomérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 1.  
Referencias (24-27).

2.7.4.3 Adenilato Kinasa (AK1)

---

Otras denominaciones: Miokinasa, ATP: AMP fosfo-  
transferasa.  
Reacción que cataliza:  
ATP + AMP = 2ADP

Distribución tisular: en hematíes. En leucocitos se  
expresa la AK2 pero no la AK1.  
Estructura: monomérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 9 (AK1).  
Referencias 28-31).



### 2.7.5.1 Fosfoglucomutasa (PGM1)

---

Otras denominaciones: alfa-D-glucosa-6-fosfato:  
alfa-D-glucosa-1-fosfato fosfotransferasa.  
Reacción que cataliza:  
alfa-D-glucosa-1-fosfato = -D-glucosa-6-fosfato

Distribución tisular: en todos los tejidos.  
Estructura: monomérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 1 (PGM1).  
Referencias (32-35).

### 2.7.7.12 Galactosa 1-fosfato uridil transferasa (GALT)

---

(Gt)

---

Otras denominaciones: Hexosa-1-fosfato uridil  
transferasa, uridil transferasa, Gal-1-PUT, UDP  
galactosa: alfa-D-galactosa-1-fosfato-uridil trans-  
ferasa.

Reacción que cataliza:  
UDP glucosa + alfa-D-galactosa-1-fosfato =  
alfa-D-glucosa-1-fosfato + UDP glucosa

Distribución tisular: hematíes, leucocitos, fibro-  
blastos y algunos tejidos como hígado, corazón y  
riñón.  
Estructura: trimérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 9.  
Referencias (36-39).

### 3.1.1.1 Esterasa D (ESD) (EsD)

---

Otras denominaciones: Acetilesterasa D  
Reacción que cataliza:  
Ester carboxílico + H<sub>2</sub>O = Alcohol + Acido carboxílico

Distribución tisular: en todos los tejidos.  
Estructura: dimérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 13.  
Referencias (40-43).

### 3.1.3.2 Fosfatasa ácida (ACP1) (EAP) (AcP)

---

Otras denominaciones: Ortofosfórico monoester  
fosfohidrolasa.  
Reacción que cataliza:  
Monoester ortofosfato + H<sub>2</sub>O = Alcohol + Ortofosfato

Distribución tisular: en casi todos los tejidos.  
Se suele denominar según su origen como ACP  
eritrocitaria, ACP prostática, ACP placentaria,  
etc.

Estructura: monomérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 2.  
Referencias (44-47).

#### 3.1.3.18 Fosfoglicolato fosfatasa (PGP)

---

Otras denominaciones: 2-Fosfoglicolato fosfohidrolasa.  
Reacción que cataliza:  
 $2\text{-Fosfoglicolato} + \text{H}_2\text{O} = \text{Glicolato} + \text{Ortofosfato}$

Distribución tisular: en todos los tejidos y células sanguíneas. La actividad en músculo cardíaco y esquelético es muy elevada.  
Estructura: dimérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 3.  
Referencias (48-50).

#### 3.3.1.1 S-Adenosil-homocisteín-hidrolasa (SAHH)

---

Enzima eritrocitario nada conocido en cuanto a su distribución tisular, estructura o ubicación cromosómica. Todos los datos que se conocen del mismo pueden verse en Scheil et al. (1985) (51).

#### 3.5.4.4 Adenosín deaminasa (ADA)

---

Otras denominaciones: Adenosín aminohidrolasa  
Reacción que cataliza:  
 $\text{Adenosina} + \text{H}_2\text{O} = \text{Inosina} + \text{NH}_3$

Distribución tisular: en todos los tejidos pero con patrones muy variables.  
Estructura: monomérica.  
Ubicación cromosómica: cromosoma 20.  
Referencias (52-55).

#### 4.2.1.24 Delta-Aminolevulinato dehidrasa (ALADH)

---

Aunque de interés clínico, es poco conocido desde el punto de vista genético. Lo poco que de ella se conoce puede encontrarse en Battistuzzi (1981) (56). Actúa en la ruta metabólica del anillo hemático, catalizando la condensación de dos moléculas de ácido delta-aminolevulínico para formar el anillo pirrólico del porfobilinógeno. El locus del que depende está ubicado en los brazos largos del cromosoma 9.

#### 4.4.1.5 Glioxalasa I (GLO I)

---

Otras denominaciones: Lactoil-glutationa liasa, S-lactoil glutationa metilglioxal-liasa.  
Reacción que cataliza:

S-lactoil-glutationa = glutationa + metilglioxal

Distribución tisular: en hemáties. La mayor parte de los tejidos no están estudiados.

Estructura: dimérica.

Ubicación cromosómica: cromosoma 6.

Referencias (57-60).

#### 4.- VARIANTES ALELICAS

Sistema	Alelos comunes	Otras variantes raras
PGD	PGD*A, PGD*B (PGD*C)	PGD*ELCHO, PGD*RICHMOND PGD*FREIBERG, PGD*KADAR PGD*NATAL, PGD*BOMBAL
Gd	Gd*A+, Gd*A-	Gd*CANTON, Gd*ATHENS Gd*MEDITERRANEO
GPT	GPT*1, GPT*2	GPT*3, GPT*4
UMPK	UMPK*1, UMPK*2	UMPK*3, UMPK*4
AK1	AK*1, AK*2	AK*3, AK*4, AK*5
PGM1	PGM*1+, PGM*1- PGM*2+, PGM*2-	PGM*4, PGM*5, PGM*7 PGM*8
GALT	GALT*A, GALT*D1 GALT*D2, GALT*LA	GALT*G, GALT*RENNES, GALT*INDIANA
ESD	ESD*1, ESD*2, ESD*5	ESD*3, ESD*4
ACP1	ACP*A, ACP*B, ACP*C	ACP*D, ACP*E, ACP*R
PGP	PGP*1, PGP*2, PGP*3	-
SAHH	SAHH*1, SAHH*2, SAHH*3	-
ADA	ADA*1, ADA*2	ADA*3, ADA*4, ADA*5, ADA*6
ALADH	ALADH*1, ALADH*2	-
GLO	GLO*1, GLO*2	GLO*3

## 5.- TECNICAS DE DETERMINACION

Aunque en principio el polimorfismo de los sistemas enzimáticos eritrocitarios fue descubierto por electroforesis en geles de almidón (SGE), esta técnica va quedando relegada en el análisis de la mayor parte de los sistemas por métodos más resolutivos como la focalización isoeléctrica (IEF) o el uso de inmovilinas (IPG) o híbridas (HIEF), o más cómodas y baratas como la electroforesis en acetato de celulosa (CAE) o agarosa (AGE).

Exponemos a continuación las técnicas que consideramos de elección y las alternativas para el estudio de estos marcadores.

Enzima alternativas	Técnica de elección	Técnicas
PGD	CAE	SGE
Gd	CAE	SGE
GPT	IEF	SGE
UMPK	SGE	
AK1	CAE	SGE
PGM1	IEF	HIEF
GALT	IEF	HIEF
PGP	SGE	
ESD	IEF	SGE
ACP1	IEF	CAE
SAHH	SGE	
ADA	CAE	SGE
ALDH	SGE	
GLO	SGE (+AGE)	

## 6.- METODOS ELECTROFORETICOS

Como quiera que los métodos electroforéticos de separación son muchas veces comunes para varios marcadores, con objeto de simplificar este capítulo, esquematizaremos los métodos de elección utilizados:

- CAE

Esta técnica es de elección para la determinación de 6-PGD, Gd, ADA y AK.

Para su determinación se pueden utilizar conjuntamente el mismo tampón e incluso en algunos casos realizar recorridos simultáneos.

Como membranas de acetato de celulosa recomendamos las tiras de Cellogel (5,7 X 14 cm).

a) Tampón:

7,5 g NaH PO<sub>2</sub> .H<sub>2</sub>O (anhidro 6,52 g)

2 4 2

2,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O ó 2,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
 Disueltos en 900 ml de agua destilada. Ajustar a pH 6,25 con NaOH 10 N, llevar hasta 1000 ml y en el momento de su uso diluir 1:2 con agua destilada.

- b) Lugar de aplicación:  
 Cátodo para ADA, 6-PGD y Gd  
 Central para AK  
 (Aplicador semimicro de Chemetron).
- c) Condiciones electroforéticas:  
 200 V durante 45 minutos (Amperaje de 2 ó 3 mA por tira)

- IEF (PAGIF)

Es la técnica de elección para la determinación de PGM, GALT, ESD, ACP1 y GPT.

Aunque el uso de geles de agarosa (AGIF) es perfectamente válido, por cuestiones de comodidad se suele recurrir a la poliacrilamida (PAGIF).

- a) Características de los geles:  
 T= 5%-6%  
 C= 3%  
 Estabilizantes: Sacarosa (12%) (a elección)  
 Polimerización: 2% Riboflavina (30 mg en 100 ml de agua destilada) y luz UV (360 nm)
- b) Rangos de pH:

Sistema	Rango	Anfolitos (2,8%)
PGM1	5-7	Ampholine pH 5-7
GALT	5-7	Ampholine pH 5-7
ESD	4-6,5	Ampholine pH 4-6 y Pharmalyte 4-6,5 (1:1)
ACP1	4-8	Ampholine pH 4-6 y Ampholine 6-8 (1:1)
GPT	4-8	Ampholine pH 4-6 y Ampholine 6-8 (1:1)

c) Soluciones de electrodos:

Rango de pH	Anodo (+)	Cátodo (-)
4-6,5	Ac.Fosfórico 1M	Etanolamina 1%
4-8	Ac.Fosfórico 1M	NaOH 1N
5-7	Ac. Acético 1%	Etanolamina 1%

d) Tratamiento de las muestras:

Sistema	Tratamiento
PGM1	Hemolizado diluido 1:1 con DTT 0,05 M
AcP	idem
EsD	idem
GALT	Hemolizado puro y fresco
GPT	idem

e) Forma y lugar de aplicación:

Sistema	Tamaño del papel Whatman 3	Lugar de aplicación
PGM1	0,5 x 0,5 cm	1 cm del ánodo
GALT	0,5 x 1 cm	1 cm del ánodo
ESsD	0,5 x 0,5 cm	1 cm del cátodo
ACP1	0,5 x 0,5 cm	2 cm del ánodo
GPT	0,5 x 1 cm	1 cm del ánodo

Los papeles se deben retirar al cabo de 30 minutos.

f) Condiciones electroforéticas (para placas de 10x10 cm):

Sistema	W	V	mA	Temperatura	Tiempo
PGM1	2,5	1500max	No limitado	+10°C	3 h
GALT	2,5	1500max	No limitado	+10°C	3.5 h
ESD	2,5	2000max	No limitado	+10°C	4 h
ACP1	2,5	1500max	No limitado	+10°C	2 h
GPT	2,5	1200max	No limitado	+10°C	4.5 h

La focalización se debe controlar en cuanto a tiempo por la focalización de la hemoglobina. Debe de ser completa para la PGM y GALT. Para la ESD y GPT el tiempo de focalización debe de exceder al de la hemoglobina. Para la ACP el desarrollo debe de interrumpirse cuando la focalización comienza.

Si el laboratorio dispone de sistemas automatizados tipo PhastSystem, el protocolo empleado debe de ser el siguiente (geles de 5 x 5 cm):

Aplicación de la muestra			1,2		0 Vh
Subida del aplicador			1,3		0 Vh
Alarma			1,1		70 Vh
SEP 1.1	2000 V	2,0 mA	3,5 W	15°C	15 Vh
SEP 1.2	200 V	2,0 mA	3,5 W	15°C	15 Vh
Para todos los sistemas excepto ACP:					
SEP 1.3	2000 V	5,0 mA	3,5 W	15°C	450 Vh
Para ACP:					
SEP 1.3	2000 V	5,0 mA	3,5 W	15°C	350 Vh

---

- SGE

La electroforesis en geles de almidón es el sistema de elección para el análisis del polimorfismo de la UMPK, PGP, SAHH, ALADH y GLO, aunque en este último marcador la electroforesis mixta agarosa-almidón puede ser un sistema alternativo válido.

Algunos sistemas pueden ser recorridos simultáneamente.

La concentración del almidón utilizada será del 11-12%.

a) Tampones:

Sistema	Puente	Gel
UMPK	0,41M ac, cítrico a pH 6,5 con NaOH 10N	0,005M DL-histidina ajustada a pH 6,5 con NaOH 1N
PGP	0,1M TRIS/0,1M maleato/ 0,01M EDTA diNa/0,01M Cl2Mg a pH 7,2 con NaOH 1N	Tampón puente diluido 1:10 pH 7,2. Añadir 0,1% DTT antes de desgasificar
SAHH	0,1M TRIS, pH 8 con CLH 1N	diluido 1:10 el del puente
ALADH	0,4M ac. cítrico 1,13N NaOH pH 6	0,02M histidina-ClH 0,01N NaOH, pH 6
GLO	0,04M HEPES a pH 7,5 con NaOH 10N	diluido 1:14 el del puente

b) Condiciones electroforéticas:

Sistema	Lugar aplicación	Volt.	Tiempo	t°C
UMPK	Cátodo	4,5V/cm	17 h	10°C
PGP	Cátodo	3 V/cm	17 h	10°C
SAHH	Cátodo	5 V/cm	17 h	10°C
ALADH	Cátodo	4 V/cm	15 h	4°C
GLO	Cátodo	20 V/cm	45 min	10°C

7.- METODOS DE DETECCION Y REVELADO

Aunque en principio sólo era posible detectar enzimas que catalizaban reacciones muy simples como estererasas o fosfatasas, a partir de 1960 se desarrollaron métodos, cada vez más complejos, para la detección de enzimas después de desarrollos electroforéticos. Estos métodos que conllevan a veces la utilización de 2 ó 3 enzimas adicionales y coenzimas, junto con la obtención de nuevas sales de tetrazolio, permiten que en la actualidad, virtualmente, todo tipo de enzimas puedan ser detectados electroforéticamente.

Aunque existen diferentes métodos de tinción de enzimas, consideraremos, únicamente, aquellos que sirven para la detección de polimorfismos de enzimas eritrocitarios:

1) Métodos de tinción cromogénica.

Son métodos muy simples que se utilizan en la detección de algunas hidrolasas. Un substrato no coloreado se convierte en un producto coloreado por la acción del enzima, y así se detecta.

Un ejemplo es el uso de fosfato de fenolftaleína para la determinación de la ACP1.

2) Métodos de tinción fluorogénicos.

Consisten en la producción de productos altamente fluorescentes por la acción del enzima sobre substratos no fluorescentes (lo que se denomina tinción por fluorescencia positiva) o en la producción de zonas sin fluorescencia, a partir de substratos fluorescentes (tinciones por fluorescencia negativa).

Las tinciones por fluorescencia positiva suelen utilizar derivados de la 4-metilumbeliferona (fluorescencia en estado negativo) como substratos, y son especialmente valiosas para la detección de las hidrolasas.

La mayoría de las hidrolasas poseen una actividad óptima en condiciones ácidas, pero la metilumbeliferona



exhibe una actividad óptima sólo en condiciones alcalinas. Por ello después de realizarse la primera parte de la tinción en un tampón ácido, la superficie de la matriz puede alcalinizarse con un tampón alcalino o con vapores de amonio, si bien las zonas de fluorescencia difunden, entonces, con mayor rapidez.

Algunos derivados de la fluoresceína pueden también ser utilizados como sustratos para tinciones positivas fluorescentes.

Las tinciones por fluorescencia negativa son en general menos sensitivas y más difíciles, y sólo son utilizadas para la determinación de algunas deshidrogenasas que generan coenzimas oxidados del tipo de NAD o NADP, no fluorescentes bajo luz ultravioleta, a partir de coenzimas reducidos NADH o NADPH altamente fluorescentes. Si a ésta reacción se puede acoplar la reducción de una sal de tetrazolio, y generar así una tinción positiva, el resultado será más claro.

### 3) Métodos de tinción por "detección química".

Es un grupo heterogéneo que utiliza reacciones químicas complejas, excluyendo los colorantes por transferencia de electrones ("electron transfer dyes") y que producen compuestos coloreados en los lugares de actividad del enzima.

Pueden ser tinciones tanto negativas como positivas. Entre las primeras un ejemplo es la detección de amilasas, en un sustrato de almidón, y entre las segundas la detección de ACP1 mediante fosfato de  $\beta$ -naftilo.

### 4) Métodos de tinción por "transferencia de electrones" ("electron transfer dyes").

Es el método más habitual de detección de sistemas enzimáticos después de electroforesis. Se pueden dividir en dos grandes grupos: los que utilizan como colorante el metil-tiazolil-tetrazolio (MTT) que es un aceptor de reacciones de deshidrogenación, y los que utilizan el 3-amino-etil-carbazol que es un aceptor para oxidasas y peroxidasas.

El MTT se reduce por transferencia de electrones a un producto azul oscuro e insoluble que es el formazano o formazan. La reacción se realiza con gran rapidez en presencia de metosulfato de fenacina (PMS) que actúa como catalizador, en estas reacciones, a las cuales se asocia la reducción de coenzimas como NAD y NADP.

Otras sales de tetrazolio como NBT o TB pueden ser

utilizadas en algunos casos pero en general son menos sensitivas.

La mezcla MTT-PMS es muy sensible a la luz y por ello todas las reacciones de revelado se realizan en la oscuridad. Si el tiempo de incubación es largo, suele ser conveniente disminuir la cantidad de PMS y aumentar la de MTT para prevenir el oscurecimiento del gel.

En algunos casos en lugar de PMS como catalizador intermedio puede ser utilizado el diclorofenol-indofenol (DCIP).

La tinción con MTT no da buenos resultados en condiciones alcalinas extremas que deben ser evitadas, como también deben serlo el empleo de compuestos sulfidrílicos como el 2-mercaptoetanol (ME) o el ditiotreitól (DTT) que deben de ser evitados en los tampones de recorrido y revelado, aunque en ocasiones es inevitable utilizarlos en la muestra, pues reducen con gran rapidez y de forma inespecífica el MTT.

El 3-amino-9-etilcarbazol es un colorante soluble, amarillento, que puede ser oxidado a un compuesto marrón oscuro, y que se utiliza a menudo para la detección de oxidasas y peroxidasas, que obviamente podrían ser también detectadas mediante bencidina y derivados, pero esto, como es sabido, debe de ser evitado por el potencial cancerígeno que estos productos poseen.

#### 5) Métodos de tinción con enzimas asociados

Este grupo de métodos de tinción dependen del uso de enzimas exógenos, que transforman el producto del enzima en una sustancia que puede ser detectada por su color, por sus propiedades fluorescentes o por poder ser incorporada en una reacción en la que, al final, se pueda reducir el MTT. Así, entre otros enzimas la PGM, o la AK, por ejemplo, necesitan glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y la AK, además, hexokinasa.

Los métodos de revelado que a continuación sistematizaremos para cada uno de los enzimas pueden ser aplicados directamente o por medio de un papel de filtro (Whatman 3), una membrana de acetato de celulosa o un sobregel de agarosa.

En general los substratos fluorogénicos se suelen aplicar por medio de papeles de filtro y son leídos los enzimas bajo luz UV de 360 nm. Las bandas en estos casos difunden rápidamente y es necesario fotografiarlas enseguida, aunque congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  se mantienen las bandas durante cierto tiempo.

Los substratos que contienen PMS-MTT se suelen aplicar en sobregel de agarosa (al 1%), al igual que la mayoría de las demás reacciones.

La reacción de MTT a formazán puede ser detenida con acético al 5%. Los geles pueden ser desecados y las bandas permanecen inalteradas durante bastante tiempo aunque la resolución nunca es tan buena como antes de la desecación.

Los revelados sobre tiras de acetato de celulosa o en geles miniaturizados de poliacrilamida pueden realizarse directamente incluso para las reacciones con MTT-PMS.

A continuación indicamos los métodos de revelado para cada enzima:

- 6-PGD (CAE)

1.- Método: Aplicar el sustrato directamente sobre la membrana de acetato de celulosa

2.- Tampón: 0,1M TRIS-HCl, pH 8.

3.- Substrato (para 10 ml de tampón):

10 mg de gluconato-6-fosfato  
(sal Na<sub>2</sub>)

7 mg de NADP

3.5 mg de MTT

1 mg de PMS

15 mg de Cl Mg

2

4.- Incubar 5 minutos a 37°C (aparece como bandas azules de formazán).

- Gd (CAE)

1.- Método: Aplicar el sustrato directamente sobre la membrana de acetato de celulosa.

2.- Tampón: 0,1M TRIS-ac. bórico pH 8,4.

3.- Substrato (para 5 ml de tampón):

10 mg de glucosa-6-fosfato

6 mg de NAD

7 mg de PMS

7 mg de MTT

4.- Incubar 20 minutos a 37°C (aparece como bandas azules de formazán).

- GPT (IEF) (Fig. 1)

1.- Método: sobregel de agarosa al 2 %

2.- Tampón: 0,1M TRIS-HCl, pH 8

3.- Substrato (para 20 ml de tampón):

150 mg de oxoglutarato (sal Na<sub>2</sub>)  
300 mg de DL-alanina  
20 mg de NADH (sal Na)  
15 mg de MTT  
3 mg de PMS

4.- Incubar 2 horas a 37°C. Los isoenzimas GPT aparecen como bandas azules tenues.

