



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

## Estudio de los VNTR's: YNZ22, 3'APO-B y D1S80 mediante la técnica PCR

Evaluación de su rendimiento médico-legal  
en la población catalana

Cristina Sánchez García



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

**ESTUDIO DE LOS VNTR's: YNZ22, 3'APO-B Y DIS80 MEDIANTE LA  
TECNICA PCR. EVALUACION DE SU RENDIMIENTO MEDICO-LEGAL EN  
LA POBLACION CATALANA.**

*Tesis presentada por CRISTINA SANCHEZ GARCIA para optar al Grado de Doctor  
en Biología. El trabajo se ha realizado bajo la dirección del Dr. EMILI HUGUET I  
RAMIA y el Dr. MANUEL GENE I BADIA*

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA Y LEGISLACION SANITARIA**

**UNIDAD DE MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGIA**

**Barcelona, septiembre de 1994**

**ESTUDIO DE LOS VNTR's: YNZ22, 3'APO-B Y DIS80 MEDIANTE LA  
TECNICA PCR. EVALUACION DE SU RENDIMIENTO MEDICO-LEGAL EN  
LA POBLACION CATALANA.**

*Tesis presentada por CRISTINA SANCHEZ GARCIA para optar al Grado de Doctor  
en Biología. El trabajo se ha realizado bajo la dirección del Dr. EMILI HUGUET I  
RAMIA y el Dr. MANUEL GENE I BADIA*

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA Y LEGISLACION SANITARIA**

**UNIDAD DE MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGIA**

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700674301



**Barcelona, septiembre de 1994**

Agradecimientos:

-Al Dr. Manel Gené i Badia por su dedicación, paciencia y constante estímulo desde mi llegada al Departamento. Por enseñarme a tener ilusión en un campo que era totalmente desconocido para mí como la Biología Forense. Y finalmente, por poder contar con su amistad.

-Al Dr. Emili Huguet i Ramia por su inestimable apoyo, predisposición y constantes enseñanzas.

-A la Dra. Jovita Mezquita i Pla por sus sabios consejos y por poner toda su experiencia en el campo de la Biología Molecular a mi disposición.

-Al Dr. Pascual Moreno i Suárez por haberme introducido en el estudio de la Genética Poblacional y dedicarme en numerosas ocasiones su valioso tiempo.

-Tampoco puedo olvidarme de mis compañeros y amigos que han estado a mi lado durante la elaboración de este trabajo de investigación: Dr. Jesús Gómez, Dr. Jordi Medallo, Dr. Ramón Reig, Dra. Mercedes Lezaún, Dra. Miriam Fuentes, Sra. Inmaculada Gómez de Aranda, Sra. Agustina Vela, Srta. Carmen Barrot, Sra. Dolores Pau y Sra. Montserrat Pau.

-Finalmente, a Gonzalo Bernardos por su infinita paciencia y comprensión. Su apoyo, consejos y estímulos han sido vitales en el desarrollo y finalización de esta tesis. Y por último, por compartir mi vida.

---

INDICE	pags.
1.INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	
2.1. Aspectos antropogenéticos	5
2.2. Estudio biológico de la paternidad	17
2.3. Cálculo matemático-estadístico de la paternidad	25
2.4. Criminalística	32
2.5. Aspectos técnicos de la PCR	44
2.6. Satélites: Principales características de los marcadores estudiados	55
3.MATERIAL Y METODOS	
3.1. Muestreo	72
3.2. Material	77
3.3. Métodos	
3.3.1. Recogida de muestras	85
3.3.2. Extracción de ADN	87
3.3.3. Comprobación de la extracción	106
3.3.4. Método de amplificación	110
3.3.5. Determinación de los distintos fenotipos	116
3.3.6. Prevención de la contaminación	127

4.RESULTADOS

4.1. D1S80	129
4.2. 3'APO-B	135
4.3. YNZ22	141

5.DISCUSION

5.1. Discusiones de tipo técnico	166
5.2. Comparación entre los polimorfismos de tamaño: minisatélites y microsata- télites, así como con polimorfismos de secuencia	180
5.3. Discusiones sobre el método estadístico	182
5.4. Consideraciones genético-poblacionales	184
5.5. Aspectos médico-legales	188

6.CONCLUSIONES 191

7.BIBLIOGRAFIA 195

## **1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

## INTRODUCCION

La Medicina Legal y Forense, como ciencia aplicada y pericial, ha ido empleando medios distintos para perseguir la verdad biológica, en función de la oferta técnica de cada momento histórico. La Hemogenética Forense, en sus principales vertientes de investigación biológica de la paternidad y de criminalística, ha ido incorporando todo tipo de progresos orientados a determinar la individualidad biológica. El origen de los parámetros objetivos para llevar a cabo estas determinaciones se remonta al año 1900 cuando Landsteiner describió el sistema ABO que representó el primer marcador genético polimórfico descrito. Posteriormente se fueron descubriendo otros sistemas proteicos que permitieron ir aumentando el grado de certeza de las determinaciones.

La propuesta científica que se plantea para la Medicina Legal a finales del siglo XX es la investigación de la variabilidad humana en los ácidos nucleicos de las células.

La importancia básica del polimorfismo del ADN radica en el hecho de estudiar la estructura genética individual y su heredabilidad, directamente del código genético de cada persona, y no como hasta ahora que se

hacía mediante marcadores que eran formas de expresión más o menos directa del mismo. En este sentido, los primeros métodos que gozaron de una aceptación generalizada fueron los denominados fragmentos de restricción de talla polimórfica (RFLPs), cuyo estudio, mediante técnica "Southern", representó una revolución a mediados de la década de los ochenta. La dificultad en la obtención de un método de estandarización que permitiera una reproductibilidad suficiente para los loci más polimórficos ensombrecieron este éxito inicial. El último avance de la Biología Molecular que se incorpora a la Hemogenética Forense es la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que es un método enzimático de amplificación de ADN "in vitro". En general, la importancia de esta técnica es que supera algunos de los inconvenientes atribuidos a los RFLPs y aunque la actual revolución biotecnológica sigue un ritmo tan rápido que hace difícil emitir pronósticos a medio y largo plazo, en estos momentos y durante la década de los noventa, la PCR será la alternativa más puntera de la Biología Molecular.

El presente estudio esta basado en la aplicación de esta tecnología para la amplificación de determinadas regiones del genoma humano, cuyo polimorfismo se basa en el número de veces que se repite en tandem una secuencia de aproximadamente 9 a 70 pb.(pares de bases), y se denominan minisatélites.