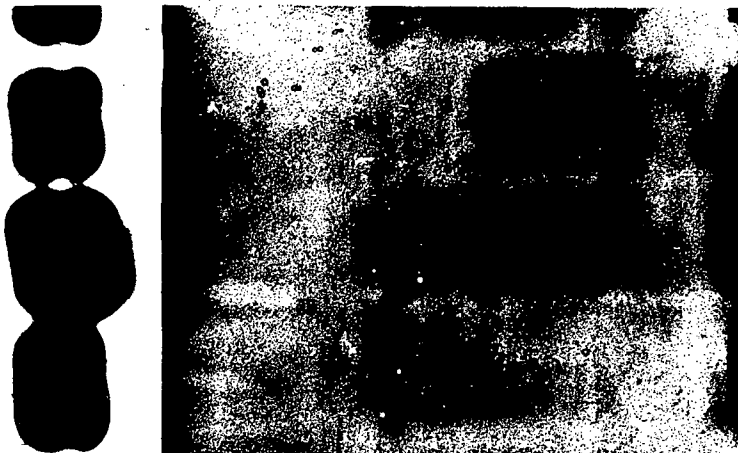


Fig. 1. Fenotipos GPT después de focalización isoelectrica en el rango de pH 4-8. El ánodo está hacia arriba. La hemoglobina se ve en el cátodo.

- UMPK (SGE)

1.- Método: aplicar el substrato con un papel Whatman 3 sobre el gel.

2.- Tampón: 0,1M TRIS-HCl, pH 7,8.

3.- Substrato (para 10 ml de tampón)

25 mg de uridín monofosfato (sal Na<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O)

25 mg de ATP (sal Na<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O)

5 mg de fosfoenol piruvato (sal K)

10 mg de NADH (sal Na<sub>2</sub>)

25 mg de Cl<sub>2</sub>Mg (6H<sub>2</sub>O)

150 unidades de LDH

4.- Incubar a 37°C durante 30 minutos y visualizar bajo luz UV de 360 nm. Las bandas aparecen como no fluorescentes.

5.- Es posible visualizar también los fenotipos UMPK tras IEF (pH 4-8).

- AK (CAE) (Fig. 2)

1.- Método: el substrato se puede aplicar directamente sobre la membrana o por medio de un sobregel de agarosa al 1%.

- 2.- Tampón: igual que para el ADA.
- 3.- Substrato (para 5 ml de tampón):
- 150 mg de dextrosa
  - 10 mg de ADP
  - 10 mg de NADP
  - 5 mg de PMS
  - 7 mg de MTT
  - 14 unidades de hexokinasa (H 5000 Sigma)
  - 6 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-8878 Sigma)
- 4.- Incubar a 37°C durante 10 minutos. Los isoenzimas AK se visualizan como bandas azules.
- 5.- Las muestras tienen que ser recientes y los coenzimas deben estar en buenas condiciones.

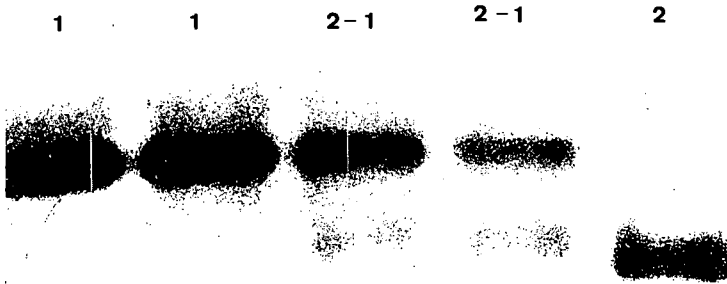


Fig. 2. Fenotipos AK después de electroforesis en almidón. Los patrones en acetato de celulosa son semejantes.

- PGM1 (IEF) (Fig. 3 y 4)

1.- Método: se utiliza un sobregel de agarosa. En principio para una placa de 20 x 10 cm se disuelven 0,3g de agarosa en 15 ml de agua destilada y se mezclan con 20 ml del tampón con el substrato, cuando la temperatura de la agarosa, una vez hervida, alcance 55°C.

2.- Tampón: 9,05 g de TRIS, 365 mg de EDTA (Na<sub>2</sub>) y 0,5 g de Cl<sub>2</sub>Mg en 250 ml de agua destilada, llevado a pH 8,5 con HCl 1N.

- 3.- Substrato (en 20 ml de tampón):
- 87,5 mg de glucosa-1-fosfato
  - 7,5 mg de NADP
  - 50 µl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-8878 Sigma)
  - 2,5 mg de PMS
  - 5 mg de MTT

4.- Incubar a 37°C durante 30 minutos. Los isoenzimas PGM1 aparecen como bandas azules. Anódicamente se ven las bandas correspondientes a la PGM2 y una repetición de los isoenzimas PGM1.

5.- Los 50 µl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son referidos a una concentración habitual de 4000 U/ml. Si las bandas son débiles suele ser debido a un déficit de Gd o de glucosa 1,6 difosfato que puede añadirse.



Fig. 3. Fenotipos PGM1 tras electroforesis de alto voltaje en agarosa. Estos tres fenotipos por electroforesis convencional se pueden convertir en diez con la utilización de focalización isoelectrica (Fig. 4).

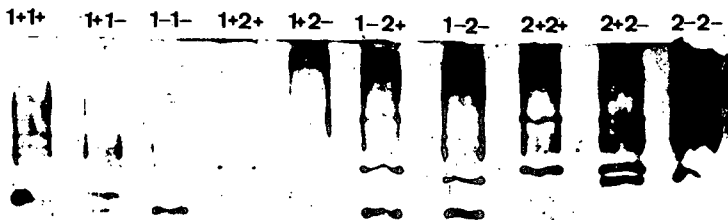


Fig. 4. Subtipos PGM1 tras IEF en el rango de pH 5-7. El ánodo está en la parte superior.

- GALT (IEF)

- 1.- Método: exactamente igual que para la PGM1.
- 2.- Tampón: el mismo que para PGM1 (TRIS-EDTA-CL2Mg, pH 8,5).
- 3.- Substrato (en 20 ml de tampón):
  - 30 mg de galactosa-1-fosfato (sal K2, 5H2O)
  - 20 mg de UDP-glucosa (sal Na2)
  - 2 mg de glucosa-1-6-difosfato (sal de tetraciclohexamonio, 4H2O)
  - 20 mg de NADP (sal Na2)
  - 50 µl de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-8878 Sigma)
  - 50 µl de PGM (2000 unidades/ml)
  - 50 µl de 6-PGD (200 unidades/ml)
  - 3 mg de PMS
  - 7 mg de MTT
- 4.- Incubar a 37°C durante 45 minutos. Las isoenzimas GALT aparecen como bandas azules.
- 5.- Los hemolizados han de ser muy frescos. Las muestras envejecidas se deben tratar con DTT 0,05M (1:1), pero los resultados son peores.

- ESD (IEF) (Fig. 5)

- 1.- Método: se aplica el substrato en papel Whatman 3 sobre el gel.
- 2.- Tampón: ac. cítrico 0,05M llevado a pH 6,0 con NaOH 1N.
- 3.- Substrato: se disuelven 5 mg de 4-metil-umbeliferil acetato en 3 ml de acetona, y se añade en el último momento a 5 ml de tampón.
- 4.- Incubación durante 10 minutos a 37°C. Las bandas se visualizan con luz UV de 360 nm.

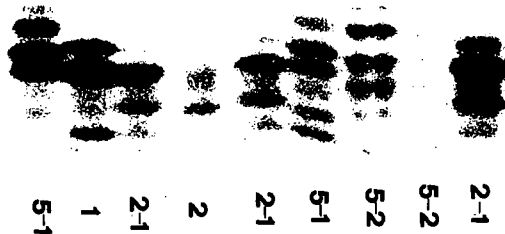


Fig. 5. Subtipos ESD tras IEF en el rango de pH 4-6,5. El ánodo está en la parte superior.

- ACP (IEF) (Fig. 6)

- 1.- Método: papel Whatman 3 sobre el gel.
- 2.- Tampón: ac. cítrico 0,05M llevado a pH 5,0 con NaOH 1N.
- 3.- Substrato: 5mg de 4-metil-umbeliferil fosfato en 5 ml de tampón.
- 4.- Incubación a 37°C durante 15 minutos. Las bandas se visualizan con luz UV de 360 nm.

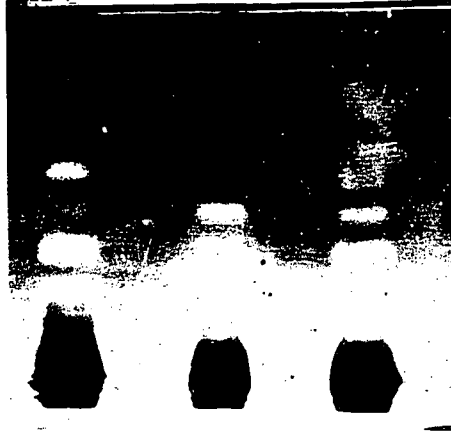


Fig. 6. Si bien el alelo ACP\*A es fácil de leer, el problema mayor en el fenotipado de la ACP se plantea en la distinción de los alelos ACP\*B. y ACP\*C, que se han de determinar por sus intensidades relativas. El IEF en los rangos de pH 4-8 (Fig. 6) o pH 5-8 resuelve la cuestión.

- PGP (SGE)

- 1.- Método: se desarrolla en dos fases.  
Primera fase: Tampón 0,1M TRIS/HCl pH 7,5  
En 20 ml de tampón se añaden:  
50 mg de ac. 2-fosfoglicólico  
(sal sódica)  
10 mg de SO<sub>4</sub>Mg (7 H<sub>2</sub>O)  
Se aplica este tampón sobre la superficie con un sobregel de agarosa al 2%.  
Se incuba a 37°C durante 2 horas.  
Segunda fase: Se retira el sobregel de agarosa.  
El gel se introduce en 25 ml de una solución al 2,5% de molibdato amónico en SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 4N, al que previamente se ha añadido 1,25 g de ac. ascórbico.



Los isoenzimas PGP se visualizan inmediatamente como manchas de color verde.

- SAHH (SGE)  
Véase referencia (51)

- ADA (CAE) (Fig. 7)

1.- Método: aplicar el sustrato líquido sobre la membrana, o en un sobregel de agarosa al 1%.

2.- Tampón: 9 g TRIS y 5 g de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  ( $6\text{H}_2\text{O}$ ) disueltos en 500 ml de agua destilada y llevados a pH 7,9 con HCl concentrado.

3.- Sustrato (en 3 ml de tampón):  
10 mg de adenosina  
0,2 U de xantin-oxidasa  
0,5 U de nucleósido-fosforilasa  
2 mg de PMS  
5 mg de MTT

4.- Incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Los isoenzimas ADA aparecen como bandas azules débiles.

5.- El sustrato tiene que estar en buenas condiciones. Los dos enzimas xantin-oxidasa y nucleósido-fosforilasa se inactivan con facilidad.

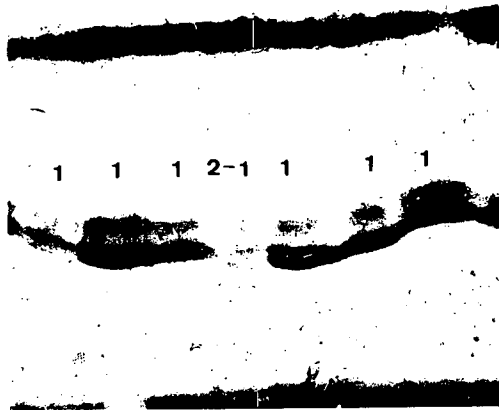


Fig. 7. La ADA puede determinarse simultáneamente a la ACP tras IEF en el rango de pH 4-8, revelándose en el extremo anódico del gel. En la fotografía el ánodo está en la parte superior.

- ALADH (SGE)

1.- Método: se aplica el substrato en forma líquida a un papel Whatman 3.

2.- Tampón: 0,1M TRIS-Histidina-Imidazol-Cl2Mg a pH 7,4.

3.- Disolver en el tampón 10 mM ac. delta-aminolevulínico, 5 mM DTT y 10 mM acetato de Zn.

4.- Incubar a 37°C durante 60 minutos. Las bandas se visualizan como manchas bien contrastadas.

- GLO (SGE-AGE)

1.- Método: Whatman 3 sobre el gel que finalmente se retira.

2.- Tampón: 0,2M PO4H2Na y 0,072M PO4HNa2, a pH 6,2 con ac. fosfórico.

3.- Substrato (en 15 ml de tampón):

12 mg de glutatona reducida

50 µl de metil-glioxal (40%)

4.- Se aplica en el papel Whatman, y se incuba a 37°C durante 30 minutos. A continuación se retira y se tiñe el gel con una solución de iodina (2 g de iodo y 1 g de IK en 200 ml de agua).

Los isoenzimas aparecen como intensas manchas azules que se visualizan en pocos momentos.

8.- DATOS POBLACIONALES (Referidos a población gallega)

Sistema	Número	Frecuencias alélicas	Referencia
1. PGD	1086	6-PGDA = 0,9779 6-PGDC = 0,0221	(61)
2. Gd	500	Gd A+ = 0,9960 Gd A- = 0,0040	(62)
3. GPT	302	GPT1 = 0,5099 GPT2 = 0,4901	(63)
4. UMPK	489	UMPK1 = 0,95429 UMPK2 = 0,04571	(64)
5. AK	1086	AK1 = 0,9613 AK2 = 0,0387	(61)
6. PGM1	1086	PGM11+ = 0,621 PGM11- = 0,114 PGM12+ = 0,211 PGM12- = 0,054	(61)
7. GALT	179	GALTN = 0,9302 GALTD1 = 0,0447 GALTD2 = 0,0251	(64)
8. ESD	394	ESD1 = 0,8744 ESD2 = 0,1040 ESD5 = 0,0216	(64)

9. ACP1	1086	ACPb = 0,686 ACPa = 0,278 ACPc = 0,036	(65)
10. PGP	458	PGP1 = 0,92784 PGP2 = 0,04639 PGP3 = 0,02577	(50)
11. SAHH		No estudiada	
12. ADA	1086	ADA1 = 0,9503 ADA2 = 0,0497	(65)
13. ALADH	500	ALADH1 = 0,9170 ALADH2 = 0,0830	(64)

---

9.- PROBABILIDAD DE EXCLUSION A PRIORI (Referido a población gallega).

Sistema	%
PGM1	31,90
ACP	20,43
GPT	18,75
GLO	18,75
ESD	10,87
ALADH	7,03
PGP	6,88
GALT	6,67
ADA	4,50
UMPK	4,17
AK	3,58
PGD	2,11
Gd	1,01
Acumulada	77,97

---

10.- TASA DE SILENTES.

Para finalizar este capítulo hemos de indicar que los sistemas enzimáticos del eritrocito se encuentran entre los marcadores más seguros puesto que en la mayoría, con la excepción de ESD y GLO, es posible determinar silentes enmascarados en heterocigotos, ya que, habitualmente, en ellos la actividad enzimática está reducida a la mitad.

Está calculada la tasa de silentes para la ACP (0,34%), la ESD (0,06%), la GLO (0,10%) y la PGM1 (0,09%) en población caucasoide (66) y se ha demostrado también la existencia de silentes en los sistemas 6-PGD, Gd, GPT, UMPK, AK, PGP y ADA.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Hunter, R.L., C.L. Markert. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295 (1957).
2. Smithies, O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629-641 (1955).
3. Vesell, E.S., A.G. Bearn. Localization of lactic dehydrogenase activity in serum fractions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 96-99 (1957).
4. Vesell, E.S., A.G. Bearn. Observations on the heterogeneity of malic and lactic dehydrogenase in human serum and red blood cells. *J. Clin. Invest.* 37: 672-677 (1958).
5. Markert, C.L., F. Moller. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA* 45: 753-763 (1959).
6. Markert, C.L. The molecular bases for isoenzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151: 14-40 (1968).
7. Dykes, D. Detection of red cell enzyme and serum protein polymorphisms in bloodstains. En S.D. Rolim y W.J. Judd (eds.). *Serological methods in forensic science* pp 63-92. American Association of Blood Banks. Arlington, Virginia. (1985).
8. Harris, H. *The Principles of Human Biochemical Genetics*, Elsevier-North Holland, Amsterdam, Oxford. (1975).
9. Harris, H., D.A. Hopkinson. *Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics*, North Holland, Amsterdam, Oxford. (1976).
10. Becker, P.E. *Genética humana*. Ediciones Toray. Barcelona (1980).
11. Saferstein, R.: *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry*. U.S. Government Printing Office. (1984).
12. Fildes, R.A., C.W. Parr. Human red cell phosphogluconate dehydrogenase. *Nature*. 200, 890 (1963).

13. Carter, N.D., R.A. Fildes, L.I. Fitch, C.W. Parr. Genetically determined electrophoretic variations of human phosphogluconate dehydrogenase. *Acta Genet. Basel.* 18, 109 (1968).
14. Parr, C.W. Erythrocyte phosphogluconate dehydrogenase polymorphism. *Nature* 210, 487 (1966).
15. Beckman, G. Enzyme polymorphism. En: D.J.H. Brock y O. Mayo (eds.). *The biochemical Genetics of Man*, pp. 185-269. Academic Press, New York, London, San Francisco. (1978).
16. Beutler, E., A. Yoshida. Human glucosa-6-phosphate dehydrogenase variants: a supplementary tabulation. *Ann. Hum. Genet.* 37, 151 (1973).
17. Kirkman, H.N. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv. Hum. Genet.* 2, 1 (1971).
18. Blake, E.T., G.F. Sensabaugh. Genetic markers in human semen. II. Quantitation of polymorphic proteins. *J. Forensic Sci.* 23: 717-729 (1978).
19. Tills, D., J.L. Van Den Branden, V.R. Clements, A.E. Mourant. The distribution in man of genetic variants of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Hum. Hered.* 20: 523-529 (1970).
20. Chen, S-H., E.R. Giblett. Polymorphisms of soluble glutamic-pyruvic transaminase: a new genetic marker in man. *Science* 173: 148-149 (1971).
21. Spielmann, W., P. Kühnl, Ch. Rexrodt, G. Hänsel. Untersuchungen zum GPT-System unter besonderer Berücksichtigung des stummen Allels GPT0. *Humangenetik* 18: 341-348 (1973).
22. Braunstein, A.E. Amino group transfer. En: P.D. Boyer (ed.) *The Enzymes*, 3 ed., 9: 379-481, Academic Press, New York, London (1973).
23. Welch, S.G., B.E. Dodd. Red cell glutamate-pyruvate transaminase in studies of paternity cases in the United Kingdom. *Forensic Sci.* 3: 39-43 (1974).
24. Giblett, E.R., J.E. Anderson, S-H Chen, Y-S Teng, F. Cohen. Uridine monophosphate kinase: a new genetic polymorphism with possible clinical implications. *Ann. J. Hum. Genet.* 26: 627-635 (1974).

25. Toyomasu, T., K. Tate, S. Sato. Red cell uridine monophosphate kinase (UMPk) and glyoxalase I (GLO) polymorphisms in a Japanese population: with a description of the new phenotype UMPk 4-1. *Bull. Osaka Med School* 23: 63-66 (1977).
26. Teng, Y-S, L.E. Lie-Injo. Erythrocyte superoxide dismutase in different racial groups in Malaysia. A variant in a Filipino. *Hum. Genet.* 36: 231-234 (1977).
27. Gallango, M.L., A. Müller, R. Suinaga. Biochemical characterization of a red cell. UMP kinase variant found in the Warao Indians of Venezuela. *Biochem. Genet.* 16: 1085-1092 (1987).
28. Fildes, R.A., H. Harris. Genetically determined variation of adenylate kinase in man. *Nature* 209: 261-263 (1966).
29. Weissmann, J., O. Pribilla. Nachweis von AK°. *Forensic Sci. Int.* 14: 95-96 (Abstr.) (1979).
30. Prokop, O., W. Göhler. Die menschlichen Blutgruppen, 4. Anfl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1976).
31. Sonneborn, H-H. Comments on the determination of isoenzyme polymorphism (ADA, AK, 6-PGD, PGM) by cellulose acetate electrophoresis. *Humangenetik* 17: 49-55 (1972).
32. Spencer, N., D.A. Hopkinson, H. Harris. Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature* 204: 742-745 (1964).
33. Sutton, J.G., R. Burgess. Genetic evidence for four common alleles at the phosphoglucomutase-1 locus (PGM1) detectable by isoelectric focusing. *Vox. Sang.*, 34: 97-103 (1978).
34. Kühnl, P., V. Schmidtmann, W. Spielmann. Evidence for two additional common alleles at the PGM1 locus (phosphoglucomutase - E.C.:2.7.5.1). A comparison by three different techniques. *Hum. Genet.* 35: 219-223 (1977).
35. Weidinger, S., F. Schwarzfischer. PGM1 subtypes determined by agarose gel isoelectrofocusing. *Z. Rechtsmed.* 84: 221-224 (1980).
36. Isselbacher, K.J., E.P. Anderson, K. Kuramashi, H.M. Kalckar. Congenital galactosemia, a single enzymatic block in galactose metabolism. *Science* 123: 635-636 (1956).