Los principales OBJETIVOS son poner en marcha y optimizar la metodología de tres polimorfismos para conocer su rendimiento en el Laboratorio de Medicina Legal de la Facultad de Medicina, en la Universidad de Barcelona. Los aspectos más importantes son:

1. ASPECTOS TECNICOS: Puesta en marcha y optimización de las técnicas de estudio de cada uno de los loci estudiados. Comparación con el estudio de otros polimorfismos de aplicación médico-legal: polimorfismos proteicos, polimorfismos de ADN con métodos de Southern RFLPs y PCR con Dot-Blot reverse. Evaluación del rendimiento de la técnica PCR en Medicina Legal.

2. GENETICA POBLACIONAL: Análisis del perfil genético de la población catalana. Obtención de las frecuencias génicas de los distintos sistemas examinados. Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg. Estudio comparativo con otras poblaciones estudiadas hasta la fecha.

3. INVESTIGACION BIOLOGICA DE LA PATERNIDAD: Evaluación del rendimiento de la aplicación de los sistemas estudiados en la investigación biológica de la paternidad en nuestra población. Cálculo de la probabilidad de exclusión "a priori", de la eficiencia bioestadística, índice de heterocigosidad y otros parámetros bioestadísticos relacionados.

4. CRIMINALISTICA: Rendimiento bioestadístico y metodológico de los polimorfismos en el diagnóstico individual a partir de vestigios de tipo biológico. Evaluación de la influencia ambiental en el tipaje de las muestras.

## **2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS**

## 2.1. ASPECTOS ANTROPOGENETICOS.

El proceso de la evolución ha sido posible por la gran variabilidad genética en las especies y los cambios que éstas experimentan en cuanto a las frecuencias alélicas de los distintos polimorfismos. Esta variación genética en una población se puede considerar un parámetro fundamental en los estudios evolutivos de las poblaciones.

La diversificación del material genético de los grupos de individuos viene determinado por un conjunto de procesos entre los que cuentan: mutación, migración, deriva al azar y selección natural. Las nuevas características introducidas por estos factores son responsables de nuestra diferenciación intergrupala, interespecífica e individual.

Durante la replicación del ADN se han dado numerosos cambios llamados mutaciones. Si esta replicación fuera siempre perfecta la vida no habría evolucionado y no se hubiese diversificado.

Los cambios dados en el material hereditario o mutaciones pueden ser:

-Puntuales o génicas: si la variación es a nivel de uno o pocos nucleótidos.

-Cromosómicas: si lo que varía es el número de los cromosomas o el orden de los genes.

Una mutación de tipo puntual se da si se altera un nucleótido, y la nueva secuencia pasa a la progenie. Esto es debido a una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos.

La evolución de las mutaciones ha hecho que se dividan en:

-Detrimentales: si restan adaptación al individuo que las presenta.

-Neutras: si no afectan de manera apreciable a sus portadores.

-Ventajosas: si confieren al individuo una mayor adaptación.

El azar y la selección natural son los principales responsables de que los nuevos alelos, producto de la mutación, sobrevivan, y por lo tanto, aumenten su frecuencia o que sean eliminados (Valls A. 1985).

El efecto contrapuesto de la mutación-selección puede mantener a un alelo de baja frecuencia en un grupo humano. Sin embargo este equilibrio puede quedar sesgado en ciertos alelos deletéreos recesivos si los individuos heterocigotos poseen una ligera superioridad adaptativa respecto a los homocigotos normales. Este sería el caso de la evolución de la fenilcetonúria (Valls A. 1985), enfermedad producida por un alelo autosómico recesivo que determina la inactividad total o parcial de la fenilalaninhidrolasa hepática y la infertilidad del individuo que la presenta. Se realizó un estudio con individuos irlandeses y escoceses observándose una frecuencia elevada del alelo responsable. Si se diera, en este caso, el equilibrio mutación-selección, la frecuencia de un alelo tan perjudicial debería ser menor. Este desequilibrio debería atribuirse a una tasa de mutación muy alta, a la deriva genética o bien a la consanguinidad, pero eliminadas estas posibilidades se consideró la hipótesis alternativa de que existían factores ambientales más perjudiciales para los individuos normales que para los portadores de la enfermedad. Entre estos factores destacaron la mayor supervivencia de estos individuos en época de hambre y malnutrición, ya que no incorporaban proteínas y por tanto fenilalanina, así como la mejor incorporación del calcio en huesos debido a una síntesis más elevada de vitamina D<sub>3</sub>.

Otro factor muy importante en la evolución es la migración. Los grupos humanos no suelen ser sedentarios más que a corto o medio plazo, debido a la gran capacidad de adaptación del hombre a distintos ambientes.

Las migraciones ponen en contacto grupos de individuos distintos, estableciendo entre ellos un flujo alélico bidireccional o introgresivo. Como resultado de ello aparecen nuevos grupos híbridos (mestizos) y se establecen gradientes de frecuencias alélicas. Estos gradientes crecientes o decrecientes se pueden observar gráficamente marcando las frecuencias de los alelos en un mapa, dando una imagen semejante a la de los mapas de isóbaras. Sería el caso del alelo "B" del sistema ABO de grupo sanguíneo que tiene unas frecuencias del 25-30% en Asia central y norte de la India disminuyendo hasta 15-20% en los estados más próximos a Europa de la CEI y hasta 5-10% en la Europa occidental (Dobzhansky T. 1978).

Estos gradientes de frecuencias son más pronunciados en los casos en los que existen barreras geográficas y ambientales que dificultan los viajes y por tanto la migración.

Para Hirszfeld y Hirszfeld ya era claro en 1918 que el sistema ABO mostraba diferencias étnicas y podía además aportar información en el estudio de la evolución. Sin embargo, éste es un pobre indicativo de las diferencias raciales. El sistema Rh, por ejemplo, es mucho más informativo y podemos destacar la elevada incidencia del alelo "cDe" en la población negra de Africa, siendo rara en cualquier otro lugar. Asimismo el alelo "cde" se encuentra de forma mucho más frecuente en los Caucasoides europeos que en cualquier otra población.

Pero es la suma de un gran número de marcadores lo que hace posible un análisis más completo de las diferencias interpoblacionales (Cavalli-Sforza LL. y Bodmer WF. 1971).

Estos estudios han sido posibles debido a la gran proporción de loci que son polimórficos, cosa que sorprendió a los propios genetistas ya que convertía en mucho más diferenciado a un individuo de otro.

Los polimorfismos observados se pueden clasificar en distintos tipos según su origen:

1. Los clásicos polimorfismos equilibrados en los que los heterocigotos se encuentran en ventaja constante, al menos en ciertos ambientes.

2. Alelos mutantes que han estado sujetos a una fuerte presión de selección en el pasado y no han desaparecido. El agente selectivo puede haber sido una enfermedad, cambios ambientales o culturales.

3. Alelos mutantes que prácticamente no han sufrido el efecto de la selección y que pueden acumularse bajo presión de mutación o simplemente deriva genética.

4. Alelos mutantes que tienen una ventaja selectiva absoluta y sustituyen a alelos antiguos durante el proceso evolutivo.

Generalmente, en las poblaciones de gran tamaño en las que no intervengan factores de mutación, selección o migración, y donde los apareamientos entre los individuos se realicen al azar, el valor de las frecuencias alélicas se mantendrán constantes a lo largo de las generaciones, es decir se mantendrán en el llamado equilibrio de Hardy-Weinberg (planteado por el matemático inglés GH. Hardy y el médico alemán W. Weinberg en 1908). Cuando es posible calcular las frecuencias génicas es importante comprobar si se mantiene este equilibrio, confrontando los valores de las frecuencias fenotípicas absolutas, observadas en la muestra estudiada, con los valores correspondientes a las frecuencias fenotípicas absolutas teóricas

esperadas. Para ello se aplica la prueba bioestadística de  $\chi^2$  tomando como valor límite de "p" 0.05, que es el nivel de significación estadístico utilizado más comúnmente (Altman DG. 1992) y por debajo del cual el resultado será estadísticamente significativo, por lo que no se aceptará la hipótesis de equilibrio de la población. En el caso de marcadores tan polimórficos como los minisatélites se presenta el problema de encontrar un elevado número de alelos con frecuencias muy bajas en algunos de ellos. Según W.G. Cochran el 80% de las frecuencias alélicas esperadas han de tener un valor superior a 5 y todas ellas han de ser mayores que 1 (Altman DG. 1992).

Diversas soluciones a este problema han sido propuestas por varios autores que trabajan con polimorfismos de este tipo:

-Rand S. propone la agrupación de los alelos de modo que, en este caso, se consideran como alelos, con una frecuencia resultado de la suma de las frecuencias de los alelos que componen el grupo.

Reagrupando los alelos de distinto modo no se observaron diferencias significativas en el test de la  $\chi^2$  (Rand S. y col. 1992).

-Budowle B. propone la agrupación de todos los genotipos que tengan un número de individuos observados menor que cuatro (Budowle B. y col. 1991).

-Chakraborty R. propone la agrupación de todos los genotipos en dos clases, homocigotos y heterocigotos (Chakraborty R. y col. 1991).

Al realizar un estudio poblacional es posible encontrarse un exceso o defecto de individuos heterocigotos, lo cual favorece la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (Cavalli-Sforza LL. y Bodmer WF. 1971). Las posibles causas del defecto de heterocigotos son:

-Población heterogénea, formada por subpoblaciones independientes.

-Endogamia.

-Selección contra los heterocigotos.

-Presencia de alelos silentes que hacen indistinguibles los heterocigotos de algunos homocigotos.

-Errores en la clasificación de los fenotipos.

-Tendencia a aparearse entre ellos los individuos de genotipo parecido.

Las posibles causas del exceso de heterocigotos son:

- Selección a favor de los heterocigotos.
- Errores en la clasificación de los genotipos.
- Tendencia al apareamiento entre individuos de distinto genotipo.

La verificación del equilibrio de Hardy-Weinberg nos permitirá predecir la estructura genotípica de la población a partir de las frecuencias alélicas.

Es interesante la comparación entre distintas poblaciones para cada uno de los satélites estudiados en este trabajo, ya que de este modo es posible observar la existencia o no de heterogeneidad interpoblacional.

La aplicación del test estadístico de la  $\chi^2$  en tablas de contingencia resulta de gran utilidad (Gremo A. 1988):

ALELOS	POBLACIONES		
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	
A <sub>1</sub>	O <sub>11</sub>	O <sub>12</sub>	O <sub>1.</sub>
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
A <sub>n</sub>	O <sub>n1</sub>	O <sub>n2</sub>	O <sub>n.</sub>
	O <sub>.1</sub>	O <sub>.2</sub>	N

siendo:

-  $O_{ij}$  el nº de individuos observados para el alelo "i" en la población "j".

-  $O_i$ , la suma de los individuos observados para el alelo "i" en las dos poblaciones.

-  $O_j$  el nº total de alelos para la población "j".

-  $N$  el nº total de alelos para las dos poblaciones.

El estadístico  $\chi^2$  se calcula según la fórmula:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^2 \sum_{i=1}^n \frac{(O_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

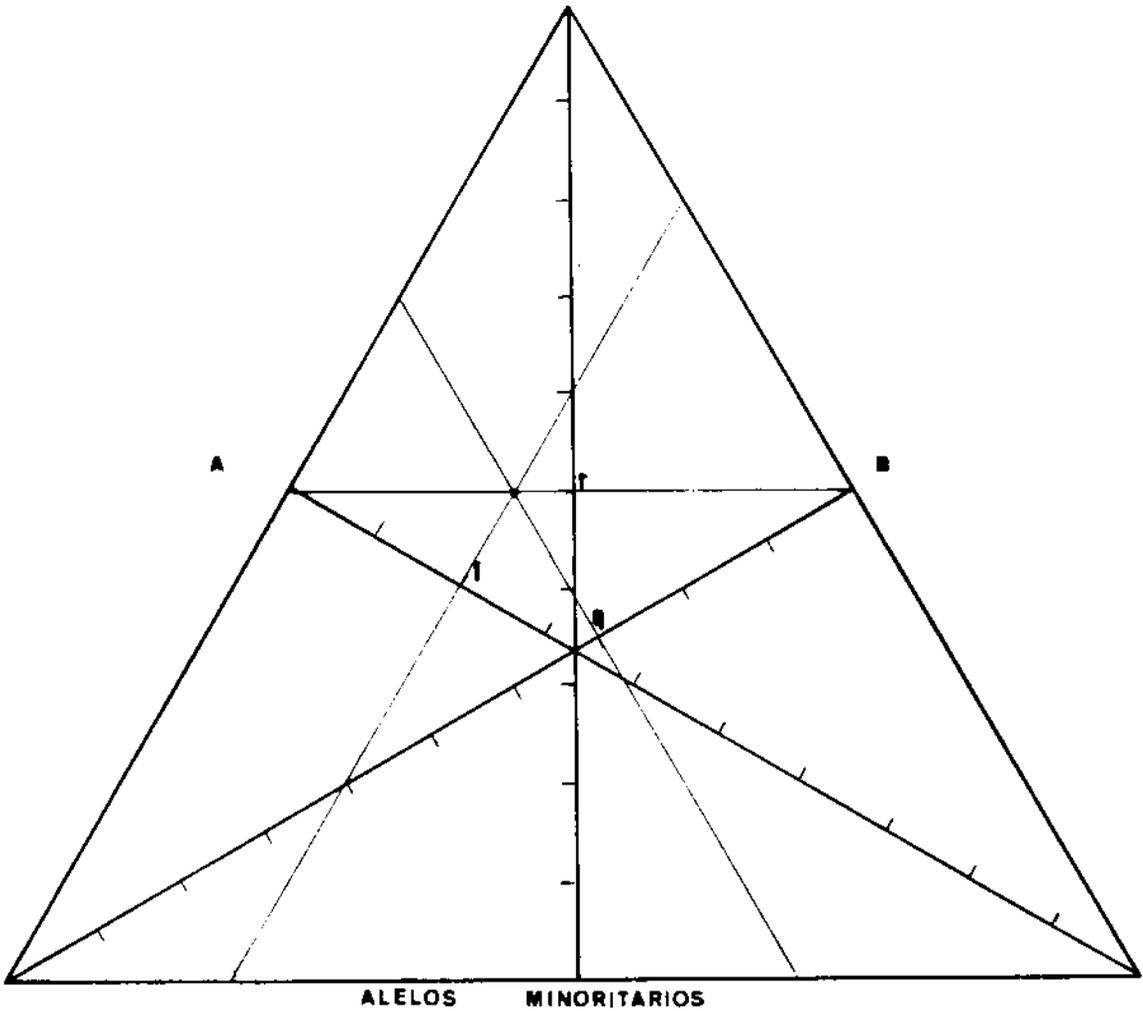
Dicho test sigue una distribución con  $\tau = (n-1)$  grados de libertad.