37. Beutler, E., M.C. Baluda, P. Sturgeon, R.W. Day. The Duarte variant of galactose-1-phosphate uridyl transferase: a prevalent allele for the gene for galactosemia. *J. Clin. Invest.* 44: 1028 (1965).
38. Ng, W.G., W.R. Bergren, G.N. Donnell. A new variant of galactose-1-phosphate uridyl transferase in man: the Los Angeles variant. *Ann. Hum. Genet.* 37: 1-8 (1973).
39. Eriksen, B., J. Dissing. Human red cell galactose-1-phosphate uridyl transferase (E.C. 2.7.7.12). Electrophoretically determined polymorphism in Denmark and its use in paternity cases. *Hum. Hered.* 30: 27-32 (1980).
40. Hopkinson, D.A., M.A. Mestriner, J. Cortner, H. Harris. Esterase D: a new human polymorphism. *Ann. Hum. Genet.* 37: 119-137 (1973).
41. Grüner, O., E. Simeoni. Polymorphisms der menschlichen Erythrocyten- Esterase D. *Z. Rechtsmed.* 81: 261-267 (1978).
42. Sparkes, R.S., S. Targum, E. Gersmon, G.F. Sensabaugh, M.C. Sparkes, M. Crist. Evidence for a null allele at the Esterase D (E.C. 3.1.1.1) locus. *Hum. Genet.* 46: 319-323 (1979).
43. Divall, G.B. The esterase D polymorphism as revealed by isoelectric focusing in ultra-thin polyacrylamide gels. *For. Sci. Int.* 26: 255-267 (1984).
44. Hopkinson, D.A., N. Spencer, H. Harris. Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism. *Nature* 199: 969-971 (1963).
45. Giblett, E.R., N.M. Scott. Red cell acid phosphatase: racial distribution and report of a new phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 17: 425-432 (1965).
46. Brinkmann, B., E. Koops, H.H. Hoppe. Disagreements between observed and expected data in erythrocyte acid phosphatase polymorphism. Reference Laboratories for enzyme polymorphisms. *Z. Rechtsmed.* 69: 191-196 (1971).
47. Ishimoto, G., M. Kuwata. Red cell enzyme typing by gel isoelectric focusing. *Rep. Natl. Res. Inst. Pol. Sci. Jpn.* 25: 13-16 (1972).
48. Barker, R.F., D.A. Hopkinson. Genetic polymorphism of human phosphoglycolate phosphatase (PGP). *Ann. Hum. Genet.* 42: 143-151 (1978).

49. Badwey, J.A. Phosphoglycolate phosphatase in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 252, 2441 (1977).
50. Rey MD. Análisis del polimorfismo de la fosfoglicolato fosfatasa y de la esterasa D en una muestra de la población gallega. Tesina de licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela (1981).
51. Scheil, H.G., E. Börner. SAHH-Phänotypen und Genfrequenzen in einer West Dudschen Population. *Ärztl. Lab.* 31: 157-160 (1985).
52. Spencer, N., D.A. Hopkinson, H. Harris. Adenosine deaminase polymorphism in man. *Ann. Hum. Genet.* 32: 9-14 (1968).
53. Renninger, W., Ch. Bimboese. Zur Genetik der Erythrocyten-Adenosin-Desaminase. Genfrequenzen und Familiennuntersuchungen. *Humangenetik* 9: 34-37 (1970).
54. Bauer, G., J. Herbich. Das Enzymsystem der Adenosindesaminase in der Forensischen Serologie. *Wien. Klin. Wochenschr.* 84 (10): 156-161 (1972).
55. Boorman, K.E., B.E. Dodd, P.J. Lincoln. *Blood Group Serology*, 5 ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, New York, London, (1977).
56. Battistuzzi, G. Delta-aminolevulinat dehydrase: a new genetic polymorphism in man. *Ann. Hum. Genet.* 45: 223-227 (1981).
57. Kömpf, J., S. Bissbort, S. Gussmann, H. Ritter. Polymorphism of red cell glyoxalase I (E.C. 4.4.1.5). A new genetic marker in man. *Humangenetik* 27: 141-143 (1975).
58. Bagster, I.A., C.W. Paar. Human erythrocyte glyoxalase I polymorphism. *J. Physiol.* 256: 56-57 (1975).
59. Olaisen, B., P. Teisberg, T. Jonassen. GLO polymorphism in Norway. *Hum. Hered.* 26: 454-457 (1976).
60. Paar, C.W., I.A. Bagster, S.G. Welch. Human red cell glyoxalase polymorphism. *Biochem. Genet.* 15: 109-113 (1977).
61. Carracedo, A., L. Concheiro. PGM1 subtypes in Galicia (NW Spain). *Hum. Hered.* 32: 133-135 (1982).



62. Carracedo, A. Estudio sobre los polimorfismos enzimáticos eritrocitarios en la Población Gallega. Su Aplicación a la Investigación Biológica de la Paternidad. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela (1982).
63. Carracedo, A., J.L. Blázquez. Determinación das isoenzimas GPT por focaxe isoeléctrica en xeles de poliacrilamida. Acta Científica Compostelana 21: 231-237 (1984).
64. Carracedo, A., L. Concheiro, M.S. Rodriguez-Calvo, M.D. Montiel. Plasma Protein and Red Cell Enzyme Groups in Galicia (North West Spain). Z. Rechtsmed. 98: 133-140 (1987).
65. Carracedo, A., L. Concheiro. Polymorphism of erythrocytes acid phosphatase and adenosine deaminase in Galicia (NW Spain) by AGIF and PAGIF. Z. Rechtsmed. 88: 143-145 (1982).
66. Polesky, H.F. The frequency of null genes calculated from trios in disputed parentage cases. For. Sci. Int. 23: 69 (1983).

## Capítulo 10

---

### MARCADORES GENETICO-MOLECULARES DE ORIGEN LEUCOCITARIO

---

Cristóbal LLANO, J. Luis B. CAEIRO, Olga CANABAL y

---

Susana GARCÍA.

---

#### Generalidades

---

Bajo este epígrafe se engloban una serie de proteínas con actividad enzimática, que tienen en común, no sólo el proceder de la fracción sanguínea leucocitaria, sino también el estar escasamente estudiados a nivel poblacional, y por lo tanto, poco explotada su posible utilidad tanto en el Diagnóstico Biológico de la Paternidad como en cualquier otro tipo de análisis como los que se realizan usualmente en Biología Forense.

Como es lógico, a nivel intracelular, la ubicación de estos enzimas no es homogénea. Entre ellos se encuentran proteínas procedentes de los distintos orgánulos celulares, fundamentalmente se trata de enzimas mitocondriales y lisosomales. Esta característica es la causa de la mayoría de las dificultades técnicas que presenta su determinación y que, a continuación, pasamos a considerar brevemente.

Como es habitual, la fenotipación de los individuos a analizar se realiza por métodos electroforéticos en cualquiera de sus variantes (Electroforesis sobre gel de Almidón, sobre geles de Poliacrilamida, o bien Isoelectroenfoque tanto en geles de Poliacrilamida -PAGIF- como en geles de Agarosa -AGIF- ).

La cantidad de muestra sanguínea debe ser suficientemente grande como para permitir un aislamiento de los leucocitos con un rendimiento suficiente. (Usualmente bastan de 5 a 10 ml de sangre total.)

La sangre debe ser anticoagulada por cualquiera de los métodos de uso corriente en Hematología (Heparina, Citrato, EDTA, etc.) y posteriormente,

sometida a algún método destinado al aislamiento de la fracción leucocitaria, como los basados en sedimentación pasiva tras tratamiento de la sangre total con soluciones de polímeros derivados de la Dextrosa.

Obtenido el paquete leucocitario, el siguiente paso es la preparación y lisis de las células, con vistas a liberar los enzimas de los compartimentos celulares y permitir así su acceso a la matriz del gel separador de que se trate. No obstante, el proceso de lisis, por los motivos expuestos anteriormente no puede consistir en un mero shock térmico como es usual cuando la muestra es eritrocitaria. En nuestro caso el tratamiento debe ser más vigoroso. Es frecuente el uso de ultrasonidos en combinación con agentes tensoactivos del tipo de TRITON X-100 o NONIDET P-90.

En este punto es interesante comentar, como dificultad a tener en cuenta, el problema que representa el almacenaje de las muestras leucocitarias, sobre todo si éstas ya han sido sometidas a procesos de lisis, puesto que la estabilidad de la actividad enzimática se ve comprometida por la acción de proteasas lisosomales. Para evitarlo, los procesos de almacenaje deben ser tan cortos como sea posible, a temperaturas bajas (inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) y tras su descongelación debe evitarse cualquier demora en su utilización y análisis.

Como es habitual, al tratarse de proteínas enzimáticas los procesos de tinción de los geles para poner de manifiesto las zonas de actividad correspondientes se utilizan cadenas de reacciones cromogénicas en las que específicamente se ve implicado el marcador genético a revelar.

La lista de enzimas que pueden examinarse a partir de muestras leucocitarias, no es corta. No obstante, nos detendremos únicamente en aquellos, que bien porque presentan un elevado grado de variabilidad o porque han despertado más frecuentemente el interés de los investigadores, nos ha parecido más adecuado tratar aquí.

### PGM3. Fosfoglucomutasa locus III (E.C. 2.7.5.1)

---

La Fosfoglucomutasa es un enzima implicado en las etapas iniciales del metabolismo de la Glucosa, que cataliza la conversión de alfa-Glucosa-1-Fosfato en alfa-D-Glucosa-6-Fosfato en un proceso en el que también participa, de algún modo, la alfa-D-Glucosa-1,6-di-Fosfato cuya presencia es necesaria en la reacción, pero aparece inalterada al final de la misma.

Inicialmente la presencia de variabilidad en los patrones electroforéticos de PGM fue referenciado en el año 1964 por Spencer y colaboradores. Más tarde, en 1965, Hopkinson y Harris pudieron establecer que el complicado patrón electroforético de PGM correspondía a la expresión conjunta de dos loci denominados PGM1 y PGM2. Finalmente, utilizando extractos de placenta de gemelos no idénticos, Hopkinson y Harris (1968) pudieron demostrar la existencia de una tercera zona de actividad enzimática que presentaba una variabilidad atribuible a la expresión de un locus autosómico, de herencia mendeliana simple con dos alelos en relación de codominancia PGM3.1 y PGM3.2.

Aunque los estudios iniciales fueron realizados en placenta, la PGM3 ha sido también detectada en otros tejidos (hígado, estómago y cultivos de fibroblastos). Además, diversos investigadores dedicados a estudios poblacionales, han demostrado la utilidad de los leucocitos en su fenotipación. Siebert et al. (1980), Günther (1982) y otros.

La asignación cromosómica del isoenzima III de la PGM fue realizada por Jousman et al. (1973) usando híbridos somáticos hombre-hamster, quedando el locus ubicado en el par 6.

Los patrones electroforéticos de PGM3 se muestran en la Fig. I. Asimismo, en la Tabla I se reflejan los valores de frecuencias obtenidas para este locus en distintas poblaciones en las que ha sido estudiado. La Fig. II intenta reflejar como se agrupan estas poblaciones cuando se comparan a través de las frecuencias fenotípicas que presentan.

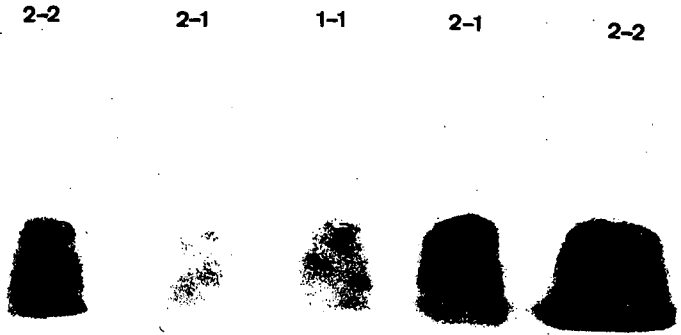


Fig.I.- Patrones de PGM3 en electroforesis en gel de Almidón. Los fenotipos correspondientes se señalan en la fotografía. La zona intensamente sobreteñida de la parte inferior corresponde a PGM2.

Población	PGM3.1	PGM3.2	Referencia
O. Alemania (O.A.)	0.7392	0.2608	(2)
SO. Alemania (SO.A)	0.7682	0.2318	Tomado de (1)
N. Alemania (N.A.)	0.8176	0.1824	Tomado de (1)
Dinamarca (DIN)	0.7454	0.2546	Tomado de (1)
Inglaterra (ING)	0.7444	0.2556	Tomado de (1)
Noruega (NOR)	0.7303	0.2697	Tomado de (1)
Checoslovaquia (CHE)	0.7603	0.2397	Tomado de (1)
Canadá B1 (CAN,Cauc)	0.7699	0.2301	Tomado de (1)
Australia B1 (AUST,Cauc)	0.7805	0.2195	Tomado de (1)
Italia (ITA)	0.7800	0.2200	(1)
Galicia (GAL)	0.6667	0.3333	(20)
Canadá Esqui. (ESQ)	0.8780	0.1220	Tomado de (1)
India (IND)	0.7576	0.2424	(8)
Canadá Ind. (CAN,Ind)	0.7696	0.2304	Tomado de (1)
Japón (JAP)	0.8108	0.1892	Tomado de (1)
China (CHI)	0.7432	0.2568	(8)
Malasia (MAL)	0.7872	0.2128	(8)
Papúes (PAP)	0.5079	0.4921	Tomado de (1)
Australia Abo. (ABO)	0.5941	0.4059	Tomado de (1)
Nigeria (NIG, Negro)	0.3404	0.6596	Tomado de (1)

Tabla I.- Frecuencias alélicas de PGM3 en diferentes poblaciones mundiales. Entre parentesis las abreviaturas usadas en Fig. II.

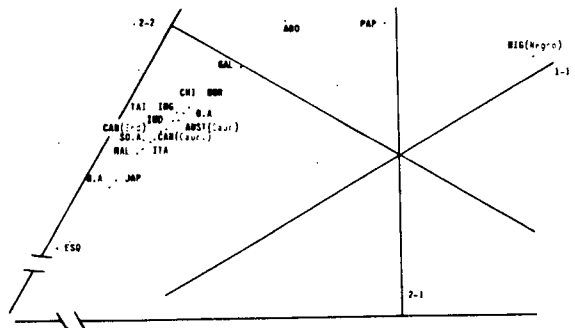


Fig. II.- Representación gráfica que muestra la distribución de las diferentes poblaciones mundiales con respecto al marcador PGM3. Sobre cada una de las medianas del triángulo se representa la frecuencia teórica del fenotipo que se indica, de tal forma que la posición de cada población viene determinada por las frecuencias de los tres fenotipos.

Como se desprende de estos datos, la PGM3 no sólo presenta variabilidad, sino un polimorfismo bastante elevado en las poblaciones hasta ahora estudiadas. En este sentido, son las poblaciones mongoloides las que presentan una frecuencia más baja del alelo PGM3.2, que no obstante se sitúa en valores en torno al 20%.

FUCA. alfa-L-Fucosidasa (E.C. 3.2.1.51)

---

La alfa-L-Fucosidasa es un enzima hidrolítico que está implicado en el metabolismo de Glicolípidos y Glicoproteínas que contienen restos de Fucosa.

La deficiencia en este enzima supone la acumulación de compuestos fucosilados en los lisosomas, lo que se traduce en una mucopolisacaridosis conocida como Fucosidosis, que lleva consigo diversas consecuencias de deterioro mental y muscular.

En 1974, Turner et al., observaron en leucocitos una variabilidad en los patrones electroforéticos encontrados para este enzima. Después de constatar que los patrones de FUCA se simplifican tras el tratamiento de la muestra con Neuraminidasa (lo que demuestra que parte de los isoenzimas no eran sino el mismo, unido a restos de Acido Siálico), pudieron observar que la variabilidad encontrada permanecía y en estudios familiares (Turner et al. 1975) usando PAGIF, demostraron que tal variación es congruente con la existencia de un locus con dos alelos FUCA.1 y FUCA.2 codominantes entre sí, que presenta herencia mendeliana, y que controla la expresión de la actividad fucosidasa.

Cruzamiento	No. Familias	Descendencia		
		1-1	2-1	2-2
1 x 1	3	4	-	-
1 x 2-1	7	10	7	-
1 x 2	3	-	8	-
2-1 x 2-1	5	2	3	0

Tabla II.- Estudio familiar para análisis del tipo de herencia de FUCA. La descendencia obtenida concuerda con lo esperado si FUCA se transmite según herencia mendeliana simple. Tomado de Turner et al. (1975)

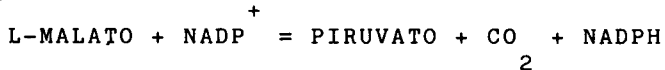
Numerosos autores han fijado su atención en este marcador genético. Así, Courney et al. (1977), encontraron que está ligado cromosómicamente al grupo sanguíneo Rh y por lo tanto puede asignarse al cromosoma 1. De igual forma existen algunos estudios poblacionales cuyos resultados se reflejan en la Tabla III. Por último citar el interesante estudio realizado por Gill y Sutton (1984) acerca de la expresión de alfa-L-Fucosidasa en distintos fluidos corporales, en el que además de las frecuencias génicas encontradas para los alelos de FUCA en distintas poblaciones analizadas se, muestran algunas diferencias entre los patrones isoenzimáticos del marcador en los distintos fluidos, diferencias que se mantienen incluso tras el tratamiento con Neuraminidasa, y que se interpretan como fruto de un proceso de maduración en el que podría estar implicada la acción de enzimas proteolíticos. (Schumaker, 1973).

Población	FUCA.1	FUCA.2
Judíos (USA)	0.754	0.246
Blancos USA (No Judíos)	0.750	0.250
Negros (USA)	0.926	0.074
Inglaterra y Escocia	0.750	0.250
Alemania O.	0.745	0.255
Basingtoke	0.746	0.254
Oxford (semen)	0.704	0.296
Oxford (linfocitos)	0.678	0.322

Tabla III.- Valores de las frecuencias alélicas de FUCA en distintas poblaciones estudiadas. Tomado de Gill y Sutton, 1984.

ME2. Enzima Málico. (E.C. 1.1.1.40)

Este enzima se conoce también como Malato Deshidrogenasa descarboxilante dependiente de NADP y cataliza la reacción:



La ME presenta dos formas isoenzimáticas, ME1 y ME2 (Henderson, 1966; Simpson & Stabrook, 1969; Shows et al., 1970) de las cuales ME2 es de origen mitocondrial, y su expresión fenotípica está dirigida por un locus con dos alelos codominantes (Cohen & Ommen, 1972) cuya ubicación cromosómica no ha sido dilucidada.

En la Tabla IV se muestran los valores de frecuencias fenotípicas de ME2 para pares madre-hijo que

confirman un modelo hereditario mendeliano simple para este marcador.

Hijo	1	2-1	2
Madre			
1	35 (37.3)	24 (18.2)	-
2-1	20 (18.2)	23 (27.0)	8 (8.8)
2	-	5 (8.8)	8 (4.3)

Tabla IV.- Pares madre-hijo para ME2. Los valores entre paréntesis son los que cabe esperar en caso de que ME2 siga un modelo hereditario mendeliano simple. Tomado de Siebert, Ritter y Kömpf, 1979.



Fig. III.- Patrones de ME2 en electroforesis en gel de Almidón. La zona de actividad intensa de la parte superior que presenta monomorfismo corresponde a ME1.

La Fig. III muestra los patrones de ME2 en electroforesis en gel de Almidón. Asimismo en la Tabla V figuran los valores de frecuencias alélicas de ME2 en las distintas poblaciones mundiales estudiadas.



Población	ME2.1	ME2.2	Referencia
S. Alemania	0.6313	0.3687	(22)
Inglaterra	0.6505	0.3495	(21)
Escocia	0.6288	0.3712	(17)
Portugal (Porto)	0.6054	0.3946	(15)
Galicia	0.5922	0.4078	(20)
India	0.6100	0.3900	(16)
Malasia	0.6770	0.3230	(16)
China	0.7112	0.2888	(16)

Tabla V.- Valores de las frecuencias alélicas de ME2 en las distintas poblaciones mundiales estudiadas.

GAA. alfa-Glucosidasa. (E.C. 3.2.1.20)

Las glucosidasas son enzimas capaces de romper enlaces glucosídicos del tipo alfa(1-4), tanto en sustratos naturales como sintéticos. Su actividad corresponde con la de los enzimas que han sido denominados genéricamente maltasas (alfa,1-4, glucosidasas) y su deficiencia da lugar a la enfermedad de Pompé.

Esta proteína presenta dos formas isoenzimáticas, ácida y neutra respectivamente (Swallow et al., 1975), presentando la primera de ellas una variabilidad que se comporta de modo concordante con la expresión de un locus de herencia mendeliana, tal como demuestran los estudios genético-familiares realizados por Nickel & McAlpine (1982) que se reflejan en la Tabla VI.

Cruzamiento.	No. familias	Descendencia					
		1-1	1-2	2-2	1-4	2-4	4-4
1 x 1	19	71	-	-	-	-	-
1 x 2-1	9	16	19	-	-	-	-
1 x 2	2	-	5	-	-	-	-
1 x 4-1	20	28	-	-	31	-	-
2-1 x 2-1	1	2	1	1	-	-	-
4-1 x 4-1	7	7	-	-	15	-	3
2-1 x 4-1	1	1	1	-	-	-	-
1 x 4	2	-	-	-	6	-	-

Tabla VI.- Estudio familiar para analizar el tipo de herencia de alfa-glucosidasa. Los datos concuerdan con el tipo de herencia mendeliana esperado. Tomado de Nickel & McAlpine, 1982.

Morfogenéticamente, GAA ha sido referenciada inicialmente como un locus dialélico (GAA.1 y GAA.2) por Swallow et al., no obstante, con posterioridad, Tan y Teng (1979), han observado la existencia de un alelo nuevo GAA.3 en población malaya que se presenta con muy baja frecuencia, y, Nickel y McAlpine indican en un estudio realizado mediante PAGIF, la existencia de un cuarto alelo GAA.4 con frecuencia superior incluso que la de GAA.2, al menos en la población por ellos estudiada (Canadá) : GAA.1 = 0.914; GAA.2 = 0.028; GAA.4 = 0.058.