- Si,  $\chi^2 \leq \chi^2(\tau, \alpha)$ , se puede aceptar la hipótesis de similitud de poblaciones.

- Si,  $\chi^2 > \chi^2(\tau, \alpha)$ , se consideran poblaciones distintas con un riesgo de  $\alpha = 0.05$  considerado de modo sistemático.

La representación gráfica de la distribución alélica de un sistema con tres alelos, en distintas poblaciones, es posible realizarla mediante el llamado Triángulo de Streng. En el caso de algunos marcadores, como los minisatélites, debido al elevado polimorfismo, no es aplicable. Sin embargo, un modo de tener una visión generalizada de la similitud o de la diferencia entre poblaciones respecto a un marcador concreto, puede obtenerse utilizando los dos alelos mayoritarios y agrupando el resto.

Se trata de representar las distintas poblaciones a comparar dentro del triángulo en función de las frecuencias de cada uno de sus alelos. La distancia en la gráfica, de dos poblaciones, será directamente proporcional a la distancia genética.



Cada lado del triángulo representa un alelo, de modo que la ubicación de la población dentro del gráfico se obtiene trazando paralelas a los distintos lados y a la altura que corresponda a la frecuencia alélica. En el punto donde se cruzan los tres ejes se situará físicamente la población.

f= frecuencia del alelo A

q= frecuencia del alelo B

r= frecuencia del resto de los alelos

de modo que:  $f+q+r = 100$

## 2.2. ESTUDIO BIOLÓGICO DE LA PATERNIDAD

La determinación de la paternidad ha sido un problema difícil de resolver desde tiempos remotos, sin embargo, su origen científico podemos situarlo en 1866 cuando Mendel descubre los principios básicos de la herencia biológica sobre los que posteriormente se basaría la prueba genética. El posterior conocimiento de los marcadores genéticos polimórficos, proporcionó los elementos para llevar a cabo el examen de parentesco.

La utilidad de un marcador genético viene determinada por una serie de características que forzosamente debe poseer dicho marcador:

1.- Ha de seguir un patrón de herencia mendeliana simple. Los genes se encuentran en parejas de alelos de modo que cada progenitor contribuye con un miembro de cada pareja. El juego diploide de cromosomas es el resultado de la unión de un juego haploide de cada progenitor.

2.- El carácter hereditario ha de ser discontinuo, de modo que existan variantes alélicas para un mismo gen en la población, pudiéndose clasificar a los individuos en base a ello.

3.- La penetrancia y la expresividad son características que hay que considerar. La penetrancia es la capacidad de un gen para expresarse y la expresividad es la intensidad con la que se expresa.

4.- La influencia ambiental ha de ser nula, de modo que las diferencias individuales respecto al marcador a estudiar no puedan deberse a factores no genéticos.

5.- La expresión del gen ha de darse desde el momento del nacimiento o, en algunos casos, pasados unos días sin que varíe con la edad.

6.- Los genes estudiados han de poseer la frecuencia génica adecuada y hallarse en equilibrio en la población. Han de ser polimórficos, es decir, con dos o más alelos cuya frecuencia ha de ser superior a 0.01 en el caso del alelo más raro.

7.- La determinación técnica de las características genéticas heredadas ha de ser completamente objetiva para asegurar su fiabilidad.

A lo largo del siglo XX se han ido descubriendo los marcadores genéticos que han hecho posible, en base a su transmisión de padres a hijos, el estudio biológico de la paternidad.

El primer marcador polimórfico (el sistema ABO) fue descrito por Landsteiner en 1900 pero, el hecho de que existan cuatro genes: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B y O que se combinan dando 10 genotipos de los cuales sólo se observan 6 fenotipos, dificultó la determinación de la transmisión hereditaria de este sistema, y fue el matemático Bernstein en 1924 quien lo hizo (Race RR. y Sanger R. 1975). A partir de ese momento empiezan a descubrirse nuevos polimorfismos que podríamos agrupar en:

1-Sistemas antigénicos eritrocitarios: Son distintos antígenos que se encuentran en la membrana del eritrocito y que se detectan mediante técnicas inmunológicas, por aglutinación o agrupación de hematíes en presencia de anticuerpos específicos.

Entre estos marcadores se encuentran los siguientes sistemas: MN [Landsteiner y Levine, 1927] ligado al sistema Ss [Walsh y Montgomery, 1947], el sistema P [Levine y Landsteiner, 1927], el sistema Rh [Landsteiner y Wiener, 1940], sistema Kell [Coombs, Mourant y Race, 1946], Lutheran [Callender y Race, 1946], Duffy [Cutbush, Mollison y Parkin 1950], Kidd [Allen, Diamond y Niedzela, 1951].

2-Proteínas plasmáticas: que presentan variaciones puntuales a nivel de su estructura molecular primaria. Cada proteína esta formada por una secuencia distinta de

aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Existen 20 aminoácidos, lo que da lugar a un gran número de moléculas distintas y determina su especificidad, incluso en ocasiones su función biológica.

Las proteínas son los instrumentos mediante los que se expresa la información genética.

Los aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases y de ese modo proporcionan características eléctricas a las proteínas. Así pues, los aminoácidos con carga negativa son: Acido aspártico y glutámico, los de carga positiva: Arginina, Lisina e Histidina. La carga de una proteína es la suma de todas las cargas de los residuos laterales y el pH del medio influye en la carga de la molécula. Estas propiedades eléctricas son fundamentales para su estudio mediante técnicas de separación electroforética, focalización isoelectrica y electroforesis combinada con inmunofijación.

Las proteínas plasmáticas polimórficas más utilizadas en investigación de paternidad son: Componente específico de grupo [Hirschfeld, 1959], Transferrina [Smithies, 1957], Orosomucoide [Schmid, 1962],  $\alpha$ -1-Antitripsina [Laurell y Eriksson, 1963], Haptoglobina [Smithies y Wallser, 1955], Plasminógeno, Factor 3 del complemento, Amilasa [Ward JC. y col. 1971], etc...

3-Enzimas eritrocitarios y leucocitarios: Para la detección de estos enzimas se emplean técnicas electroforéticas similares a las de determinación de proteínas, aunque la forma de detección y revelado se fundamenta en poner de manifiesto la actividad enzimática sobre la superficie del recorrido electroforético tras la separación.

Entre los enzimas estudiados destacan, bien por su gran variabilidad o por su interés: Fosfatasa ácida [Hopkinson, 1963], Fosfoglucomutasa [Spencer, 1964], Transaminasa glutámico pirúvica [Chen y Giblett, 1971], Glioxalasa I, Adenilato kinasa [Fildes y Harris, 1966],  $\alpha$ -L-Fucosidasa [Turner BM. y col. 1974], Enzima málico [Cohen PTW. y Omenn GS. 1972],  $\alpha$ -Glucosidasa [Swallow DM. y col. 1975], etc...

4-El grupo de antígenos más polimórfico de los descritos hasta 1967, el sistema HLA (Human Leucocyte Antigen), fue descrito por Dausset y col. Este sistema esta formado por una serie de genes localizados en el cromosoma 6 que codifican los antígenos A, B, C, DR, DQ y DP. Estos genes se encuentran muy próximos entre sí, por lo que se heredan habitualmente como un bloque, con una tasa de recombinación muy baja (0.5 - 0.8%). La determinación de este sistema se realiza por técnicas de incubación de los linfocitos con una batería de anticuerpos de especificidad conocida.

Es un marcador muy polimórfico y por ello muy útil en estudios de paternidad ya que proporciona una probabilidad teórica de exclusión "a priori" superior al 95%

Fue a partir de los años 70 cuando la aplicación conjunta de estos marcadores genéticos a la investigación de la paternidad empezó a ofrecer garantías suficientes en cuanto al grado de certeza (con un valor  $W > 99.73\%$ ). Sin embargo, a finales de este siglo, los avances en el conocimiento de los ácidos nucleicos de las células empiezan a tener aplicaciones médico-legales y permiten investigar la variabilidad humana directamente a partir del código genético, en lugar de hacerlo mediante marcadores que son las formas de expresión más o menos directas de éste.

Wyman y White (1980), utilizando enzimas de restricción y sondas (fragmentos de ADN humano aislado aleatoriamente), para cortar el ADN genómico, observaron que en fragmentos determinados de ADN genómico existían variaciones de tamaño entre distintos individuos no emparentados entre sí. A partir de ese momento empezaron a describirse un considerable número de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism), o loci cuyo fundamento es la generación de fragmentos de restricción de longitud polimórfica. Desde el punto de vista técnico se trata de digerir el ADN con un enzima de restricción

que reconozca una secuencia específica de bases, separar los fragmentos de distintos tamaños por electroforesis submarina en geles de agarosa y localizar los fragmentos variables mediante hibridación con una sonda determinada, según el método de transferencia del ADN a una membrana de nylon (método "Southern"). Como resultado, después de una electroforesis, observamos fragmentos de distintos tamaños que tendrán un carácter alélico. Se ha demostrado que los RFLPs siguen las bases de la herencia mendeliana y se transmiten de forma estable a la descendencia. Todas estas propiedades hacen que estos polimorfismos sean muy adecuados para estudiar la paternidad.

En 1987 Kary Mullis perfeccionó y patentó una técnica que revolucionó la genética convirtiéndose en una herramienta biotecnológica de primer orden de aplicación en muchos campos de la investigación. Consiste en una técnica de amplificación enzimática "in vitro" de ADN, llamada PCR (Polymerase Chain Reaction), que permitirá llevar a cabo los estudios de gran número de polimorfismos de ADN de una forma más rápida, sencilla y con menos muestra, entre otras ventajas (Mullis KB. 1990).

Si se compara la eficacia de los marcadores de ADN con los polimorfismos tradicionalmente utilizados en el estudio de la paternidad, se puede observar que por sí

solos ya permiten obtener un grado de certeza suficiente. Sin embargo, en un estudio de paternidad no es aconsejable utilizar un único marcador genético, por muy polimórfico que sea, ya que puede conducir a error en algún caso en el que se dé una exclusión y dicho marcador no sea informativo. La consideración de distintos polimorfismos analizados independientemente dan, en conjunto, una mayor garantía de éxito al resultado final.

### 2.3. CALCULO MATEMATICO-ESTADISTICO DE LA PATERNIDAD

El estudio de la paternidad esta basado en un planteamiento realmente sencillo, el 50% del patrimonio genético del hijo procede de la madre y el otro 50% del padre. El primer paso que se realiza es la comparación madre-hijo, y ello nos permite conocer con seguridad el material de procedencia paterna y compararlo con el material genético del candidato. Si el posible padre posee todo este material se someterá a un proceso matemático-estadístico de paternidad. Si no, será incompatible.

El planteamiento estadístico de la probabilidad de paternidad se basa en la comparación entre la probabilidad de que un individuo de la población, elegido al azar, pueda ser el padre y la probabilidad de que lo sea el individuo que es el objeto del estudio.

Al realizarse un estudio de este tipo pueden presentarse dos situaciones, una de exclusión de la paternidad y otra de afirmación:

1. EXCLUSION DE LA PATERNIDAD. Las pruebas genéticas muestran a menudo de un modo concluyente que un determinado hombre no puede ser el padre de un niño dado si no comparten algún alelo. Sin embargo, no todas las exclusiones se consideran con la misma importancia, y se

pueden clasificar en (Sparkes RS. y Hodge SE. 1990):

- Exclusiones de primer orden o directas, en las que el niño posee un alelo que no puede haber sido heredado ni del supuesto padre ni de la madre. Un ejemplo sería el caso de una madre con un genotipo AB, un padre CD y el niño BE, en este caso el supuesto alelo E del niño no ha sido heredado ni de la madre ni del supuesto padre.