En función de los estudios de hibridación somática realizados por Honig et al. (1984), se ha efectuado la asignación cromosómica de GAA a la región 17q21 ----> 17q25.

Dado que, alfa-glucosidasa es un enzima lisosomal, resulta obvio que los leucocitos supongan una estirpe celular idónea para su análisis fenotípico, con evidentes ventajas sobre muestras procedentes de biopsia hepática o cultivos de fibroblastos, etc.

#### GOT2. Glutamato Oxalacetato Transaminasa II.

-----  
(E.C. 2.6.1.1)  
-----

El último marcador leucocitario del que nos ocuparemos con cierta amplitud es la Glutamato-Oxalacetato Transaminasa, también llamada Aspartato Amino-transferasa.

Este enzima cataliza reversiblemente la reacción:



La presencia en plasma de altas actividades de GOT2 se utiliza frecuentemente en medicina clínica como indicador de procesos patológicos en los cuales se implica una gran destrucción celular como en episodios hepáticos agudos o infarto de miocardio. No obstante, esta actividad de GOT no es la que interesa en este caso.

GOT existe en dos formas isoenzimáticas (GOT1 y GOT2) relacionadas con dos loci distintos, y que además, presentan una localización intracelular diferente. GOT1, también GOTs, es un enzima de localización citoplasmática que no presenta polimorfismo de

origen genético, y su actividad es la que se valora en plasma en los análisis clínicos mencionados. Por otro lado, GOT2 o GOTm, es de origen mitocondrial (Boyd, 1966), y, además de poseer diferentes propiedades físicas y químicas, así como diferente movilidad electroforética, presenta también, variabilidad genético-molecular. Así Davidson et al. (1970) identificaron 6 variantes electroforéticas de GOT2 que, estudios genético-familiares posteriores realizados por Haeckel et al. en 1972 han relacionado inequívocamente con la expresión de un locus autosómico con tres alelos: GOT2.1, GOT2.2 y GOT2.3, de los cuales, GOT2.1 y GOT2.3 son relativamente frecuentes en las poblaciones negroides, mientras que, GOT2.1 y GOT2.2 son frecuentes en poblaciones caucasoides.

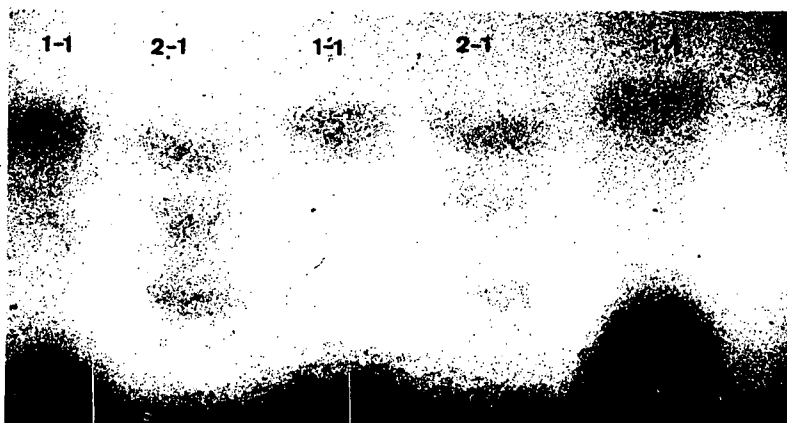


Fig. IV.- Fenotipos de GOT2 en gel de Almidón. La zona oscura próxima a los pocillos corresponde a Hemoglobina.

En la Figura IV se muestran los patrones electroforéticos de los fenotipos más frecuentes en caucasoides, y en la Tabla VII los valores de las frecuencias alélicas para las diferentes poblaciones mundiales estudiadas.

Población	GOT2.1	GOT2.2	Referencia
O. Alemania	0.9774	0.0226	(34)
SO. Alemania	0.9813	0.0188	(38)
Inglaterra	0.9831	0.0169	(35)
Pakistan	1.0000	0.0000	(35)
Nigeria	0.9248	0.0095	(35)
Portugal (Porto)	0.9770	0.0212	(31)
Galicia	0.9745	0.0255	(20)
N. Grecia	0.9891	0.0109	(37)
India	1.0000	0.0000	(8)
China	0.9947	0.0053	(8)
Malasia	0.9946	0.0054	(8)

Tabla VII.- Distribución de las frecuencias alélicas para los alelos más frecuentes de GOT2 en diferentes poblaciones mundiales.

Madre	1	2 - 1	2
Hijo			
1	602 (603.3)	14 (12.0)	-
2-1	13 (12)	10 (12.2)	1 (0.2)
2	-	0 (0.2)	0 (0.005)

Tabla VIII.- Pares Madre-Hijo para los estudios familiares de GOT2. Los valores representados entre paréntesis corresponden a lo esperado de tener GOT2 una herencia mendeliana simple. Tomado de Ritter y Kompf, (1979).

Por último, comentar que, mediante la segregación conjunta de distintos marcadores cromosómicos, así como, por la utilización de híbridos somáticos interespecíficos, ha podido asignarse GOT2 al par cromosómico 16 (Jeremiah et al., 1982).

#### Otros sistemas leucocitarios

Además de estos marcadores cuyo modelo hereditario e incluso ubicación cromosómica son bien conocidos, y que, han sido objeto de estudios poblacionales (a pesar de que la muestra utilizada para ello no haya sido siempre leucocitaria), existen toda una serie de sistemas enzimáticos cuya actividad está presente en leucocitos, y cuyo análisis no ha sido abordado en este tipo de trabajos.

En la bibliografía, encontramos referencias a su descubrimiento y al de su variabilidad (idiomórfica) de tal modo que los distintos autores postulan modelos hereditarios que sólo en algunos casos están confirmados por análisis genético-familiares.

Por citar algunos de ellos, mencionaremos en primer lugar al sistema Aconitasa (ACON, E.C. 4.2.1.3): un enzima que presenta dos versiones, ACONs (citoplasmática) y ACONm (mitocondrial), cuya forma soluble presenta una elevada variabilidad, habiéndose detectado hasta 7 alelos. Además, la forma mitocondrial ACONm en la población analizada presenta dos alelos ACONm.1 y ACONm.2, de modo que la frecuencia de ACONm.2 no presenta valores como para considerar a este marcador como polimórfico:  $ACONm.2 = 0.002$ . Ambos isoenzimas ACONs y ACONm pueden ser detectados en leucocitos.

Otro sistema enzimático cuyo estudio en profundidad puede resultar interesante para nuestros fines es la Glucosa Deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.1.1.47) cuya detección en leucocitos ha sido referenciada por Blume et al. 1975 y ha sido asignada cromosómicamente a la región p21 ---> pter del cromosoma 1 (Koch et al., 1978). La expresión de este sistema enzimático está regida por un locus con tres alelos, y, sobre la frecuencia con que aparecen, existen algunos estudios poblacionales en italianos y malayos.

La Citidin Deaminasa (CDA, E.C. 3.5.4.5) es otro enzima cuya actividad ha sido detectada en gran variedad de tejidos, pero ha demostrado ser particularmente activa en granulocitos (un tipo de Leucocitos). Existen sobre ella pocos estudios poblacionales, pero parece presentar un elevado polimorfismo en poblaciones caucasoides:  $CDA.1 = 0.65$ ,  $CDA.2 = 0.35$  según Teng et al., (1975). No obstante, la escasa cantidad de material biológico de partida limita poderosamente su aplicación en estudios poblacionales. Por otra parte, la reacción de tinción de los geles exige un medio no tamponado para evitar la amortiguación de las zonas de basicidad relativa originadas por la actividad, lo que impide el desarrollo de la reacción cromogénica acoplada.

Por último, mencionar la Isocítrico Deshidrogenasa (ICD, E.C. 1.1.1.42) y otros enzimas como TPI, ALDH etc. que, o bien aparecen como monomórficos, o su actividad en leucocitos es difícilmente detectable con técnicas convencionales, y que podrían engrosar la lista, si la metodología a nuestro alcance sufriese una mejora cualitativa a corto plazo.

Bajo este epígrafe hemos querido pues, analizar algunos sistemas enzimáticos con característi-

cas muy interesantes con vistas a su empleo como marcadores genéticos, pero que no son usados corrientemente en diagnóstico biológico de la paternidad, y ni siquiera en análisis poblacionales como los que realizan los Antropólogos Moleculares. No obstante, sistematizando los métodos de purificación de leucocitos y mejorando las técnicas usadas en su determinación, podrían constituir una inestimable fuente de información en cualquiera de los ámbitos de estudio mencionados.

#### Consideraciones finales

-----

Consideraremos ahora cual es el papel que los enzimas leucocitarios pueden jugar en el campo de la Biología Forense.

Hay que tener en cuenta que, al contrario que los eritrocitos, los leucocitos son células completas que contienen una serie de orgánulos subcelulares (mitocondrias, lisosomas, microsomas, etc.) en cuyo interior se expresan un buen número de enzimas, inicialmente detectados en otros tejidos, que están ausentes del estroma de los eritrocitos. Por otro lado, en el citoplasma de los leucocitos, están presentes la mayoría de los sistemas enzimáticos que habitualmente se analizan a partir de eritrocitos.

Se trata de enzimas de expresión citoplasmática, generalizados a muy diversos tipos celulares del organismo. Sin embargo, esta particular localización intracelular de la mayoría de los sistemas que se analizan a partir de leucocitos, trae consigo algunos inconvenientes.

Resulta obvio que, dado el tamaño de los orgánulos, un enzima mitocondrial o lisosomal estará en general menos representado que uno de origen citoplasmático. Esta circunstancia se acentúa por el hecho de que los leucocitos son comparativamente mucho menos abundantes que los eritrocitos. Por lo que todo ello se resume en una escasa cantidad de muestra enzimática a analizar.

A este problema se le añade otro ya señalado anteriormente que es el que se refiere a la extrema susceptibilidad de algunos de los sistemas leucocitarios (GOT2, PGM3, ME2, GDH) que se ubican fundamentalmente en las mitocondrias, y que son rápidamente atacados por proteasas liberadas tras la ruptura de los lisosomas. (Otros de origen lisosomal como CDA, GAA y FUCA, tienen ya una estructura molecular que les confiere gran resistencia a este tipo de ataque).

Por todos los hechos anteriormente citados, es perfectamente comprensible que los leucocitos sean un material biológico especialmente delicado y comparativamente escaso. Esta circunstancia nos obliga a tener unos cuidados especiales en su manejo, que en ocasiones hacen de su análisis una tarea engorrosa e ingrata, que no contribuye a estimular la aparición de trabajos de análisis poblacional sobre el tema, y por tanto, el investigador ya introducido, no dispone de un contexto comparativo suficientemente amplio.

No obstante, si prescindimos de estas dificultades técnicas, que son por otra parte asumibles con algo de paciencia, y refiriéndonos únicamente al diagnóstico biológico de la paternidad (ya que otro tipo de análisis criminalísticos a partir de vestigios biológicos -manchas de sangre- están descartados habida cuenta de las exigencias en cuanto a la cantidad de muestra que presentan estos marcadores) encontramos que los sistemas leucocitarios muestran una gran utilidad en este sentido.

El polimorfismo de estos marcadores es elevado, como puede ser el caso de: PGM3, ME2 y CDA cuyas frecuencias para la población gallega en las dos primeras y, en el contexto general caucasoide para la tercera resultan ser:  $PGM3.2 = 0.3333$ ,  $ME2.2 = 0.4078$ ,  $CDA.2 = 0.3500$ .

Las potencialidades de su uso quedan puestas de manifiesto si consideramos la probabilidad de exclusión "a priori" acumulada que suministran algunos de ellos analizados conjuntamente.

Ej: Si calculamos la probabilidad de exclusión "a priori" acumulada y el valor Essen-Moller medio correspondiente a los marcadores cuyas frecuencias se indican en el párrafo anterior, resulta un valor de 44.30% y 9.63 respectivamente y los valores individuales de probabilidad de exclusión suministrados por los marcadores mencionados son:  $PGM3 = 17.27\%$ ,  $ME2 = 18.32\%$  y  $CDA = 17.57\%$ .

Resulta de este modo un valor de probabilidad acumulada muy apreciable, superior desde luego al de la mayoría de los marcadores eritrocitarios que habitualmente se usan en estudios de discriminación de la paternidad. Ello nos indica, las buenas características que estos marcadores presentan de cara a su utilización para complementar a otro tipo de marcadores en casos de discriminación de la paternidad.

Es posible que algunas de las dificultades mencionadas queden superadas con la introducción de

nuevas técnicas de análisis como pueden ser el isoelectroenfoque en gradientes inmovilizados, o los geles mixtos, que, no sólo podrían moderar algo el problema de la cantidad de muestra, sino incluso aumentar la finura del estudio y la capacidad de exclusión, si alguno de los marcadores conocidos llegara a mostrar con estos métodos mayor variabilidad de la que hoy detectamos, o incluso si alguno de los sistemas enzimáticos considerados hoy como monomórficos, manifestara entonces algún tipo de variabilidad.

-----

BIBLIOGRAFIA

-----

PGM3

----

- (1).- CORBO, et al. (1973). " Human placentar phosphoglucomutase locus 3 studies in the Italian population". Jpn. J. Human Genet. 25 : 325.
- (2).- GÜNTHER, A. (1982). "Gene frecuencies of human red cell phosphoglucomutase (PGM3) in Western Germany (Düsseldorf region)". Hum. Hered. 32 : 142.
- (3).- HOPKINSON, D.A.; HARRIS, H. (1965). "Evidence for second structural locus determining human phosphoglucomutase". Nature 208 : 410.
- (4).- HOPKINSON, D.A.; HARRIS, H. (1968). "A third phosphoglucomutase locus in man". Ann. Hum. Genet. 31 : 359.
- (5).- JOUSSMAN et al. (1973). "Localization of genes on human chromosomes by studies of human-chinese hamster somatic cell hybrids. Assignment of PGM3 to chromosome C6 and regional mapping of the PGD, PGM, and PEP-C genes on chromosome A1". Humangenetik 20 : 195.
- (6).- SIEBERT et al: (1980). "Substrate affinity in PGM1, PGM2 and PGM3 isoenzymes". Hum. Genet. 56 : 213.
- (7).- SPENCER, N.; HOPKINSON D.A.; HARRIS, H. (1964). "Phosphoglucomutase polymorphism in man". Nature 204 : 742.



- (8).- TENG, Y.S. et al. (1978). "Genetic markers in Malaysians: variants of soluble and Mitochondrial Glutamic Oxalacetic Transaminase and Salivary and Pancreatic Amylase Phosphoglucomutase III and Saliva Esterase polymorphisms". Hum. Genet. 41 :34.

FUCA

----

- (9).- CORNEY, G. et al (1977). "Linkage between alfa-L-Fucosidase and the Rhesus blood group". Ann. Hum.Genet. 40 : 403.
- (10).-GILL & SUTTON (1984). "alfa-L-Fucosidase Polymorphism in Human Semen, Blood and Vaginal Fluid". Hum. Hered. 34 : 231.
- (11).-KOCH, G.A.; BROCON, J.A.; SHOWS, T.B. (1978). "Gene assignment of alfa-L-Fucosidase and Glucose deshydrogenase to the p21 ----> pter region of Chromosome 1 in man". Somat. Cell Genet. 4 :313.
- (12).-SCHUMAKER, G.B.F. (1973). "Soluble proteins of Human cervical mucus" in Elstein, Moghissi, Borth, Cervical mucus in Human reproduction (Scriptor, Copenhagen 1973).
- (13).-TURNER, B.M.; BERATIS, N.G.;TURNER V.S.; HIRSCHHORN, K. (1974). "Isozymes of Human alfa-L-Fucosidase detectable by starch gel electrofore-sis". Clin. Chim. Acta. 57 : 29-35.
- (14).-TURNER, B.M.; TURNER, V.S.; BERATIS, N.G.; HIRSCHHORN, K. 1975). "Polimorphism of Human alfa-L-Fucosidase". Am. J. Hum. Genet. 27 : 651.

ME2

----

- (15).-AMORIM, A. (1982). "Mitochondrial Malic Enzyme (ME2) in human leucocytes. Population genetics in NW Portugal. Broteria-Genetica III (LXXVIII) : 87-88.
- (16).-BHATTACHARYYA, J.P.; SAHA, N. (1984). "Mitochondrial Malic Enzyme polimorphism among different ethnic groups in Singapore". Hum. Hered. 34 : 393-395.

- (17).-BARCHELL, A.; CROSBY, A.; COHEN, P.T.W. (1977).  
"Human Mitochondrial Malic Enzyme variants :  
properties of the different polymorphic forms".  
Ann. Hum. Genet. 41 : 1-7.
- (18).-COHEN, P.T.W.; OMMEN, G.S. (1972). "Human Malic  
Enzyme: high frequency polymorphism of the  
mitochondrial form". Biochem. Genet. 7 : 302.
- (19).-HENDERSON, N.S. (1966). "Isoenzymes and genetic  
control of NADP-Malate Dehydrogenase in mice".  
Archs. Biochem. Biophys. 117 : 28.
- (20).-LLANO, C. et al. (1987). "Polymorphism of PGM3,  
GOT2 and ME2 in Galicia (NW Spain)". (En prensa)
- (21).-SAHA, N.; JEREMIAH, S.J.; POVEY, J. (1978).  
"Further data on Mitochondrial Malic Enzyme in  
man". Hum. Hered. 28 : 421.
- (22).-SIEBERT, G.A. (1985). "Polymorphisms in  
leucocytes: population data on Malic Enzyme and  
alpha-L-fucosidase". Advances in Forensic  
Haemogenetics I : 232.
- (23).-SIEBERT, G.; RITTER, H.; KOMPFF, V. (1979).  
"Mitochondrial Malic Enzyme E.C. 1.1.1.40 in  
human leukocytes : formal genetics and population  
genetics". Hum. Genet. 51 : 319.
- (24).-SIMPSON, E.R.; STABROOK, R.W. (1969). "Mitochon-  
drial Malic Enzyme. The source of reduced  
nicotinamide adenine dinucleotide phosphate for  
steroid hydroxylation in bovine adrenal cortex  
mitochondria". Arch. Biochem. Biophys. 129: 384.
- (25).-SHOWS, T.B.; CHOPMAN, V.M. RUDLE, F.M. (1970).  
"Mitochondrial Malate Dehydrogenase and Malic  
Enzyme mendelian inheritance, electrophoretic  
variants in the mouse". Biochem. Genet. 4 : 707.
- GAA  
---
- (26).-BLUME et al. (1975). "Hexose-6-phosphate dehydro-  
genase from human tissues: an electrophoretic  
study in health and disease". Experientia 31 :  
496.
- (27).-HONIG et al. (1984). "Confirmation of the regional  
localization of genes for human acid alpha-gluca-  
sidase (GAA) and adenosine deaminase (ADA) by  
somatic cell hybridization". Ann.Hum.Genet. 45:49.

- (28).-NICKEL, B.E. & McALPINE, P.J. (1982). "Extension of human acid alfa-glucosidase polymorphism by isoelectric focusing in polyacrylamide gel". Ann. Hum. Genet. 46 : 97.
- (29).-SWALLOW, D.M.; CORWEY, G.; HARRIS, H. (1975). "Acid alfa-glucosidase a polymorphism in man demonstrable by affinity electrophoresis". Ann. Hum. Genet. 38 :391.
- (30).-TENG, Y.S. & TAN S.G. (1979). "Acid glucosidase in Malaysians". Hum. Hered. 29 : 2.

GOT

---

- (31).-AMORIM, A. (1983). Contribuição para o conhecimento da Genética Humana. Tesis Doctoral. Porto.
- (32).-BOYD, J.W. (1966). "The extraction and purification of two isozymes of L-aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase". Biochem. Biophys. Acta 113 : 302.
- (33).-DAVIDSON, R.G. et al. (1970). "Genetic polymorphism of human mitochondrial glutamic oxalacetic transaminase". Science 169 : 391.
- (34).-DRIESEL, A.J.; BIEROTTE, E.; RÖHRBORN, G. (1982). "Human GOTm phenotypes in Western Germany (Düsseldorf region)". Hum. Hered. 32 : 145.
- (35).-HAECKEL, E.; HOPKINSON, D.A.; HARRIS, H. (1972). "Population studies on mitochondrial glutamate-oxalacetate transaminase". Hum. Genet. 35 : 491.
- (36).-JEREMIAH, S.J. et al. (1982). "Mapping Studies on human mitochondrial glutamate oxalacetate transaminase". Ann. Hum. Genet. 46 : 145.
- (37).-KONVATSI, A.; TRIANTAPHILLIDIS, C. (1984). "Enzyme Polymorphism in placenta from Northern Greece". Hum. Hered. 34 : 207.
- (38).-RITTER, H. KÖMPF, J. (1979). "Human mitochondrial glutamic-oxalacetic transaminase GOTm: Formal Genetics". Hum. Genet. 51 : 327.

OTROS MARCADORES

-----

- (39).-DICKMAN, S.R.; SPEYER, J.F. (1954). "Factors affecting the activity of mitochondrial and soluble aconitase". J. Biol. Chem. 206 : 67.
- (40).-SLAUGHTER, C.A.; HOPKINSON, D.A.; HARRIS, H. (1975). "Aconitase polymorphism in man". Ann. Hum. Genet. 39 : 193.
- (41).-TENG, Y.S.; ANDERSON, J.E.; GIBLETT, E.R. (1975). "Cytidin Deaminase; A New Genetic Polymorphism Demonstrated in Human Granulocytes". Ann. Hum. Genet. 27 : 492.

## Capítulo 11

---

### POLIMORFISMO del ADN

---

Mercè MARCH y Guadalupe ERCILLA.

---

En la Investigación biológica de la paternidad se utiliza un método de análisis del ADN que se basa en el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP).

Polimorfismo genético se define como el carácter transmitido de forma mendeliana que existe en una población determinada y presenta, como mínimo, dos alelos, donde el alelo que se presenta con menor frecuencia, es superior o igual a 0.5% (distintos autores ponen este límite entre el 0.1% y el 1%). Esta misma definición se aplica también al polimorfismo del ADN.

El índice de heterocigosidad del ADN humano es bajo (aproximadamente 0.001 pb). Esto significa que uno de cada pocos cientos de nucleótidos varía de un individuo a otro y en algunos casos las diferencias en las secuencias del ADN en una población determinada son polimórficas.

Existen básicamente dos tipos de polimorfismo: el polimorfismo de las dianas de restricción y el polimorfismo de longitud.

#### a) Polimorfismo de las dianas de restricción:

---

Debido a una mutación puntual (cambio de un nucleótido) que modifica una diana de restricción de un enzima determinado, éste ya no reconoce la secuencia específica de la diana y no puede cortar el ADN por ese lugar, por tanto se obtendrá un fragmento más largo. Puede pasar también al contrario, y en lugar de suprimir una diana, cree una nueva, dando lugar a dos fragmentos más pequeños. En ambos casos tenemos un polimorfismo.

Estos polimorfismos son mayoritariamente dimórficos, por lo que frecuentemente el estudio

familiar resulta ser "no informativo" cuando la familia es homocigótica para los marcadores estudiados (sondas). Esto es debido a que la heterocigosidad determinada por la frecuencia alélica nunca supera el 50% y normalmente es muy inferior.

Para que una familia resulte informativa es necesario que los padres presenten un genotipo heterocigótico para los marcadores estudiados.

Se han mapado y caracterizado un número importante de fragmentos de restricción de longitud polimórfica, más de un millar, cifra que previsiblemente aumentará mucho más.

b) El polimorfismo de longitud :

-----

Se debe al polimorfismo cromosómico, fundamentalmente por deleciones o inserciones de material genético. Este tipo de polimorfismo es más raro y se asocia a la presencia de regiones hipervariables (minisatélites). La región variable consiste en repeticiones en tandem de una secuencia. El polimorfismo resulta de las diferencias alélicas en el número de repeticiones (presumiblemente a causa de errores en la mitosis y meiosis durante la replicación), en general, aparecen sistemas multialélicos mostrando índices de heterocigosidad mucho más elevados.

Alec J. Jeffreys ha obtenido una serie de sondas de éste tipo, entre ellas la "lambda 33.15" procedente de una secuencia central o "core" de 16 pb repetida 29 veces, de un intrón del gen de la mioglobina humana. Se puede utilizar esta sonda para el análisis simultáneo de varias regiones hipervariables del genoma.

Estos fragmentos al ser de una longitud importante aumentan mucho el grado de polimorfismo (al tener mayor número de nucleótidos se incrementa de una manera notable la frecuencia de mutación) pudiéndose llegar fácilmente a individualizar a una persona al obtener su "huella genética".

Como es evidente éste hecho resulta de una gran importancia en otros aspectos médico-legales además del de la investigación de la paternidad.

La mayoría de estos fragmentos se encuentran en estado heterocigótico y se afirma que su grado de heterocigosidad estaría muy cercano al 100%

Los RFLP (fragmentos de restricción de

longitud polimórfica), tanto en los de dianas polimórficas como en los de longitud, se ha demostrado que tienen una HERENCIA MENDELIANA y que se transmiten de una manera estable a la descendencia. Son aptos para poder ser estudiados en la Investigación de la Paternidad.

Este polimorfismo del ADN se detecta mediante una técnica denominada "Southern", donde el ADN es extraído de las células, cortado luego en millares de fragmentos por enzimas de restricción. Y los fragmentos son separados por electroforesis según su tamaño. La utilización de "sondas" radiactivas, que tienen la capacidad de hibridarse con fragmentos de ADN homólogos, permite descubrir ciertos fragmentos entre millares de otros.

Este método fue utilizado por el equipo británico de investigación dirigido por Alec J. Jeffreys de la Universidad de Leicester, hace aproximadamente dos años, cuando se planteó un problema de inmigración:

Un joven de Ghana que deseaba reunirse con su madre residente en el Reino Unido vió rechazado el derecho de entrada por los servicios británicos de inmigración.

Las pruebas habituales, HLA, antígenos eritrocitarios (ABO, MS, Rh,...), enzimas eritrocitarios (PGM, GLO, ADA, ACP, AK...), proteínas plasmáticas (HP, PLG, C3, GC, BF, PI,...); todas ellas de gran potencia, no permitieron determinar si el chico era el hijo o el sobrino de la mujer que pretendía ser su madre. Sólo el análisis directo del código genético, contenido en la molécula de ADN, permitió en este caso establecer la filiación con exactitud.

El índice promedio de paternidad en el estudio del polimorfismo del ADN en la afirmación de la paternidad, expresado en probabilidad de paternidad, supera el 90%, rendimiento parecido al que en la actualidad se obtiene mediante el estudio de los locus A y B del sistema HLA.

Dada la potencia que el ADN demuestra, utilizado conjuntamente con los sistemas clásicos aumenta de una forma matemática apreciable la seguridad, tanto a la hora de excluir un falso padre como de afirmar una paternidad verdadera.

## MATERIAL Y METODOS

=====

La técnica utilizada es el SOUTHERN, que comprende los pasos siguientes:

- 1.- Extracción y purificación del ADN
- 2.- Digestión del ADN con enzimas de restricción
- 3.- Separación electroforética de los fragmentos de ADN
- 4.- Desnaturalización de los fragmentos de ADN
- 5.- Transferencia a un filtro de nitrocelulosa o nylon
- 6.- Hibridación del ADN con una sonda específica marcada
- 7.- Revelado (autorradiografía)

-----

### 1.- ORIGEN DE LA MUESTRA Y PURIFICACION DEL ADN

-----

Para la purificación del ADN interesa un tejido en que la relación ADN / otras moléculas biológicas (RNA, proteínas) sea elevada. Se realiza a partir de células de la sangre (leucocitos).

La muestra de sangre se recoge usando un anticoagulante como puede ser EDTA K+.

Una vez separados los leucocitos de la sangre total, se siguen los pasos siguientes:

#### 1) Homogeneización:

Obtenemos los núcleos enteros y el resto de componentes citoplasmáticos.

#### 2) Centrifugación suave:

Interesa que los núcleos precipiten y los restos citoplásmaticos queden en el sobrenadante.

#### 3) Resuspensión de núcleos

#### 4) Estallido de núcleos:



Shock osmótico, para poder liberar la cromatina (ADN, ARN y proteínas). Se observa que la viscosidad de la solución aumenta súbitamente, coincidiendo con la ruptura de la membrana nuclear, quedando la cromatina desnaturalizada libre en el medio.

5) Tratamiento de la solución para eliminar el RNA y las proteínas ya que son contaminantes muy indeseables. Para este fin existen varios métodos.

El más usado es la extracción fenólica (fenol-cloroformo), que aprovecha la propiedad de ser el ADN muy hidrofílico al presentar muchos grupos fosfato en el exterior.

6) Cuantificación de la concentración de ADN:

Se puede realizar de varias maneras, la más usual de ellas es por lectura espectrofotométrica. La máxima absorbancia del ADN es a 260 nm.

## 2.- DIGESTION DEL ADN CON ENZIMAS DE RESTRICION

-----

Se utilizan enzimas de restricción de tipo II: Reconocen secuencias específicas de 4 ó 6 nucleótidos con simetría al giro de 180 grados y rompen por la misma diana dejando fragmentos con extremos conocidos.

Se han comercializado más de 250 enzimas diferentes.

El ADN se digiere completamente con el enzima de restricción convenido, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. Este enzima cuando reconozca una diana específica cortará en esa misma secuencia.

## 3.- SEPARACION ELECTROFORÉTICA DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

-----

DIGERIDOS.

-----

La electroforesis se realiza en gel de agarosa. La longitud del gel varía entre 15 y 25 cm.

Conseguiremos una separación de los fragmentos según su talla, así los de menor tamaño migrarán más y los de mayor tamaño migrarán menos.

Las muestras en el gel se colocan, disponiendo la familia en el orden de - madre - hijo - supuesto padre - y en ambos extremos del gel se coloca la muestra de un marcador de talla que se trata de un genoma (ADN) del cual se conoce su mapa de restricción (sus dianas para uno o varios enzimas de restricción conocidos). Este marcador lo utilizaremos como patrón para poder calcular la longitud de nuestros fragmentos de ADN problema.

Para visualizar los fragmentos, una vez finalizada la electroforesis, al preparar el gel se le añade Bromuro de Etidio, que se intercala entre las dos cadenas de ADN y al iluminar con luz ultravioleta observaremos las bandas por fluorescencia.

Si hacemos ésto, observaremos un "smear" de bandas, muchos fragmentos con todas las posibilidades de medidas, las bandas son casi continuas. Esto es debido a que el ADN humano (eucariota) es muy largo y la diana que reconoce el enzima de restricción utilizado se repite muchas veces y de forma aleatoria no matemática (la secuencia no aparece en virtud de ninguna ley combinatoria sino de la necesidad de la estructura que codifica).

#### 4.- DESNATURALIZACION DE LOS FRAGMENTOS DE ADN

---

Para poder hibridar los fragmentos de ADN con una secuencia específica complementaria (secuencia que vamos a estudiar) llamada "Sonda", hemos de desnaturalizar la doble helice de ADN, para que así queden las dos cadenas de ADN libres.

De esta manera , al poner en contacto la sonda específica con nuestros fragmentos de ADN problema, si la sonda específica, encuentra una cadena complementaria a ella hibridará.

#### 5.- TRANSFERENCIA A UN FILTRO DE NITROCELULOSA

---

Esta técnica se basa en colocar un filtro de nitrocelulosa encima del gel y que sea de la misma longitud que éste. A través de una solución tampón se establece una corriente de capilaridad ascendente transfiriéndose las cadenas de ADN (desnaturalizadas: forma monocatenaria) del gel al filtro, uniéndose el ADN irreversiblemente al filtro de nitrocelulosa por enlaces covalentes al sufrir éste un proceso de calentamiento durante un tiempo determinado.

Esta transferencia es importante ya que en el filtro se mantiene la posición relativa de los fragmentos de ADN del gel.

## 6.- HIBRIDACION

-----

La hibridación consiste en la colocación del filtro de nitrocelulosa en una solución que contenga la sonda específica, de manera que si existe una secuencia altamente complementaria en el filtro a nuestra sonda específica se formará en el "lugar" un híbrido (cadena duplex). No toda la superficie del filtro retiene ADN, lo cual es un problema, ya que nuestra sonda específica se unirá preferentemente a los lugares vacíos del filtro, antes que a su secuencia de ADN complementaria. Para que no ocurra esto, previamente se realiza una prehibridación introduciendo el filtro en una solución de ADN inespecífico (se ha de controlar muy bien que no tenga secuencias complementarias a nuestra sonda ya que nos induciría posteriormente a error). Todo el área del filtro donde no exista ADN quedará bloqueado con el ADN inespecífico también desnaturalizado. Una vez hecha la prehibridación ya tenemos el filtro preparado para realizar la hibridación. Primero se pone el filtro en contacto con una solución de ADN inespecífico para que busque su secuencia complementaria e hibride. Seguidamente ya disponemos del filtro en condiciones para realizar la hibridación con la sonda específica, que sólo se unirá a una secuencia del filtro altamente complementaria a ella. (Normalmente se encuentran varios fragmentos hibridados).

Terminada la hibridación, el filtro se lava convenientemente y sólo queda fijado en él el ADN que se ha hibridado con la sonda específica.

## 7.- REVELADO

-----

El revelado se hace según el sistema de marcaje de la sonda específica. La sonda se marca preferentemente de forma radiactiva y con  $^{32}\text{P}$  con una marca uniforme e interna por la técnica del "Nick translation" (introducción al azar de nucleótidos marcados).

Se utiliza el  $^{32}\text{P}$  por sus características de:

1.- Alta energía, que le confiere un poder de penetración muy elevado por lo que el tiempo de exposición a la película es muy corto (1 noche).

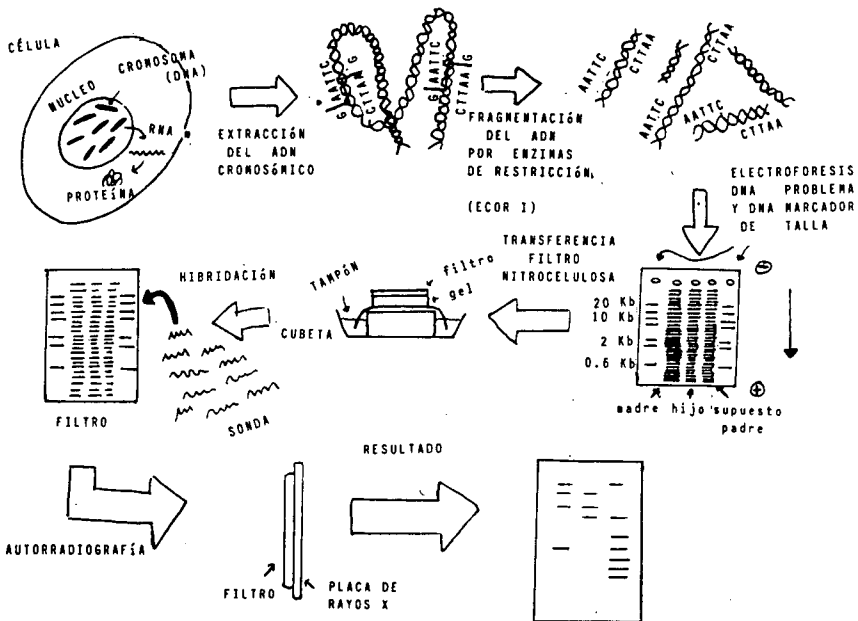
2.- Alta sensibilidad , significa que por pocas moléculas marcadas que existan en el medio, con éste isótopo se detectarán.

3.- Vida muy corta (aproximadamente de un mes) esto es una ventaja en lo que se refiere a la contaminación pero una desventaja ya que una vez recibido del fabricante se ha de utilizar con cierta rapidez.

Tiene muchas ventajas frente a otros isótopos radiactivos, pero tiene un inconveniente y es que es muy peligrosa su manipulación, debiéndose de utilizar medidas especiales. La alternativa al  $^{32}\text{P}$  es el  $^{35}\text{S}$ , ya que tiene unas características bastante aceptables y no es tan peligroso.

Para la detección de los recombinantes (sonda + secuencia de ADN hibridado) se utilizan placas de autorradiografía (rayos X). Se puede hacer por autorradiografía o por fluorografía. La radiación impresiona la placa, se realiza a  $-70^{\circ}\text{C}$  en una caja hermética y sin luz durante 20 a 70 horas.

La talla de los fragmentos se determina por movilidad relativa con una standard. Se calcula la longitud del fragmento con la ayuda de un programa informático.



## BIBLIOGRAFIA

=====

BAIGET M. y cols.  
Diagnóstico prenatal de la beta-Talasemia mediante estudio del ADN. Primera experiencia en España.  
Barcelona (Biología & Clínica Hematológica) 1986

BAIRD M., KANTER E., SHALER R., BALAZS I.  
Application of DNA polymorphisms to the forensic examination of dried blood stains.  
Advances in Forensic Haemogenetics 1 (Springer-Verlag) 1986

BAIRD M., GIUSTI A., BALAZS I., GLASSBERG J.  
Application of DNA polymorphisms to the forensic examination of semen.  
Advances in Forensic Haemogenetics 1 (Springer-Verlag) 1986

BALAZS I. and cols.  
Application of DNA polymorphisms to the determination of paternity.  
Advances in Forensic Haemogenetics 1 (Springer-Verlag) 1986

BOLUND L.  
Recent Research on Human DNA-polymorphism  
Advances in Forensic Haemogenetics 1 (Springer-Verlag) 1986

BRUNEL D.  
La genética al servicio de los carnets de identidad  
(Mundo Científico) 1987

GILL P.  
A new method for sex determination of the donor of forensic samples using a recombinant DNA probe.  
Berkshire (Electrophoresis) 1987

GILL P., LYGO J.E., FOWLER S.J., WERRETT D.J.  
An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purposes  
Berkshire (Electrophoresis) 1987

JEFFREYS A.J., WILSON V., THEIN S.L.  
Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA  
Leicester (Nature) 1985

OLD R.W., PRIMROSE S.B.  
Principios de Manipulación Genética. Introducción a la  
ingeniería genética.  
Zaragoza (Acribia) 1985

ROBERTS D.F., PAPIHA S.S., BHATTACHARYA S.S.  
A case of disputed maternity  
Newcastle (The Lancet) 1987

WATSON J.D., TOOZE J., KURTZ D.T.  
ADN Recombinante. Introducción a la ingeniería genética  
Barcelona (Labor) 1986

## Capítulo 12

---

### PARAMETROS ESTADISTICOS EN LA INVESTIGACION BIOLOGICA DE LA PATERNIDAD. EXCLUSION Y PRUEBA POSITIVA DE PATERNIDAD.

---

Angel CARRACEDO, Emili HUGUET y Francisco BARROS

---

A menudo se confunden, no sólo en los medios de comunicación sino en textos legales o médicos, términos como probabilidad de exclusión a priori o probabilidad de paternidad y se escucha que hoy la ciencia puede alcanzar el 99,99 % en esta materia, sin especificarse en absoluto lo que con esa cifra se quiere expresar.

Dividiremos este capítulo en dos partes. En la primera estudiaremos como se evalúa la utilidad de un marcador o un conjunto de marcadores en este tipo de prueba, y en la segunda veremos como se puede llegar a una exclusión de paternidad, o, en caso contrario, como se valora la prueba positiva de paternidad.

#### 1. Evaluación de la utilidad de un marcador o de un conjunto de marcadores.

---

Se conoce como "probabilidad de exclusión a priori" de un marcador genético en una población determinada, al porcentaje de presuntos padres falsamente imputados cuya paternidad quedaría excluida en base a ese marcador. Es bastante sencillo calcular la probabilidad de exclusión a priori de la paternidad para un sistema de dos alelos codominantes. En este caso la probabilidad de exclusión viene dada por la siguiente fórmula:

$$p = p_1 p_2 (1 - p_1 p_2)$$

donde  $p_1$  es la probabilidad de que un individuo sea transmisor del gen 1 y  $p_2$  es la probabilidad de que un individuo sea transmisor del gen 2.

La fórmula anterior se deduce del análisis estadístico de los sucesos de incompatibilidad genética

que pueden presentarse a peritación. Estos sucesos y sus probabilidades de ocurrencia figuran en la tabla que a continuación exponemos:

Tabla 1

SUCESO	MADRE	HIJO	PRESUNTO PADRE	P(S <sub>i</sub> )
S1	1-1	2-1	1-1	p14.p2
S2	2-2	2-1	2-2	p1.p24
S3	2-2	2-1	1-1	p12.p23
S4	2-2	2-2	1-1	p13.p22
S5	1-1	1-1	2-2	p13.p22
S6	2-1	1-1	2-2	p12.p23

Las probabilidades que figuran en la última columna del cuadro anterior se han obtenido de la siguiente forma:

$$P(S_i) = P(A_i \cdot B_i \cdot C_i)$$

donde A, B y C representan, respectivamente el fenotipo de la madre, el hijo y el presunto padre, correspondientes a cada suceso (i=1,2,...,6).

Como el fenotipo del presunto padre es, en estos casos, independiente de los fenotipos de la madre y del hijo, esta probabilidad puede expresarse como:

$$P(S_i) = P(A_i \cdot B_i) \cdot P(C_i) = P(A_i) \cdot P(B_i / A_i) \cdot P(C_i)$$

La probabilidad de que el fenotipo del presunto padre sea 1-1 es igual a p12, ya que es la probabilidad de que tanto su padre como su madre le transmitiese el gen 1, y la probabilidad de que el fenotipo del presunto padre sea 2-2 es, por un razonamiento similar, igual a p2.

Por lo que respecta al fenotipo de la madre las probabilidades serán: p12 (cuando el fenotipo es 1-1), p22 (cuando el fenotipo es 2-2) y 2.p1.p2 (cuando el fenotipo es 2-1). Esta última probabilidad resulta de sumar la probabilidad de que su padre le transmita el gen 1 y su madre el 2 (p1.p2) y la probabilidad de que su padre le transmita el gen 2 y su madre el 1 (p.p).

Por lo que respecta a la probabilidad del fenotipo del hijo condicionada al fenotipo de la madre, tenemos que examinar cada uno de los seis casos:

En el primer suceso  $P(B1/A1)=p2$ , ya que si la madre le transmite el gen 1 el fenotipo del hijo sólo



puede ser 2-1 si el padre le transmite el gen 2 y la probabilidad de que esto ocurra es por definición  $p$ .

En el segundo suceso  $P(B2/A2)=p_1$ , ya que si la madre le transmite el gen 2, el fenotipo del hijo sólo puede ser 2-1 si recibe del padre el gen 1, y la probabilidad de que esto ocurra es  $p$ .