-Exclusiones de segundo orden o indirectas, en las que cabe la posibilidad de la presencia de alelos silentes, como sería el caso de que el padre y el hijo fueran homocigotos para alelos distintos. En este caso una madre podría ser AB, el padre C y el niño B, de modo que estos fenotipos podrían corresponder a genotipos CC y BB por lo que sería una exclusión, o bien podrían ser CR y BR por lo que el hijo y el supuesto padre compartirían una alelo que no ha podido ser detectado, y por lo tanto no sería una exclusión.

2. PRUEBA POSITIVA DE PATERNIDAD. Cuanto menor sea la probabilidad de encontrar una combinación dada de genes, mayor será la probabilidad de que un hombre que la posee sea el padre de un niño que también la tiene.

Las bases del cálculo de paternidad, en la prueba positiva, se encuentran en el Teorema de Bayes (1763) de las probabilidades condicionadas, a partir del cual Erik

Essen-Möller formuló el Índice de Paternidad (1938):

$$IP = \frac{X}{Y}$$

o el también utilizado valor W de Essen Möller:

$$W = \frac{X}{X + Y} * 100$$

donde "Y" es la frecuencia de dicho alelo en la población general (valor calculado a priori), y "X" es la probabilidad de transmitir el alelo paterno por el supuesto padre (valor calculado a posteriori).

Si en una prueba de paternidad no se puede excluir al supuesto padre, se calcula la probabilidad de paternidad a partir de la fórmula de Essen-Möller.

Los valores de W obtenidos estarán entre 0 y 100% y suelen expresarse en forma de los llamados predicados verbales de Hummel (Hummel K. 1971):

99.73% ≤ W	Paternidad prácticamente probada
99% ≤ W < 99.73%	Paternidad altamente probable
95% ≤ W < 99%	Paternidad muy probable
90% ≤ W < 95%	Paternidad probable
50% ≤ W < 90%	Paternidad más probable que la no paternidad
10% ≤ W < 50%	No paternidad más probable que la paternidad
5% ≤ W < 10%	Paternidad improbable
1% ≤ W < 5%	Paternidad muy improbable
0.27% ≤ W < 1%	Paternidad altamente improbable
W < 0.27%	Paternidad prácticamente excluida

Un valor W del 100% sólo podrá darse en el caso de que la frecuencia, en la población general, del alelo transmitido por el padre sea 0. Este caso sólo será posible en el supuesto de una mutación que compartan el padre y el hijo. Matemáticamente el valor límite de 99.73% es el más aceptado.

Debido a la necesidad de comparar la dotación genética del posible padre con la de la población en la que se lleva a cabo el estudio, es imprescindible conocer las frecuencias génicas de dicha población, puesto que existen diferencias raciales en cuanto a la distribución de determinados genes.

A partir de los estudios poblacionales realizados se obtienen unos valores teóricos que nos permitirán evaluar la utilidad "a priori" de los marcadores genéticos en los estudios de paternidad (Hummel K. y Gerchow J. 1981):

- "índice poblacional". Para tener una idea del grado de fiabilidad de la prueba de paternidad se calcula el Índice Poblacional (IP):

$$IP = \pi \frac{n-1}{\sum_{i=1}^n Y_i}$$

Una vez comparado el hijo con la madre, se obtienen todos los alelos que no comparte con ella y que proceden del padre biológico. El índice poblacional nos dará una orientación "a priori" del número de individuos de la población que poseen el conjunto de alelos necesario para ser compatibles con la afirmación de paternidad.

- "probabilidad de exclusión a priori" (PE). Es un parámetro que permite cuantificar la capacidad de excluir que tiene un determinado marcador, o el porcentaje de falsos padres que quedan excluidos en el estudio del marcador en cuestión. Este valor será más alto en sistemas muy polimórficos y que se encuentren en

equilibrio. En el caso más sencillo de un sistema de dos alelos codominantes vendrá definida por la fórmula:

$$P_e = p_1 p_2 (1 - p_1 p_2)$$

donde  $p_i$  es la frecuencia génica del gen "i".

Para evaluar un conjunto de sistemas se puede calcular la probabilidad de exclusión "a priori" acumulada para todos ellos:

$$P_e \text{ acum.} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i)$$

siendo:  $p_i$  = probabilidad de exclusión "a priori" de cada sistema

Este parámetro informará, antes de iniciar un estudio, de cuál es el potencial discriminatorio de un laboratorio. Después de haber estudiado una batería de marcadores, se tendrá conocimiento de cuantos falsos padres se podrán excluir.

- "eficiencia bioestadística" (EB o EM value) o parámetro que indica la eficacia media de un marcador en la prueba positiva de paternidad, y que viene definida por la fórmula:

$$\text{Eficiencia bioestadística} = \log \frac{Y}{X + 10}$$

Si se calcula este parámetro de forma conjunta para todos los sistemas empleados en un laboratorio determinado, es útil para la evaluación teórica de la eficacia de dicho laboratorio en la investigación biológica de la paternidad.

$$EB_{\text{acum.}} = \frac{\sum_{i=1}^n EB_i}{10^{n-1}}$$

siendo  $EB_i$  = Eficiencia bioestadística de cada sistema

## 2.4. CRIMINALISTICA

"La criminalística es la ciencia que estudia los indicios dejados en el lugar del delito, gracias a los cuales puede establecerse, en los casos más favorables, la identidad del criminal y las circunstancias que concurrieron en el hecho delictivo" (Villanueva Cañadas E. 1991).

En el caso concreto de la criminalística médicolegal, se trata de buscar los indicios anatómicos, biológicos o humorales que permitan establecer la identificación de un individuo o muestra biológica. Sin embargo, los indicios procedentes del lugar del delito son muestras de naturaleza muy diversa, por lo que es necesaria la participación de distintos profesionales: policías, fotógrafos, médicos, biólogos, químicos, expertos en balística, en huellas..., que actuaran en alguna de las distintas fases que se siguen en la investigación pericial:

1.-Estudio del lugar de los hechos: Es importante la observación minuciosa y metódica de la escena del delito, ya que muchos detalles pueden ser de gran ayuda en la investigación. Aspectos como la distribución de huellas, el tipo de manchas que se encuentran así como su distribución, presencia de objetos extraños o armas

son datos a tener en cuenta.

2.-Recogida de las muestras y su envío al laboratorio: Es preciso extremar el cuidado de este proceso ya que los indicios se encuentran, generalmente en poca cantidad y son fácilmente contaminables. Se cuenta con numerosas técnicas de recogida y envío de material, para lo cual hay que tener en cuenta que tipo de muestra es, si se encuentra en estado líquido o esta seca, si debe conservarse refrigerada o no, en que tipo de soporte se halla, etc. Un indicio mal recogido o mal almacenado puede ser inservible para su posterior análisis.