En el tercer suceso  $P(B3/A3)=p_2$ , ya que, dado que la madre le ha transmitido el gen 2, el fenotipo del hijo sólo será 2-2 si el padre le transmite también el mismo gen.

En el cuarto suceso  $P(B4/A4)=1/2.p_2$ , ya que, una madre de fenotipo 2-1 transmitirá a su hijo el gen 2 con una probabilidad de  $1/2$ , y la probabilidad de que el hijo tenga el genotipo 2-2 será igual a la probabilidad de que esta madre le transmita el gen 2 ( $1/2$ ) por la probabilidad de que el padre le transmita el gen 2 ( $p$ ).

En el quinto suceso  $P(B5/A5)=p_1$ , ya que si la madre le transmite el gen 1 la probabilidad de que el fenotipo del hijo sea 1-1 es igual a la probabilidad de que el padre le transmita también el mismo gen.

Finalmente, en el sexto suceso  $P(B6/A6)=1/2.p_1$ , ya que la probabilidad de que una madre de fenotipo 2-1 transmita a su hijo el gen 1 es igual a  $1/2$  (recordemos que se trata de genes codominantes) y la probabilidad de que el padre le transmita el mismo gen es  $p$ .

La probabilidad de exclusión es la probabilidad de que se presente a peritación alguno de los seis sucesos mencionados y por lo tanto será la suma de las probabilidades que figuran en la última columna del cuadro (ya que por tratarse de sucesos disjuntos la probabilidad de su unión es igual a la suma de sus probabilidades).

Efectuando algunas simplificaciones matemáticas esta suma se convierte en:

$$p = p \cdot p (1-p \cdot p)$$

$$\text{como } p = 1-p, p \text{ puede expresarse como:}$$

$$p = p^2 - 2 \cdot p^3 + p^4$$

y a partir de esta última expresión podemos representar gráficamente  $p$  en función de  $p$  (figura).

Esto significa que, con el análisis de un sistema determinado por dos alelos codominantes, no es

posible matemáticamente obtener una probabilidad de exclusión superior al 18,75 %.

La probabilidad de transmitir el gen 1 ( $p_1$ ) y la probabilidad de transmitir el gen 2 ( $p_2$ ) equivalen a sus frecuencias génicas y su cálculo se efectúa tal como hemos señalado en capítulos precedentes.

Los intervalos de confianza del 95 % para estas probabilidades se han obtenido mediante fórmulas:

$$\hat{p}_1 \pm 1,96 \sqrt{\hat{p}_1 \cdot \hat{p}_2 / N}$$

$$\hat{p}_2 \pm 1,96 \sqrt{\hat{p}_1 \cdot \hat{p}_2 / N}$$

donde 1,96 es el valor de la variable normal típica para un nivel de confianza del 95 %,  $\hat{p}_1$  y  $\hat{p}_2$  son los valores estimados de las probabilidades y N el tamaño de muestra.

Así, como  $\hat{p}_1$  y  $\hat{p}_2$  nos permiten estimar  $p_e$ , extremos de estos intervalos también nos permiten obtener un intervalo para  $p_e$ .

Cuando el tipo hereditario viene determinado por tres alelos codominantes de cuyas combinaciones resultan seis fenotipos la  $p_e$  viene dada por la fórmula

$$p_e = (p_1^2 + p_2^2 + p_3^2) - (p_1 p_2 + p_1 p_3 + p_2 p_3) + 6p_1 p_2 p_3 + 4p_1 p_2 p_3 (p_1 + p_2 + p_3)$$

donde  $p_1$  es la probabilidad de que un individuo transmisor del alelo 1,  $p_2$  la probabilidad de que un individuo sea transmisor del alelo 2 y  $p_3$  la probabilidad de que sea transmisor del alelo 3.

La fórmula anterior se deduce del análisis estadístico de los sucesos de incompatibilidad genética que pueden presentarse a peritación y su cálculo es laborioso que en el caso anterior de un sistema codominante bialélico.

A medida que aumenta el número de alelos, el cálculo se complica extraordinariamente. Afortunadamente se han desarrollado fórmulas generales para el cálculo de la probabilidad de exclusión a priori para sistemas con un número cualquiera de alelos codominantes (1) relativamente fáciles de procesar en lenguaje BASIC, como se indica a continuación:

```
10 REM ++ PROBABILIDAD DE EXCLUSION A PRIORI ++
20 INPUT "NOMBRE DEL SISTEMA"; N $
30 INPUT "NUMERO DE ALELOS"; N
40 DIM A (N): DIM A $ (N)
50 FOR I = 1 TO N
```

```

60 PRINT TAB (25) "SISTEMA", N $
70 PRINT TAB (25) "*****"
80 PRINT TAB (10) "NUMERO DEL ALELO"; I = INPUT A $ (I)
90 PRINT TAB (10) "FRECUENCIA DEL ALELO"; A $ (I):
    INPUT A (I)
100 IF A (I) 1 THEN 90
110 Z = Z + A (I)
120 NEXT I
130 FOR I = 1 TO N
140 S = A (I) * (1-A (I)) * (1-A (I) * (1-A (I)))
150 T = T+S
160 NEXT I
170 FOR I = 1 TO N
180 FOR J = 1 TO N
190 IF I = J THEN 220
200 S=A (I) * A (J) * (A (I) + A (J)) * (1-A (I) - A
    (J)) * (1 - A (I) - A (J))
210 T = T + S
220 NEXT J
230 NEXT I
240 PRINT "PROBABILIDAD DE EXCLUSION DEL SISTEMA" N $,
    T * 100 "%"
250 END

```

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 sencillo 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:

$P_{ex}$  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. En la mayor parte de los países europeos suele ser obligatorio indicar, en los informes, la probabilidad de exclusión a priori que ese laboratorio posee, como medida de la eficacia que puede proporcionar. Así, si un laboratorio utiliza sólo los antígenos eritrocitarios, con una probabilidad de exclusión baja es lógico que ofrezca, en un caso concreto, una probabilidad de paternidad baja (en caso de no exclusión), mientras que el hecho tendría muy

distinta significación si la probabilidad de exclusión a priori de ese laboratorio fuese elevada. En nuestro país, se considera que todo laboratorio está capacitado para realizar este tipo de prueba cuando alcanza al menos un 99% de probabilidad de exclusión a priori.

En la Tabla 2 se muestran las probabilidades de exclusión individuales y acumulativas de los marcadores genético-moleculares analizados en la población gallega (3).

Tabla 2

Marcador	%	Marcador	%
1. PGM1	31,90	21. ESD	10,87
2. MNSs	31,63	22. ALADH	7,03
3. Pi	31,34	23. PGP	6,88
4. Rh	29,90	24. Xg	6,74
5. Gc	29,01	25. GALT	6,67
6. Gm (1,2,4)	23,62	26. ADA	4,50
7. ACP	20,43	27. Colinesterasa (C5)	4,37
8. ABO	19,11	28. UMPK	4,17
9. GPT	18,75	29. K	3,69
10. GLO	18,75	30. AK	3,58
11. Jk	18,69	31. AMY2	2,75
12. ORM	18,67	32. Colinesterasa (Locus E1)	2,55
13. Hp	18,47	33. GOT2	2,42
14. ME2	18,32	34. 6-PGD	2,11
15. Tf	17,87	35. Lu	1,92
16. Fy	17,80	36. Pep A	1,11
17. PGM3	17,28	37. Gd	1,01
18. C3	14,76	38. P1	0,93
19. PLG	13,44	39. Cp	0,19
20. Bf	13,31		
Acumulativa.....			99,63

El 99,63 % de probabilidad de exclusión a priori acumulativa, se puede incrementar al 99.997 % con el uso de los HLA. Esto quiere decir que sólo 3 de 100000 individuos falsamente imputados no podrían ser excluidos de forma directa, lo cual es ciertamente improbable, pero, además, como veremos, es bastante probable que aún en esos casos se pudiese sospechar la no paternidad.

En los últimos años se ha hecho común la determinación de la eficiencia bioestadística de un sistema a la investigación biológica de la paternidad (4) que es un parámetro que indica la eficacia media

real en términos de valor Essen-Möller (EM) ( $\log Y/X+10$ ) de un marcador en la prueba positiva de paternidad. Este valor se calcula a partir de los valores EM de cada combinación presunto padre-madre-hijo, teniendo en cuenta su probabilidad relativa de ocurrencia. En nuestro país se ha desarrollado un programa en BASIC (Departamentos de Medicina Legal de Barcelona y Santiago de Compostela) para el cálculo de estos valores tanto de forma individual como acumulativa.

En la Tabla 3 se muestra la eficacia bioestadística de los marcadores estudiados en la población gallega (5). Los valores EM, como se ve, no son completamente equivalentes a los valores de probabilidad de exclusión a priori, y representan un índice más exacto para evaluar la eficacia de un laboratorio en la prueba positiva de paternidad.

Tabla 3

Orden de 39 sistemas analizados en la población gallega por su eficacia en la exclusión y por su eficacia bioestadística en la prueba positiva.

Eficacia en la exclusión		Eficacia bioestadística	
1. PGM1	21. ESD	1. Pi	21. ESD
2. MNSs	22. ALADH	2. PGM1	22. PGP
3. Pi	23. PGP	3. Rh	23. GALT
4. Rh	24. Xg	4. MNSs	24. ALADH
5. Gc	25. GALT	5. Gc	25. ADA
6. Gm(1,2,4)	26. ADA	6. Gm(1,2,4)	26. Xg
7. ACP	27. C5	7. ACP	27. UMPK
8. ABO	28. UMPK	8. ABO	28. C5
9. GPT	29. K	9. GPT	29. AK
10. GLO	30. AK	10. Tf	30. K
11. Jk	31. AMY2	11. ORM	31. AMY2
12. ORM	32. E1	12. GLO	32. E1
13. Hp	33. GOT2	13. Hp	33. 6-PGD
14. ME2	34. 6-PGD	14. Jk	34. GOT2
15. Tf	35. Lu	15. Fy	35. Pep A
16. Fy	36. Pep A	16. Bf	36. Lu
17. PGM3	37. Gd	17. C3	37. Gd
18. C3	38. P1	18. ME2	38. P1
19. PLG	39. Cp	19. PGM3	39. Cp
20. Bf		20. PLG	

Hemos de recalcar que tanto la probabilidad de exclusión a priori como la eficiencia bioestadística de un sistema o de un conjunto de marcadores, son valores

que dependen del polimorfismo del sistema, y que sirven para evaluar la utilidad a priori de un conjunto de marcadores o de uno en particular a la investigación biológica de la paternidad, pero no indican nada del resultado a posteriori de un caso concreto.

## 2. Exclusión de la paternidad

-----

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. En el primer caso hay que indicar, ante todo, que no todas las exclusiones poseen el mismo valor.

Clásicamente, se consideran dos tipos de exclusiones: las de primer orden, directas o basadas en la primera regla de Landsteiner, y las de segundo orden, indirectas o basadas en la segunda regla de Landsteiner.

Existen distintas versiones para definir ambas reglas, desde las primeras de Landsteiner hasta las más actuales (6) en las que se consideran sistemas no codominantes y multialélicos que no se tenían en cuenta en la primera definición. En resumen, podemos definir exclusión de primer orden, directa o basada en la primera regla de Landsteiner, aquella en la que no existe posibilidad de error por la existencia de alelos silentes o que se comporten como tales. El caso más sencillo sería cuando el hijo posee algún alelo nuevo no presente en ninguno de los padres. Otro caso sería cuando el padre es heterocigoto y el hijo no posee ninguno de sus alelos.

La exclusión de segundo orden, indirecta o basada en la segunda regla de Landsteiner es aquella en la que existe riesgo de error por alelos silentes, siendo el caso más sencillo (Fig.2) aquel en el que el padre e hijo son homocigotos para alelos distintos.

Los alelos silentes existen en mayor o menor grado para todos los polimorfismos genéticos dependiendo del sistema y de la población que se considere. En la población caucasoide (Tabla 4) están estimadas las frecuencias de alelos silentes para todos los sistemas genéticos que se utilizan en la investigación biológica de la paternidad (7).

Tabla 4

Frecuencia génica estimada de alelos silentes (pobl. caucasoide)

Sistema	% observado de silencias maternas	% observado de silencias paternas
Rh	0,06	0,08
MNSs	0,01	0,15
Kell	0,22	0,00
Duffy	0,44	0,49
Kidd	0,04	0,13
ACP	0,23	0,34
ESD	0,08	0,06
GLO	0,08	0,10
PGM1	0,11	0,09
Gm	0,04	0,012
Bf	0,09	0,08
Gc	0,00	0,00
Hp	0,08	0,13
Tf	0,12	0,00
PLG	0,39	0,13

En algunos casos no son alelos propiamente silentes los que inducen a error en las exclusiones de segundo orden, sino alelos raros no detectados que se comportan como tales (tal es el caso del Mg en el sistema MNSs, el Cw en el Rh, etc).

Por todo lo indicado las exclusiones de segundo orden son evidentemente menos seguras que las exclusiones de primer orden, ya que en éstas la única probabilidad de error son fallos técnicos o bien la remotísima posibilidad de una mutación puntual que cree un hipotético alelo mutante igual a otro existente (la tasa de mutación general para la especie humana es de  $10^{-6}$  por locus y generación).

En la actualidad, en nuestro país, no se consideran en principio como una situación de exclusión en un caso de investigación biológica de la paternidad las exclusiones aisladas (por un sólo marcador) de segundo orden y en caso de exclusiones aisladas de primer orden o de únicamente dos exclusiones de segundo orden, se obliga a calcular la probabilidad de paternidad sin tener en cuenta los marcadores que han producido la exclusión, para adoptar entonces una conclusión global. En el supuesto de que el número de exclusiones sea mayor que el antes indicado, la exclusión se consideraría como probada.

En la Tabla 5 se expone un caso de exclusión probada de paternidad:

Tabla 5

Sistema	Padre	Madre	Hijo	Comentario
ABO	OO	OO	OO	No exclusión
Duffy	FyaFyb	FyaFyb	FyaFyb	No exclusión
Rh	ddCcEe	ddCcEe	DCcEe	Excl. de 1er.orden
Kidd	JkaJkb	JkaJka	JkaJka	No exclusión
PGM	1+1+	1-2-	1-2-	Excl. de 1er.orden
AçP	AB	BC	BC	No exclusión
EsD	1-1	1-1	1-1	No exclusión
Pi	M1M1	SS	SS	Excl. de 2º orden
Gc	1S-1S	2-2	2-2	Excl. de 2º orden
Tf	C1C1	C1C1	C1C1	No exclusión

### 3. Prueba positiva de paternidad

Tradicionalmente se consideraba, y aún hoy erróneamente algunos lo hacen, a la exclusión de paternidad como una prueba segura ya la afirmación de la paternidad como una imposibilidad técnica. Esto es, en la actualidad, radicalmente falso. Hace años, cuando sólo se utilizaban unos pocos marcadores genéticos y se le daba sólo valor a la exclusión, era excepcional alcanzar una probabilidad de paternidad alta, pero hoy no es así. En general, para un laboratorio convenientemente dotado, las probabilidades de paternidad, que en caso de no exclusión se alcanzan, son en promedio bastante mayores que la seguridad de exclusión para un marcador aislado.

Hoy por hoy pues, no es admisible no excluir una paternidad e ignorar simultáneamente la prueba positiva, que en muchos casos puede tener un valor como evidencia tan alto o más que una exclusión.

Las bases del cálculo de paternidad, en la prueba positiva, se basan en el Teorema de Bayes, obra póstuma de un pastor presbiteriano publicada en 1763, que define el cálculo de las probabilidades condicionadas.

Veremos el caso más sencillo: el de un sólo hombre involucrado y un sistema bialélico codominante.

En este caso se pueden establecer en principio dos hipótesis  $H(1)$  según la que el presunto padre es el padre biológico del niño 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 =  $P_0$  para  $H(1)$  y  $1-P_0$  para  $H(2)$ . La suma de ambas probabilidades es 1 (100%) pues, lógicamente, alguna tiene que suceder.

Si la hipótesis  $H(1)$  se realiza, basta calcular la probabilidad de observar los tres fenotipos, del presunto padre (P), madre (M) y del hijo (N) conjuntamente y por lo tanto:

$$\Pr[P, M \text{ y } N/H(1)] = \Pr[P] \cdot \Pr[M] \cdot \Pr[N/P.M]$$

como el fenotipo del presunto padre es independiente bajo la hipótesis  $H(2)$  de la pareja Madre-Hijo=

$$\Pr[P, M \text{ y } N/H(2)] = \Pr[P] \cdot \Pr[M] \cdot \Pr[N/M]$$

Según el teorema de Bayes la probabilidad a posteriori ( $P'$ ) de paternidad del presunto padre sería:

$$P' = \frac{P_0 \cdot \Pr[P, M \text{ y } N/H(1)]}{P_0 \cdot \Pr[P, M \text{ y } N/H(1)] + (1-P_0) \cdot \Pr[P, M \text{ y } N/H(2)]}$$

Aplicando las fórmulas anteriores,

$$P' = \frac{P_0 \cdot \Pr[P] \cdot \Pr[M] \cdot \Pr[N/P.M]}{P_0 \cdot \Pr[P] \cdot \Pr[M] \cdot \Pr[N/P.M] + (1-P_0) \cdot \Pr[P] \cdot \Pr[M] \cdot \Pr[N/M]}$$

Simplificando,

$$P' = \frac{P_0 \cdot \Pr[N/P.M]}{P_0 \cdot \Pr[N/P.M] + (1-P_0) \cdot \Pr[N/M]}$$

Si consideramos que  $P_0$  tiene un valor de 0,5, esto es, otorgamos a priori al supuesto padre tanta probabilidad de ser el padre como de no serlo, la fórmula se puede simplificar todavía más:

$$P' = \frac{\Pr[N/P.M]}{\Pr[N/P.M] + 1 \cdot \Pr[N/M]}$$

A la probabilidad a posteriori ( $P'$ ) se le suele designar como  $W$ , y la fórmula se suele expresar como:

$$W = \frac{X}{X+Y} \quad , \quad W = \frac{X/Y}{(X/Y)+1} \quad \text{ó} \quad W = \frac{1}{1+(Y/X)}$$

siendo  $X$  pues, 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-Möller (8) quien fue, pues, el pionero del cálculo moderno de la probabilidad de paternidad.

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. En casi todos los países, en el conjunto de peritajes sobre investigación biológica de la paternidad, el número de exclusiones es muy inferior al de paternidades prácticamente probadas. Por ello se popularizó bastante en la década de los setenta el empleo de 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 ha vuelto a la hipótesis inicial de Essen-Möller de considerar  $P_0=0,5$ , en todo caso menos ventajosa y por ello más rigurosa, aunque persisten opiniones encontradas (9).

Además del valor W, se usan a menudo otros parámetros como el índice de paternidad (10) que es el cociente  $X/Y$  ( $IP=X/Y$ ) muy usado en muchos países pues es de una fácil comprensión práctica o el llamado valor EM (11) que es el  $\log Y/X+10$  muy usado para la computorización de los resultados. En todo caso estos parámetros son totalmente superponibles al valor W que es el más usado en los países europeos en general.

Para sistemas codominantes la aplicación del teorema de Bayes y de la fórmula de Essen-Möller es muy 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 fenotipo. 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.

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 (1).

Para sistemas con fenómenos de dominancia y recesividad los cálculos se complican y se suelen aplicar, en ese caso, los métodos manuales de cálculo denominados Logic I y Logic II aprobados por la AABB (The American Associations of Blood Banks) en 1982, basados como los métodos anteriores en la aplicación directa del teorema de Bayes (12).

También es relativamente común utilizar tablas como las de Hummel en las que para determinados marcadores de cálculo difícil está indicada la probabilidad de paternidad para cada combinación. Su problema es que utilizan frecuencias génicas de la población alemana y aplicadas a nuestra población producen un error de más o menos un predicado verbal (13).

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, de modo que :

$$W \text{ acumulativa} = \frac{X_a \cdot X_b \dots X_n}{X_a \cdot X_b \dots X_n + Y_a \cdot Y_b \dots Y_n}$$

En la actualidad en prácticamente todos los países se utilizan programas computorizados 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. Estos casos son muchísimo más complicados y su resolución obliga al uso de programas.

En nuestro país se han desarrollado programas en BASIC (Barcelona y Santiago) que cubren la mayoría de los casos. Para los más complicados se puede recurrir al Prof. Dr. M.P. Baur (Institut für Medizinische Dokumentation und Statistik, S. Freud Straße, D-5300

Bonn-Venusberg, FRG) o al Prof. Dr. K. Hummel (Institut für Blutgruppenserologie, Hermann Herder Straße 11, D-7800 Freiburg, FRG) quienes poseen los programas más completos en esta materia.

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, que se indican en la Tabla 6.

Tabla 6

$W \geq 99,73\%$	paternidad "prácticamente probada"
$W \geq 99 \dots < 99,73\%$	paternidad "extremadamente probable"
$W \geq 95 \dots < 99\%$	paternidad "muy probable"
$W \geq 90 \dots < 95\%$	paternidad "probable"
$W > 50 \dots < 90\%$	paternidad más probable que no paternidad
$W \leq 0,27\%$	paternidad "prácticamente excluida"
$W \leq 1 \dots > 0,27\%$	paternidad "extremadamente improbable"
$W \leq 5 \dots > 1\%$	paternidad "muy improbable"
$W \leq 10 \dots > 5\%$	paternidad "improbable"
$W < 50 \dots > 10\%$	no paternidad más probable que paternidad

En los últimos años se ha producido un cambio importante en la mentalidad de los peritos en esta materia. No se dan valores nunca absolutos, se sabe que tanto la exclusión como la afirmación, como cualquier prueba pericial en cualquier materia, son valorables en términos de probabilidad y simplemente se le da al Juez un valor para que tome una decisión. Ahora bien ¿qué valora el Juez para formular su fallo?. Se ha señalado (14) que durante el proceso gradual de análisis de las pruebas, el juez adquiere una "conciencia subjetiva de una solución" y, por ende, de la sentencia. Un elemento esencial en la toma de decisión es la comparación del caso que le ocupa con un conjunto de casos similares que haya vivido. Probabilísticamente, el Juez aplica el modelo de toma de decisiones de Neyman y Pearson, es decir, se adopta una decisión, para ese caso, en base a su relación con los resultados de casos anteriores.

La decisión la toma el Juez, no el perito, y éste es el motivo para que, como dice Hummel (15), el perito no aplique método alguno para la toma de

decisiones. Lo que hace es facilitar al Juez un medio para la adopción de decisiones. Por consiguiente, el método de Neyman y Pearson, independientemente de la forma, está fuera de lugar en manos del perito.

En lo que se refiere en concreto a las pruebas biológicas de paternidad, el Juez tampoco necesitaría aplicar el método Neyman-Pearson, pues de acuerdo con Ihm (16) basta el teorema de Bayes para la toma de decisiones. Su razonamiento es el siguiente: en el momento de tomar decisiones, los apriorismos individuales, globales y neutros, armonizados entre sí, generan una conclusión imaginaria. Si ésta es superior a un valor determinado -igualmente imaginario- resulta posible considerar la paternidad probada. En este proceso se adquiere un cierto conocimiento del mayor error posible. Si el umbral de la decisión permaneciese siempre en el mismo punto, el mayor error posible que habría que aceptar tendría siempre el mismo tamaño.

Aunque en España, por lo tardío de la utilización de esta prueba no existe esta experiencia, en Europa, a lo largo del tiempo la praxis forense no ha considerado un valor fijo para el mayor error posible. El umbral de la decisión se ha ido elevando continuamente y, por tanto, el máximo error posible se ha ido reduciendo. A principio de la década de los setenta se consideraba que un  $W=90\%$  era una prueba significativa de paternidad, y hoy, en casi toda Europa y Estados Unidos, se precisa alcanzar el límite de 99,73% para considerar la paternidad prácticamente probada. Los actuales valores de  $W$  alcanzan y superan casi siempre este límite en casos positivos y la cuantía del mayor error posible es prácticamente despreciable. Este límite aporta al Juez una prueba afirmativa de tal entidad que podría parecer que su decisión ha sido prefabricada por el perito. El grado de error es similar y muy bajo tanto en la afirmación como en la exclusión, en valores absolutos y en los casos extremos (exclusión por varios marcadores o probabilidad superior al 99,73%). En estos límites extremos el perito se encuentra a punto de suplantar el papel de Juez. Evidentemente la conciencia de esta realidad no debe inducir al especialista a considerarse como un Juez en los límites intermedios, aunque en nuestro país, tenga el primero la impresión de que los jueces no van a emplear, en estos casos intermedios un modelo de toma de decisiones en los que evalúen de forma objetiva las diferentes pruebas, por lo menos de momento.

Incluso en los límites extremos al Juez le compete evaluar muchos datos que el perito considera a priori como evidencias y que pueden no serlo, como la credibilidad a priori de que la madre es la madre real

del niño u otras. El valor W final que el perito presenta, no comprende ninguna evidencia circunstancial derivada de la presentación de las pruebas en el tribunal. Si así lo hiciese, el perito habría aportado unos cuantos apriorismos globales y estaría en condiciones de suplantar al Juez. En realidad sólo dispone el perito de sus conclusiones genéticas y estadísticas, y el fallo, es decir la evaluación global debe seguir siendo, a pesar del progreso experimentado en este tipo de pruebas, dictaminado por el Juez.

En definitiva la evaluación de dictámenes de paternidad es un modelo ideal para la introducción de conceptos probabilísticos y para la evaluación de la evidencia que se debería ir haciendo extensiva a todos los peritajes médicos. Es doloroso para los peritos constatar como en casos no límites (probabilidad del 90% por ejemplo con el padre fallecido) (17) los jueces no hayan evaluado objetivamente ese valor, y en cambio se admitan como seguros dictámenes sobre diversas materias con un tanto por ciento de riesgo considerablemente mayor.

La evaluación tan concreta (un porcentaje) que el perito ofrece en esta prueba, y su conciencia clara de que es el Juez en definitiva el que debe tomar una decisión final, debe ir contrastada con una formación especializada y rigurosa del Juez en este terreno, que deseamos no tarde en llegar.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Carracedo, A. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (1982).
2. Gené, M. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona (1985).
3. Carracedo, A., L. Concheiro, M.S. Rodríguez-Calvo, M.D. Montiel. Plasma protein and red cell enzyme groups in Galicia (North West Spain). *Z. Rechtsmed.* 98: 133-140 (1987).
4. Hummel, K., J. Conradt, O. Kundinger. The realistic prior probability from blood group findings for cases involving one or more men. Part I: The mathematical basis. En K. Hummel, J. Gerchow (eds.). *Biomathematical evidence of paternity*, pp 73-81. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg (1981).
5. Rodríguez-Calvo, M.S. Marcadores genéticos del cromosoma 6p: análisis de desequilibrio de ligamiento y su aplicación en la investigación biológica de la paternidad. Tesina de licenciatura. Universidad de Santiago de Compostela (1986).
6. Conradt, J. Inaugural-Dissertation (Hum. Biol.) Marburg (1983).
7. Polesky, H.F. The frequency of "null" genes calculated from trios in disputed parentage cases. *For. Sci. Int.* 23: 69 (1983).
8. Essen-Möller, E. Die Beweiskraft der Ähnlichkeit in Vaterschaftsnachweis-theoretische Grundlagen. *Mitt Antrop. Ges (Wien)* 68: 9-53 (1938).
9. Hummel, K. The positive proof of parentage in blood group opinions using serostatistical methods. International Congress of the Society for Forensic Hemogenetics, Munich, Oct. (1983).
10. Martin, W., V. Sachs, W. Weise. Statistische interpretation von serologischen befunden für beurteilung einer vaterschaft. *Bundesgesundheitsblatt* 15: 257-259 (1969).
11. Ihm, P., K. Hummel. II Mitteilung: beschreibung eines computer. Programs zur berechnung von  $\log Y/X+10$

und W.Z. immunitaetsforsch 151: 374-379 (1976).

12. Silver, H. Probability of inclusion in paternity testing: a technical workshop. The American Association of Blood Banks. Arlington, Virginia (1982).

13. Hummel, K. Biostatistical opinion of parentage. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart (1971).

14. Hummel, K. The expert's view of the evidence situation in cases of dispute descendance. International Congress of the Society for Forensic Hemogenetics, Munich, Oct. (1983).

15. Hummel, K. Neue möglichkeiten in der serostatistik der abstammungsbegutachtung sowie einige bemerkenswerte fälle aus der praxis. Ärztl. lab. 12: 16-20 (1983).

16. Ihm, P., K. Hummel. Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit aus blutgruppenbefunden unter beliebiger einbeziehung von verwandten. Z. Immun. forsch. 149: 40 (1975).

17. Ruiz de la Cuesta, J.M. Comunicación personal.



## Capítulo 13

---

PROCOLOS DE INVESTIGACION BIOLOGICA DE LA PATERNIDAD.  
=====

CAPACITACION DEL PERSONAL Y HOMOLOGACION DE LOS CENTROS.  
=====

LINEAS ACTUALES DE INVESTIGACION.  
=====

Angel CARRACEDO y M<sup>a</sup> Dolores MONTIEL

---

A medida que se fueron utilizando pruebas biológicas para resolver cuestiones de paternidad, los propios peritos u organismos judiciales en otros casos, comprobaron la necesidad de una unificación de criterios y se establecieron las normas ("guidelines") de investigación biológica de la paternidad, que en casi todos los países alcanzaron rango de ley. Se trataba de obligar al cumplimiento de unas normas básicas comunes, y especificar que métodos y sistemas genéticos se podrían aplicar y como se debían evaluar los resultados.

En Alemania el entonces denominado Ministerio de la Salud del Reich, publicó en 1942 el primer protocolo o guía sobre peritajes de grupos sanguíneos en materia de paternidad que permaneció en vigor hasta 1970, año en el que se aprobó un nuevo protocolo por el Ministerio Federal de la Salud. Un apéndice a este protocolo sobre evaluación bioestadística de los resultados fue añadido en 1972 (1). La actual guía alemana en materia de paternidad data de 1977.

Muchos países europeos (Suecia, Dinamarca, Inglaterra y Estados Unidos (Reunión ABA-AMA de 1976)) siguiendo el ejemplo alemán han aprobado y publicado guías de investigación biológica de la paternidad (2), al igual que Portugal (Reunión de Coimbra de Febrero de 1987).

En España, en Junio de 1986, se redactó en Santiago de Compostela el primer protocolo sobre investigación biológica de la paternidad que fue aprobado en Octubre de 1987 en Zaragoza. Los firmantes de este protocolo se encuentran integrados en la Sociedad Internacional de Hemogenética Forense, y en los próximos meses constituirán, dentro de esta Sociedad, un grupo de trabajo (Spanish Speaking Working Group).

El protocolo aprobado es como sigue:

1.- Los marcadores genéticos que pueden ser utilizados en la investigación biológica de la paternidad son:

a) Antígenos eritrocitarios: sistemas ABO, Rh, MNSs, Kell, Duffy, Kidd, Lutheran, P, Dombrock y Xg.

b) Antígenos HLA

c) Enzimas eritrocitarios: Fosfoglucomutasa-locus 1, Fosfatasa ácida, Transaminasa-glutámico-pirúvica, Esterasa D, Adenilato kinasa, Adenosin desaminasa, 6-Fosfogluconato deshidrogenasa, Glioxalasa, Galactosa-1-P-uridil transferasa, Uridilmonofosfokinasa, Fosfoglicolato fosfatasa, Delta-Aminolevulinato dehidrasa.

d) Enzimas leucocitarios: Peptidasa A, Enzima málico-mitocondrial, Glucosa-6-P-dehidrogenasa, Alfa-Fucosidasa, Fosfoglucomutasa-locus 3, Citidín desaminasa, Hexokinasa-III.

e) Proteínas y enzimas séricos: Haptoglobinas, Proteínas Gc, Alfa-1-Antitripsina, Transferrina, Complemento (C3 y Bf), Lipoproteínas, Plasminógeno, Complemento C5, Pseudocolinesterasa, Transcobalamina, Ceruloplasmina, Amilasa sérica, Orosomucoide, Inmunoglobulinas.

La incorporación de nuevos grupos de sistemas o la anulación de algunos de los incluidos debe adoptarse en las reuniones de este grupo de trabajo

2.- Para que un Centro pueda estar acreditado para la realización de investigaciones de paternidad deberá poseer:

a. Personal especializado y acreditado en este campo.

b. Deberá alcanzar al menos un 99% de probabilidad de exclusión a priori con los sistemas de que disponga.

c. Deberá utilizar al menos tres grupos de marcadores distintos (antígenos eritrocitarios, HLA y enzimas eritrocitarios por ejemplo).

d. Al menos en dos sistemas deberá utilizar tres tipos distintos de marcadores (por ejemplo ABO, Rh y Duffy).

3.- Se tomarán las precauciones necesarias para una adecuada identificación de las partes involucradas, y para el etiquetado, envío y recepción de las muestras, manteniendo las garantías procesales ("Chain of custody").

4.- Se tomarán las precauciones oportunas respecto a la edad en los marcadores que puedan sufrir modificaciones por este hecho.

5.- En caso de exclusiones aisladas (para un único marcador) por la Primera regla de Lándsteiner, o de únicamente dos exclusiones por la Segunda regla, será calculada la probabilidad de paternidad sin tener en cuenta los marcadores que han producido la exclusión, y adoptar, entonces, una conclusión global.

6.- En el supuesto de que el número de exclusiones sea mayor que el antes indicado, la exclusión se considerará como probada.

7.- En los supuestos señalados en el art. 5 y cuando no hay exclusión será obligatoria la evaluación bioestadística de los resultados.

8.- Para la evaluación bioestadística de los resultados se utilizará la Logic I o Logic II (Probability of Inclusion in Paternity Testing. The American Association of Blood Banks. Arlington, Virginia, 1982), o cualquier otro sistema de cálculo, incluyendo métodos computarizados basados en los mismos principios.

9.- Las frecuencias génicas a utilizar serán establecidas por este grupo de trabajo para cada área geográfica en nuestro país. La probabilidad a priori establecida será de 0,5.

10.- La probabilidad de paternidad se expresará en términos de valor W ( $X/X+Y$ ), como Índice de Paternidad de Martin ( $X/Y$ ) o como valor EM ( $\log Y/X+10$ ), y será expresado añadiendo siempre a continuación el correspondiente predicado verbal de Hummel.

11.- Los informes incluirá los tipos de técnicas empleadas, el fenotipo y genotipo de los marcadores utilizados, los resultados estadísticos y las conclusiones alcanzadas y se comunicarán a todas las partes implicadas.

12.- En caso de situaciones particulares de difícil solución, como alelos raros, cálculos estadísticos complejos, exclusiones aisladas por un único marcador, etc., este grupo de trabajo analizará el caso concreto, propondrá soluciones y elaborará unas conclusiones

finales.

Los objetivos básicos de este grupo de trabajo, quedaron reflejados en el Acta de Constitución de la Sociedad, que a continuación se expone:

#### ACTA DE CONSTITUCION DEL GRUPO ESPAÑOL DE LA SOCIEDAD DE HEMOGENETICA FORENSE:

Con fecha 15 de Julio de 1986 se constituye en Santiago de Compostela el Grupo de Hemogenética Forense Español. Son objetivos prioritarios de este Grupo:

1. Agrupar a las personas que estén trabajando en el campo de la Hemogenética Forense.
2. Unificar criterios y elaborar unas directrices para la investigación biológica de la paternidad.
3. Unificar criterios y métodos para el análisis de vestigios biológicos de interés criminal.
4. Coordinar la investigación de los diferentes centros y facilitar la formación de especialistas en este campo.

Son requisitos fundamentales para pertenecer a este Grupo de trabajo:

1. Estar trabajando en el campo de la Hemogenética Forense, de forma aplicada o en investigación.
2. Poseer una formación acreditada dentro de este campo.
3. Ser miembro de la Sociedad de Hemogenética Forense (Society for Forensic Haemogenetics).

Como se indica en el Acta de Constitución los objetivos de este Grupo Español de la Sociedad de Hemogenética Forense son además de la elaboración de protocolos de investigación biológica de la paternidad y de análisis de vestigios biológicos, el coordinar la investigación y facilitar la formación de especialistas en este campo.

En este último aspecto todavía queda mucho camino por recorrer, si nos comparamos a la mayoría de los países europeos donde, como en Alemania y los países escandinavos, para poder peritar en este tipo de pruebas se exige una formación previa de tres a cinco años (3). De todos modos se ha puesto la primera piedra para la consecución de estos logros, a la espera de la anunciada reforma de las vías de formación y especialización de

los peritos y de la creación de los Institutos de Medicina Legal.

Al igual que en la formación de los peritos, en cuanto a la homologación de los Centros no existe en nuestro país ninguna norma legal que impida la realización de la prueba a Centros no especializados. Ello ha contribuido a que algunos de estos Centros (analistas privados, servicios de Hematología, etc.) estén empezando a sembrar confusión en la prueba al trabajar con probabilidades de exclusión a priori bajas y al actuar sin criterios definidos. Para evitar todo esto, en el protocolo antes citado se ha incluido (art. 2) la obligación de que todo centro que pretenda realizar este tipo de prueba deba poseer:

1. Personal especializado y acreditado en este campo.

2. Deberá alcanzar al menos un 99% de probabilidad de exclusión a priori con los sistemas de que disponga.

3. Deberá utilizar al menos tres grupos de marcadores distintos (antígenos eritrocitarios, HLA y enzimas eritrocitarios por ejemplo).

4. Al menos en dos sistemas deberá utilizar tres tipos distintos de marcadores (por ejemplo ABO, Rh y Duffy).

Esperamos que, en breve plazo de tiempo, los tribunales contemplen estas situaciones y exijan el cumplimiento de los requisitos, única forma de lograr un nivel adecuado de eficacia.

En lo que se refiere a la investigación en materia de investigación biológica de la paternidad la mayor parte de los departamentos de Medicina Legal, están estudiando las frecuencias génicas de los marcadores que utilizan en la IBP en el área poblacional en la que pretenden actuar. En este sentido el enfoque médico-legal de la investigación es bastante diferente del enfoque antropológico. En el primer caso, es fundamental el análisis de la población global al azar, ya que se pretende calcular la probabilidad que posee un individuo de ser el padre con la probabilidad que tiene de serlo, un hombre al azar de la población en cuestión. Desde el punto de vista genético-poblacional interesa más el origen del individuo para comparar poblaciones y

estudiar parámetros genético-poblacionales como la deriva genética, la migración, etc. Lo complementario de ambas orientaciones hace que la investigación de unos y otros deba de ser coordinada, lo que se traducirá en un mejor rendimiento y un análisis mucho más completo de una población determinada.

En la actualidad la población gallega está aceptablemente estudiada (4) (excepto para los HLA) y se encuentran realizando un esfuerzo considerable con un número bastante elevado ya de marcadores genético-moleculares analizados, la población catalana, la andaluza, la castellana (y madrileña), la vasca y la aragonesa.

Existe por parte de los departamentos de Medicina Legal de Barcelona, Santiago, Madrid, Zaragoza, Cadiz y Granada y por algunos departamentos de Antropología un propósito definido de realizar un mapa absoluto de todo el territorio, única forma de lograr unos resultados estadísticos con un rigor absoluto, si bien es poco probable que el uso de nuevas frecuencias génicas globales o medias españolas modifique, salvo en casos límites, el valor del predicado verbal en un caso concreto.

Además de la necesidad de un mapa global de las frecuencias génicas de cada marcador en todas las áreas geográficas, la investigación en materia de paternidad se centra en el análisis de nuevos marcadores o en el subtipado de los ya existentes con nuevas técnicas. En este sentido el desarrollo de los gradientes de pH inmovilizados (IPG) (5) y sobre todo del electroenfoque híbrido (HIEF) (6) está produciendo una revolución total en el estudio de los polimorfismos, tan grande como la que supuso en su día la aparición de la focalización isoeléctrica que prácticamente dobló el poder discriminativo de los marcadores electroforéticos que hasta entonces se utilizaban (7). Además, muchos polimorfismos enzimáticos sobre todo leucocitarios, están siendo descubiertos con la aplicación de estos nuevos métodos, al igual que otros polimorfismos genéticos en saliva, orina y pelo.

El campo de investigación más prometedor, es el análisis del polimorfismo del DNA, una realidad ya en Criminalística (8,9), pero cuya aplicación en la investigación biológica de la paternidad es todavía limitada. En una reciente circular de la Sociedad de Hemogenética Forense (1/88), un comité de expertos considera que en el momento actual el uso de polimorfismos DNA para la investigación biológica de la paternidad es prematuro, e indica la extrema urgencia

que existe en definir condiciones en el campo del análisis de polimorfismos DNA. Estas condiciones incluyen:

a) Definición de la sonda (estabilidad, pureza, etc.)

b) Definición de las bases genéticas de la sonda (incluyendo estudios familiares extensos)

c) Investigación de las frecuencias génicas y las tasas de mutación para cada alelo

Si bien está claro que el futuro de la prueba es el análisis del polimorfismo del DNA, el campo de investigación que previamente hay que cubrir es enorme, y no puede ser realizado olvidando la investigación en otros terrenos con una aplicación práctica directa.

Ante el escaso potencial económico, técnico y humano que en este país poseemos en Biología Forense, está claro que sólo una coordinación de la investigación y una cooperación abierta entre todos los que trabajamos en esta materia, puede evitar que la distancia que nos separa de los países y grupos de investigación punteros sea cada vez mayor.

## BIBLIOGRAFIA

=====

1. "Richtlinien für die erstattung von blutgruppengutachten". BdGesundhB1 92, 1972.
2. Joint AMA-ADA Guidelines. Family law quarterly 10: 247 (1976).
3. Maehly, A.C. Welcome address. Second Scandinavian Conference on Forensic Science. Linköping, Augusti (1983).
4. Carracedo, A., L. Concheiro, M.S. Rodriguez-Calvo, M.D. Montiel. Plasma Proteins and red cell enzymes groups in Galicia (North West Spain). Z. Rechtsmed. 98: 133-140 (1987).
5. Cossu, G., M. Manca, P.G. Righetti, E. Gianazza, V. Bandin, H. Wajeman, A. Bianchi-Bosisio. Detection of neutral amino acid mutations by immobilized pH gradients: the case of the Tgamma variant in fetal hemoglobin sardinia. Electrophoresis 7: 213-216 (1986).
6. Altland, K., U. Rossmann. Hybrid isoelectric focusing in rehydrated immobilized pH gradients with added carrier ampholytes: Demonstration of human globins. Electrophoresis 6:314-325 (1985).
7. Righetti, P.G. Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. Elsevier biomedical press. Amsterdam, New York. (1983).
8. Jeffreys, A.J. Positive identification of an immigration test-case using human DNA "fingerprints". Nature 317: 818 (1985).
9. Gill, P., J.E. Lygo, S.J. Fouler, D.J. Werret. An evaluation of DNA fingerprinting for forensic purposes. Electrophoresis 8: 38-44 (1987).