El tipo de muestras biológicas que se obtienen (Villanueva Cañadas E. 1991) pueden ser descritas brevemente:

- Manchas de sangre: Su aspecto es variable según la antigüedad y el soporte en el que se encuentran. En soportes absorbentes como son los tejidos o el papel ofrecen un aspecto oscuro que con el tiempo se acentúa. En este caso la sangre empapa el tejido y se difunde por él dando manchas uniformes y más o menos circulares. En soportes no absorbentes las manchas forman unas láminas rojas que con el tiempo también oscurecen. A partir de 1µl de sangre se puede obtener aproximadamente 50ng de ADN genómico.

- Líquido espermático y manchas de semen: Se puede presentar de distintas formas, ya sea en forma de mancha impregnando algún soporte o bien junto a otros fluidos biológicos en un frotis vaginal. En otros casos se puede obtener directamente a partir del individuo al que se investiga. En general el estudio del semen esta ligado a delitos contra la libertad sexual.

El aspecto de una mancha de semen varia según el soporte en el que se encuentre, de modo que en tejidos absorbentes la zona manchada queda con un aspecto como almidonado y con una morfología irregular, ya que difunde de modo no homogéneo al quedar los elementos celulares en el centro de la mancha. Si observamos la mancha a la luz ultravioleta de Wood se ve una fluorescencia blanco-amarillenta. A partir de  $1\mu\text{l}$  de semen puede obtener aproximadamente 80ng de ADN genómico.

- Pelo: Es una de las evidencias más frecuentemente encontradas en el lugar del suceso. El pelo puede haber sido arrancado, en cuyo caso conserva el bulbo o raíz que es la región del cabello incluida en la dermis y en la que se encuentran numerosas células nucleadas vivas a partir de las cuales se pueden realizar estudios de ADN. Por otro lado, se puede encontrar la región correspondiente al tallo o extremo libre del pelo, que permite identificar la especie animal a la que

corresponde, el sexo, la región de procedencia del pelo, si esta teñido, o si presenta contaminación por algún producto químico.

-Restos tisulares: Sería el caso, por ejemplo, de restos abortivos u otros tejidos que no se encuentran en un estado excesivo de descomposición y que puedan ser de utilidad para la identificación ya sea de la víctima como del autor del delito.

-Restos óseos: Pueden dar una información bastante amplia sobre el sexo, la estatura, la edad o el momento de la muerte de la víctima. Si se tienen dientes con pulpa dentaria, se puede extraer a partir de ella ADN.

3.-Estudio en el laboratorio: Se sigue un protocolo, en el que se realiza un diagnóstico,

-GENÉRICO; para conocer el tipo de muestra de que se dispone. Si se trata de manchas que pueden ser de sangre, se confirma con técnicas microscópicas, cristalográficas (basadas en la tendencia a cristalizar que tienen distintos derivados de la hemoglobina, como el clorhidrato de hematina), espectroscópicas o cromatográficas. Si se sospecha que pueden ser manchas de semen se utilizan tinciones y técnicas microscópicas, electroforéticas, enzimáticas e inmunológicas. En el caso de otro tipo de manchas, como orina, saliva o

meconio, se utilizan técnicas espectrofotográficas, microscópicas y colorimétricas.

-ESPECIFICO; Una vez determinado el tipo de muestra de que se dispone, se identifica la especie a la que pertenece. En el caso de manchas de sangre se utilizan métodos inmunológicos de solubilidad, cromatográficos y electroforéticos. Si se trata de semen al realizar el diagnóstico genérico mediante técnicas inmunológicas se hace de forma simultanea el específico. Si lo que se tiene como muestra biológica son pelos el diagnóstico específico se puede realizar por técnicas de microscopía.

-OTROS PARAMETROS INTERESANTES que se pueden deducir a partir de los indicios que se poseen, son: la raza, la edad, el sexo, la antigüedad de la muestra o la región del cuerpo de la que procede.

-INDIVIDUAL; Una vez establecido que el indicio encontrado pertenece a la especie humana, es preciso agruparlo en distintas categorías. El diagnóstico individual realizado sobre muestras de sangre se fundamenta principalmente en la determinación de los distintos marcadores plasmáticos y eritrocitarios. En el caso de muestras de semen se demuestra la presencia de aglutinógenos y aglutininas similares a los de la sangre. Si se trata de pelos, se pueden hacer estudios

de grupos enzimáticos, exámenes microscópicos (para determinar las características del pelo) y análisis de queratinas mediante técnicas electroforéticas.

Sin embargo, en el campo de la criminalística, el análisis del ADN para la individualización es muy importante, ya que se puede hablar de él como una huella dactilar genética específica de cada persona. El estudio del material genético, con aplicaciones a la Medicina Legal y Forense, ha permitido superar a los laboratorios de criminalística forense, la incapacidad de resolver determinados casos con las técnicas clásicas, a pesar de existir indicios. Sin embargo, toda esta información no resulta útil si no puede ser comparada con el mismo tipo de información perteneciente a algún individuo, ya sea el sospechoso de haber cometido el delito o la víctima.

En la práctica forense la identificación puede realizarse en uno de los siguientes supuestos: individuo vivo, cadáver reciente, esqueletos y restos cadavéricos.

Para la realización del cotejo entre el vestigio encontrado y un individuo concreto es necesario conocer las frecuencias poblacionales de cada variable estudiada. Según el grado de polimorfismo de un marcador dado es posible determinar su valor potencial, o más específicamente la probabilidad de seleccionar al azar dos individuos de la misma población y raza con el mismo

fenotipo, es la llamada "Probabilidad de Coincidencia" (Pc) (Dykes DD. 1985) que se expresa:

$$P_c = \sum_{j=1}^m p_j$$

donde  $m = n^\circ$  de fenotipos

$p_j =$  frecuencia del fenotipo "j"

Cuanto más polimórfico es un sistema más homogéneas son sus frecuencias fenotípicas y la Pc se hace más pequeña.

De modo contrario, la probabilidad de seleccionar al azar dos individuos con distintos fenotipos, o "Probabilidad de Discriminación" se expresa:

$$P_d = 1 - P_c$$

El valor acumulado de Pd para varios marcadores es:

$$P_{d_t} = 1 - \prod_{i=1}^n P_{c_i}$$

siendo  $n = n^\circ$  de marcadores

Durante los años 30 se introdujo el estudio de los marcadores genéticos eritrocitarios en material biológico, distinto a la sangre fresca obtenida por punción venosa. Esto hizo posible el estudio de la individualización en el campo de la criminalística. Sin embargo la posterior aplicación, cada vez mayor, de nuevos marcadores polimórficos aumentaron progresivamente el grado de discriminación, que inicialmente era pequeño (Huguet E. y col. 1987).