## Capítulo 14

---

### VALORACION MÉDICO-LEGAL DE LA PATERNIDAD

---

Emili HUGUET, Angel CARRACEDO y Manel GENÉ

---

La valoración médico-legal es uno de los aspectos básicos de la investigación biológica de la paternidad. De poco servirá poseer un buen estudio del material genético y unos parámetros estadísticos perfectamente calculados si la interpretación de estos resultados no está a la altura de las técnicas empleadas.

Podríamos definir por tanto la valoración médico-legal como el procesamiento e interpretación de todos los resultados obtenidos, con el fin de hacer fácilmente comprensible la realidad biológica objetivada.

A la hora de valorar una paternidad desde el punto de vista biológico y una vez hechos todos los estudios genéticos y estadísticos es obvio que únicamente pueden darse dos situaciones; una de compatibilidad en la que existe una perfecta semi-identidad entre el hijo cuestionado y el supuesto padre biológico y otra en la que esa semi-identidad no existe. En principio estas situaciones podrían equipararse a las de paternidad y no paternidad pero en la práctica el problema no es tan sencillo ya que debemos estar en condiciones de rebatir preguntas que cuestionen ambas situaciones. Así la pregunta ¿qué garantía existe de que un individuo no excluido sea realmente el padre? nos cuestiona las situaciones que de entrada parecen afirmar la paternidad. La pregunta: en caso de exclusión ¿qué garantía tendríamos de que ésta no sea producto de un error técnico, un error biológico o una mutación?, nos cuestiona las situaciones en las que la paternidad parece imposible en principio.

La primera pregunta es bastante compleja y para rebatirla debemos recordar los dos parámetros

matemático-estadísticos fundamentales en que se apoya la determinación de la paternidad: la probabilidad de exclusión a priori y la probabilidad de paternidad.

La probabilidad de exclusión a priori es el parámetro que nos garantiza la exclusión del número de falsos padres que su valor indica (referido a 1 o a 100 según el caso). Cuanto más alto sea éste menor es la probabilidad de dejar un falso padre sin excluir y por tanto de que el individuo no excluido sea realmente el padre. Como es lógico por muy alto que sea el valor de probabilidad de exclusión a priori no es suficiente la no exclusión de un individuo para que podamos considerarlo padre biológico.

Debemos además recurrir al segundo parámetro: la probabilidad de paternidad que debe calcularse siempre que no se logre excluir al supuesto padre. El valor obtenido expresado generalmente en tanto por ciento nos indica la probabilidad de que el hecho de la paternidad haya sucedido realmente. El mayor inconveniente que tiene es que al no tener en cuenta las relaciones sexuales de la madre (frecuencia y número de individuos), dato por otra parte difícil de obtener, incluye a toda la población en el cálculo con lo que en la práctica es una probabilidad mínima de paternidad por parte del supuesto padre estudiado siendo la real más alta. La máxima ventaja es que al no incluir más que datos objetivos es una probabilidad muy fiable.

Desde el punto de vista médico-legal en el caso de no poderse excluir un individuo la valoración debe basarse en los predicados de HUMMEL (1971):

W $\geq$ 99.73	Paternidad prácticamente probada.
99.00	altamente probable.
95.00	muy probable.
90.00	probable.

Es por tanto deseable llegar siempre al grado de certeza racional en la determinación positiva de la paternidad que está establecido en el valor de probabilidad de paternidad igual o superior a 99.73%, ya que la tendencia actual tiende a valorar cada vez menos los valores inferiores al 99%

La contestación a la primera pregunta se apoya por tanto en los conceptos definidos en capítulos anteriores y recordados en los párrafos que anteceden. ¿Qué garantía tenemos de que un individuo no excluido

sea el padre del hijo cuestionado?. En primer lugar conocemos la probabilidad de excluirlo a priori si no es el padre. Si este valor es alto y no podemos excluirlo la probabilidad de que el individuo no sea el padre será muy pequeña. Pero ello no es suficiente para asegurar de una forma racional la paternidad. Entonces es cuando calculamos la hipótesis contraria, es decir la probabilidad de que el individuo sea el padre y únicamente si esta probabilidad es muy alta (superior a 99.73%) calificamos la paternidad de prácticamente probada, probabilidad que sería muy pequeña si el individuo fuera un falso padre, que no hubiera podido excluirse.

La segunda pregunta ¿en caso de exclusión, qué garantía tendríamos que no sea producto de un error técnico, un error biológico o una mutación?, encierra las tres causas de error más importantes en la valoración de la exclusión: los errores técnicos, los errores biológicos y las mutaciones.

En teoría los errores de tipo técnico que se pueden cometer son infinitos. No existe actividad humana infalible y durante todo el proceso técnico estos amenazan de forma continuada y persistente. Los errores además van casi siempre en favor de la incompatibilidad y por tanto la tendencia es que lleven a considerar como padre imposible a un individuo que sea en realidad el padre biológico. La falta de identificación de las personas, la confusión de muestras, rotulación incorrecta, técnicas deficientes con lectura e interpretación incorrecta de los resultados, errores de cálculo, errores de transcripción, etc. nos dan una idea de lo delicado del proceso y de la importancia de utilizar una sistematización técnica que procure obviar de una forma pasiva la mayor parte de los mismos.

No sucede lo mismo con lo que llamaremos errores biológicos (no porque sean errores en sí sino por ser biológica su causa y no técnica) que aunque se presentan con una frecuencia baja, si aparecen, su detección es difícil. Los errores biológicos más comunes son los producidos por los genes silentes, es decir genes que están pero que no se pueden evidenciar de una forma fácil. En ocasiones resulta imposible su detección sin estudios familiares complejos. Aunque poco frecuentes prácticamente ningún sistema se libra de su presencia y si aparecen provocan situaciones de aparente incompatibilidad. Es por esto que a la hora de valorar las exclusiones existen dos reglas fundamentales que determinan asimismo dos tipos de exclusión las directas o de primer orden y las indirectas o de segundo orden.

Las exclusiones directas o de primer orden no se ven afectadas por la presencia de genes silentes, ya que para obtenerlas precisamos fenotipos heterózigóticos en los que no caben alelos silentes. Carecen por tanto de otra causa de error que no sea la mutación. Debén valorarse con mucha cautela las incompatibilidades que se apoyen en exclusiones indirectas o de segundo orden ya que estas pueden asentar sobre fenotipos homocigóticos en los que sí caben alelos silentes, aparentando una falsa situación de incompatibilidad.

La posibilidad de mutación es realmente excepcional. Una mutación es prácticamente indetectable y consiste en una modificación de una parte del genoma que puede obedecer a distintas causas. Su aparición conduciría a una aparente situación de exclusión, incluso de tipo directo por lo que ante una exclusión puntual sólo cabe la conducta prudente en su valoración, calculando la probabilidad de paternidad, prescindiendo del sistema incompatible.

Si la probabilidad es muy baja la exclusión puede valorarse, pero si la probabilidad de paternidad es alta lo más lógico es de que se trate de un error técnico o biológico. Por tanto la respuesta a la segunda pregunta es fácil: la garantía ante una exclusión es muy alta si el procedimiento técnico tiene en cuenta las posibles causas de error y las detecta con facilidad o por el contrario será muy baja si no se tiene en cuenta todo lo expuesto anteriormente.

BIBLIOGRAFIA

=====

- 1.- BRYANT N.J.  
Disputed paternity. The value and application of  
blood test  
New York (Decker B.C.) 1980
- 2.- BRINKMAN B., HENNINGSEN K.  
Advances in forensic haemogenetics 1  
Berlin (Springer Verlag) 1986
- 3.- HUMMEL K., GERCHOW J.  
Biomathematischer beweis der vaterschaft  
Berlin (Springer Verlag) 1981
- 4.- POLESKY H.F.  
Paternity testing  
Chicago (Amer. Soc. of Clin. Patol.) 1979
- 5.- SILVER H.  
Probability of inclusion in paternity testing  
Arlington. Virginia (AABB) 1982

## Capítulo 15

-----

### EL INFORME DE PATERNIDAD

=====

Dr. Manuel RODRÍGUEZ PAZOS

-----

#### Introducción

-----

Todo proceso en el que se cuestiona una paternidad biológica y se lleva el caso hasta el final, debe tener un desenlace. Afortunadamente la fiabilidad de las técnicas actuales (desde hace unos diez años) permite alcanzar unos resultados brillantes en la mayoría de los casos, tanto si la paternidad es positiva como si no lo es. Desde un punto de vista práctico existen tres tipos de situaciones totalmente diferentes en cuanto al desenlace de la prueba. En las tres situaciones, es necesaria la concurrencia de la madre, el hijo cuestionado y el supuesto padre, en el caso más simple. Hasta ahí no hay diferencia. Ésta reside en el último eslabón del proceso ya que al tratarse de una información confidencial, los interesados pueden mantenerla confidencial o pueden hacerla pública. La tercera situación sería la investigación que se realiza por orden judicial en la que los interesados el único papel que juegan en cuanto a la información es someterse o no al mandamiento judicial que les requiera para la práctica de la prueba ya que ésta será pública desde el primer momento, al ser una parte de un proceso judicial más complejo. Desde un punto de vista formal el derecho a la intimidad está protegido en nuestro ordenamiento jurídico, por lo que la citada información debe considerarse incluida para quienes la manejan dentro del secreto profesional. El vehículo mediante el cual se comunica a los interesados el resultado de la información es el informe de paternidad. El camino que seguirá el informe en caso de que los interesados decidan no publicarlo se nos escapa (pueden guardarlo o destruirlo según les convenga). Si por el contrario deciden legitimarlo de algún modo, el destino del informe suele ser alguna dependencia de la Administración de Justicia, generalmente un Juzgado de Primera Instancia o de Familia, siendo entonces el camino parecido al de los casos en que el juez solicita la prueba.

Todo lo expuesto anteriormente nos interesa mucho a la hora de precisar la estructura del informe. En principio parece muy fácil escribir un papel en el que se diga que A es el padre biológico de B, o por el contrario que A no tiene ningún vínculo biológico con B.

La realidad es muy diferente ya que a priori nunca puede saberse que es lo que decidirán los interesados al respecto y por tanto el informe deberá ser independiente de dichos condicionantes. Aunque exista el riesgo de que nada más recogerlo, el destino sea la papelera, el informe debe reunir todos los requisitos formales para que llegado el caso pueda ser presentado ante un tribunal de justicia como prueba biológica de paternidad o de no paternidad.

#### Estructura del informe

---

Podríamos definir el informe de paternidad como el documento que recoge el resultado de un estudio genético familiar para determinar o negar la paternidad biológica de un varón sobre el hijo que se le imputa o cuestiona.

Deben quedar por tanto debidamente relacionadas en el mismo las personas que hayan sido sometidas a estudio, con expresa constancia del mecanismo utilizado para su identificación (fotografía del D.N.I. o del pasaporte, huellas digitales o palmares, etc.). Este apartado es de suma importancia ya que la no identificación de un presunto padre puede invalidar por completo la prueba. La presentación de otro individuo no se puede deducir de los resultados que se obtengan. La sustitución de la madre se advertiría fácilmente al no poderse objetivar el vínculo biológico con el niño en los casos en que la maternidad no se discuta que son la inmensa mayoría, al igual que sucedería si se sustituyera el niño. En este último caso hay que prever la posibilidad de que existan varios hijos y la madre pueda traer otro distinto del que se cuestiona. Para obviar toda esta problemática si el presunto padre conoce al niño cuestionado el mejor procedimiento es realizar la prueba de forma conjunta. De este modo la madre identificará al supuesto padre y éste identificará a la madre y al niño. Como son los interesados no podrán alegar falta de identificación ya que se reconocerán mutuamente en el momento de la prueba. Otra dificultad para realizar las cosas de este modo es la mala relación personal entre la madre y el supuesto padre, situación que se acentúa si los hijos son adultos, en cuyo caso es preferible realizar la prueba por separado para evitar situaciones violentas

para todos, incluido el personal que practica la prueba.

Deben asimismo relacionarse los marcadores genéticos estudiados, con los resultados fenotípicos o genotípicos obtenidos para cada una de las personas estudiadas. Esta relación tiene por objeto principalmente el que los resultados del estudio puedan ser contrastados con otros estudios que existan o se puedan realizar en el futuro. Otro motivo para ello es el de que la situación biológica pueda ser analizada posteriormente por cualquier persona experta en la materia y pueda emitir el juicio que tanto la investigación como los resultados le merezcan, dicho de otra manera que los resultados sean revisables a modo de auditoría, por lo que la existencia de esta relación da transparencia al informe.

La parte más importante del informe es la que corresponde a las conclusiones médico-legales que puedan extraerse de los resultados obtenidos. Lógicamente y como ya exponíamos al principio el resultado sólo puede ser positivo o negativo, el individuo desde un punto de vista real o es el padre o no lo es. Hay que tener en cuenta que el informe va dirigido a personal no médico y debe ser por tanto muy claro y conciso en sus conclusiones. Lo ideal es que haya pocas y sean fácilmente inteligibles. Para no incurrir en repeticiones (en el capítulo de valoración médico-legal se trata a fondo los problemas que plantean tanto las situaciones de exclusión como las de afirmación), podemos decir que de una forma esquemática, en los casos normales, pueden extraerse siempre dos conclusiones: la que surge del análisis de la información obtenida de la madre y el hijo (si resulta la maternidad compatible): Si restamos al hijo el material que comparte con su madre, el material que nos quede procede forzosamente de su padre biológico. (Si no pudieramos restar nada significaría que la mujer que estamos estudiando no es la madre del niño y aquí se acabaría el informe). La segunda conclusión estriba en buscar el material genético restante tras la operación anterior en el supuesto padre: esto nos llevará a una situación de incompatibilidad o no paternidad o de compatibilidad o paternidad con un grado de demostración que nos vendrá dado por los parámetros estadísticos, de los cuales quizá el más fácilmente comprensible es el poblacional. El índice poblacional nos indica el número de varones que hay que buscar en la población para encontrar al menos uno que no pueda excluirse como padre del niño. El parámetro estadístico más universalmente aceptado es el de la probabilidad de paternidad, que nunca debe faltar en un informe de paternidad pues es el parámetro más válido. Si su valor es superior a 99.73% la paternidad se considera probada desde un punto de vista biológico.



Estos dos últimos extremos son los que deben ser tratados con más claridad, a fin de que la prueba sea eficaz. Así debe quedar claro cualquier caso en que la paternidad no sea posible. Aquí no hay mucho problema puesto que es el sentido en el que la prueba tiene más aceptación pues la exclusión se admite desde un punto de vista jurídico desde hace muchos años (más de cincuenta). Si el resultado es una paternidad positiva la cosa es más difícil que sea aceptada, y sin embargo se trata de la una de las pruebas demostrativas más fiables de cuantas se pueden llevar ante un tribunal. El resultado positivo de paternidad debidamente documentado (no la simple situación de no exclusión), es una situación difícil de alcanzar ya que el número de marcadores que se precisan es grande y las fórmulas de cálculo lo suficientemente exigentes para que al llegar a una cifra del 99.73% nos podamos sentir seguros. El antiguo argumento de que la paternidad no se puede asegurar de una forma absoluta porque siempre puede existir un individuo igual al que estamos examinando tiene cada vez menor validez. Prácticamente la única posibilidad de que ello pueda ser cierto es que el supuesto padre tenga un hermano gemelo univitelino, lo que matemáticamente de entrada ya es muy poco probable. El pequeñísimo margen de error que nos pueda quedar hasta llegar al 100% es infinitamente menor al que pueden sufrir otros tipos de pruebas de tipo pericial, documental, testifical, etc. Normalmente los errores que se producen en cualquier tipo de actividad humana son infinitamente superiores. Así si en una investigación biológica de la paternidad se obtiene una probabilidad de paternidad del 99.99%, lo cual es bastante frecuente (en laboratorios competentes la mayoría), ello significa que de cada 10.000 sentencias que se emitieran siguiendo los dictados de la prueba, como máximo se podría producir un error, eficacia que ya quisieran para sí todos los tipos de pruebas que se practican.

BIBLIOGRAFIA

=====

- 1.- CODIGO CIVIL  
Madrid (Tecnos) 1986 5ª ed.
  
- 2.- CONSTITUCION ESPAÑOLA  
Madrid (Tecnos) 1986 3ª ed.
  
- 3.- LEY DE ENJUICIAMIENTO CIVIL  
Madrid (Tecnos) 1986 4ª ed.
  
- 4.- GISBERT CALABUIG  
Medicina Legal y Toxicología  
Valencia (Saber) 1983 2ª ed.
  
- 5.- FRANCHINI A.  
Medicina legale in materia civile  
Napoli (Idelson) 1964
  
- 6.- SIMONIN C.  
Médecine Légale Judiciaire  
Paris (Maloine) 1967 3ª ed.

Publicacions del Seminari PERE MATA, de la Unitat d'Ensenyament i Recerca de Medicina Legal i Laboral i Toxicologia de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

1. DOMÈNECH, Edelmira, «*La Frenologia.*» *Análisis histórico de una doctrina psicológica organicista*, 1977, 216 pp.
2. CAMPS I SURROCA, Manuel; CAMPS I CLEMENTE, Manuel, *Santuaris lleidatans amb tradició mèdica*, 1981, 158 pp.
3. CALBET I CAMARASA, Josep M.<sup>a</sup>; CORBELLA I CORBELLA, Jacint: *Diccionari biogràfic de metges catalans*, primer volum A-E, 1981, 194 pp. (Coedició amb la «Fundació Salvador Vives i Casajuana», Barcelona.)
4. *Programa del III Congrés d'Història de la Medicina Catalana*, Lleida, 4-6 de juny de 1981, 32 pp. (Coedició amb el Col·legi Oficial de Metges de Lleida.)
5. *Actes del III Congrés d'Història de la Medicina Catalana*, Lleida, 1981, primer volum, 346 pp.
6. HUGUET RAMIA, Emilio, *Determinación del cadmio y plomo en las aguas de consumo*, 1981, 90 pp.
7. MARTÍ AMENGUAL, Gabriel, *El suicidio consumado en las Islas Baleares*, 1981, 156 pp.
8. CALBET I CAMARASA, Josep M.<sup>a</sup>; CORBELLA I CORBELLA, Jacint, *Diccionari biogràfic de metges catalans*, segon volum, F-G, 1982, 240 pp. (Coedició amb la «Fundació Salvador Vives i Casajuana», Barcelona.)
9. CAMPS I CLEMENTE, Manuel; CAMPS I SURROCA, Manuel, *Aspectes sanitaris de l'Arxiu de Sant Joan de Lleida*, 1983, 424 pp.
10. CALBET I CAMARASA, Josep M.<sup>a</sup>; CORBELLA I CORBELLA, Jacint, *Diccionari biogràfic de metges catalans*, tercer volum R-Z i Addenda, 1983, 348 pp. (Coedició amb la «Fundació Salvador Vives i Casajuana», Barcelona.)

11. CORBELLA I CORBELLA, Jacinto; CALBET I CAMARASA, José M.<sup>a</sup>, *El pensamiento sanitario y laboral de dos médicos anarquistas del siglo XIX*, 1984, 172 pp.
12. *Programa del I Congrés Català de Medicina del Treball*, 1984, 36 pp.
13. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. I, 1984, 322 pp.
14. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. II, 1984, 346 pp.
15. ARRO Y TRIAY, Francisco de Paula, *Estadística mèdica de la companyia de ferrocarriles de Tarragona a Barcelona y Francia*. (Reedició en facsímil de la edició de Barcelona de 1892), 1985, 162 pp. Coedició amb la Societat Catalana de Seguretat i Medicina del Treball i Ajuntament de Barcelona. Edició i estudi preliminar: J. Corbella.
16. CAMPS I SURROCA, Manuel; CAMPS I CLEMENTE, Manuel, *La pesta de meitats del segle XVII a Catalunya*, Lleida, 1985, 424 pp.
17. *Programa del IV Congrés d'Història de la Medicina Catalana*, Monestir de Poblet-Tarragona, 7-9 de juny de 1985, 36 pp.
18. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. III, 1985, 470 pp.
19. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. IV, 1985, 396 pp.
20. ROBERT YARZÁBAL, B., *Balance del siglo XIX. La Medicina*. Edición y estudio preliminar: J. M. Calbet y J. Corbella, 1985, 68 pp.
21. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. V, 1986, 412 pp.
22. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. VI, 1986, 382 pp.
23. VIDAL, Domingo, *Cirurgia forense* (1783). Edición y estudio preliminar: J. Corbella, 1987, XXIV + 96 pp.
24. MONTAÑA I BUCHACA, Daniel, *Aspectes sanitaris dels Arxius de les parròquies del terme i vila de Terrassa als segles XVI, XVII i XVII*, 1987, 188 pp.
25. DOMÈNECH, E.; CORBELLA, J.; PARELLADA, D. (eds.), *Bases històriques de la psiquiatria catalana moderna*, 1987, 401 pp.
26. VALLRIBERA I PUIG, Pere, *L'obra mèdica catalana de dos Cirurgians del 1700. Anton DE BORJA i Carles PALLEJA*, 1987, 130 pp.

27. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. VII. 1987.
28. GIMBERNAT, *Revista Catalana d'Història de la Medicina i de la Ciència*, vol. VIII. 1987.
29. FRAGOSO, Juan: «*Tratado de las Declaraciones que han de hacer los cirujanos acerca de muchas enfermedades y muchas maneras de muertes que suceden*». Edición y estudio preliminar: J. Corbella. 1988, 71pp.