Uno de los mayores problemas para el diagnóstico individual a partir de vestigios, era la cantidad de muestra de que se disponía y su conservación, también la presencia de alelos silentes. Este problema que nos planteaban los marcadores convencionales queda superado por el empleo de la tecnología del ADN. En estos últimos años la utilización de estas técnicas ha tenido un notable impacto basado en su capacidad de asociar, a partir de evidencias biológicas, personas a crímenes en los que estaban implicados, con un mayor nivel de certeza del que es posible utilizando los sistemas convencionales empleados anteriormente.

Por otro lado, el ADN tiene una gran estabilidad en el medio ambiente, de modo que se puede aislar y tipar a partir de células con incluso años de antigüedad. En el caso de las proteínas su degradación es mucho más rápida.

El primer método descrito para la individualización, mediante el estudio de las regiones hipervariables del ADN, es el de RFLPs o polimorfismos de tamaño de fragmentos de restricción. Aplicando la técnica de restricción e hibridación de "Southern" se puede hablar de dos tipos de polimorfismos:

**MLP (Multi Locus Probes)** en los que una sonda detecta un gran número de secuencias iguales complementarias, repartidas por el genoma del individuo de modo que se obtiene un patrón de muchas bandas alélicas. La posibilidad de que dos individuos presenten el mismo patrón de bandas es muy pequeña. Sin embargo presentan el inconveniente de tener un elevado índice de mutación y la complejidad de interpretación de los patrones de bandas.

**SLP (Single Locus Probes)** en este caso sólo hay una única secuencia complementaria de la sonda empleada. Se emplean enzimas de restricción que delimitarán la región del ADN que contiene la secuencia polimórfica que se repite un número determinado de veces para cada individuo. La sonda puede reconocer la región repetitiva o bien las regiones estables que la flanquean, en cualquier caso se trata de un método dialéctico, que permite la identificación de muestras mezcladas en estudios de criminalística.

El diagnóstico individual mediante técnicas de PCR es especialmente útil en estudios de vestigios, donde la cantidad de material es crítica. Aplicando esta técnica se pueden estudiar distintos tipos de polimorfismos:

**De secuencia.** Sondas ASO que son oligonucleótidos específicos para cada alelo que se inmovilizan en una membrana y se unen la fragmento de ADN genómico complementario (técnica llamada Dot-Blot reverso), procedente del producto de amplificación. Mediante este sistema se estudian marcadores que no son tan polimórficos como los de tamaño, pero que ofrecen una gran seguridad y reproductibilidad en la identificación alélica.

**De tamaño.** VNTRs en los que según el tamaño de la unidad de repetición se habla de minisatélites o microsatélites. En estudios de vestigios en criminalística, la utilización de microsatélites es más reproducible y menos afectable por la degradación de la muestra, ya que se trata de fragmentos más pequeños.

Dentro de este tipo de polimorfismos se encuentran los llamados MVR (Minisatellite Variant Repeat), en los que las unidades de repetición presentan algunos cambios puntuales de nucleótidos por mutaciones. Permiten la construcción de unos patrones multibandas, que recuerdan de algún modo a los MLPs, pero con las ventajas de la

técnica PCR. Estos polimorfismos son especialmente útiles en el diagnóstico individual, principalmente el área de la criminalística.

Por último se han hecho estudios de muestras biológicas muy antiguas utilizando en estos casos el ADN mitocondrial (mtDNA). Las principales ventajas que ofrece el mtDNA sobre el nuclear es que existen numerosas copias por célula, mientras que el ADN genómico se encuentra como una copia única por núcleo celular. Esto facilita la supervivencia de algunas de las copias a la degradación autolítica de los ácidos nucleicos que sigue a la muerte del organismo, así como a los efectos del paso del tiempo. Por otro lado, al ser exclusivamente de herencia materna y por lo tanto haploide, el producto amplificado puede secuenciarse directamente sin necesidad de ser clonado.

Hay que tener en cuenta que la utilidad que pueda tener la información obtenida a partir de vestigios depende siempre de los datos que se tengan para poder comparar.

En EEUU y GB se esta estudiando la posibilidad de formar un banco de datos sobre el perfil de ADN de individuos implicados en algún delito, pero ello es motivo de controversias ya que se cuestiona su legalidad y el hecho de que de alguna manera pueda atentar contra la libertad e intimidad de los individuos (Marx JL. 1988).

## 2.5. ASPECTOS TECNICOS DE LA PCR

En la conferencia de la "American Society of Human Genetics", en octubre de 1985, se dio a conocer la "polymerase chain reaction" (PCR) como un método de amplificación "in vitro" de DNA (Innis M. y Gelfand DH. 1990).

Mediante este método es posible sintetizar, en cuestión de horas, millones de copias de una secuencia específica del genoma. Esta técnica perfeccionada por Kary Mullis et al. se ha automatizado con el tiempo y ha hecho posible el desarrollo de numerosas y diversas aplicaciones (Gené M. y col. 1991).

En la amplificación por PCR intervienen, principalmente los siguientes componentes:

1.- dos oligonucleótidos ("primers") que flanquean la región que va a ser amplificada. Los "primers" se diseñan de modo que hibriden con la cadena opuesta de la secuencia o fragmento que se quiere amplificar y orientados de forma que se den las condiciones para iniciar la síntesis de DNA por la polimerasa (5' - 3'). También serán complementarios de los productos de la amplificación (Saiki RK. y col. 1990).

2.- polimerasas termoestables, entre las que hay una gran variedad:

Taq-polimerasa, aislada de la bacteria "Thermus aquaticus" que mantiene su actividad después de permanecer a temperaturas de alrededor de 95°C.

DynaZyme, aislada de la bacteria "Thermus brockianus".

Hot tub DNA-polymerase, procedente de "Thermus ubuquitus".

Tth DNA-polymerase, aislada de "Thermus termophilus".

Pfu DNA-polymerase, de "Pirococcus furiosus".

Vent-polymerase, de "Thermococcus litoralis".

Todas ellas presentan características similares. Uno de los inconvenientes que planteó la PCR en los primeros años fue la termolabilidad de la polimerasa empleada, el fragmento Klenow de la polimerasa I de E.Coli, que debía ser repuesta en cada ciclo y aumentaba así el riesgo de error (Saiki RK. y col. 1988).

El proceso de amplificación consta de tres etapas, a tres temperaturas distintas que se repiten cíclicamente y de forma automatizada, mediante un termociclador:

1. DESNATURALIZACION de la doble cadena de DNA mediante una breve aumento de la temperatura. El tiempo y temperatura utilizados son típicamente 95°C durante 30 segundos ó 97°C durante 15 segundos, aunque en el caso

de secuencias ricas en G+C pueden ser apropiadas temperaturas más elevadas. Una desnaturalización incompleta reduce la cantidad de producto amplificado, y un exceso de desnaturalización provoca una pérdida innecesaria de la actividad enzimática. La vida media de la Taq-polimerasa es de más de 2 horas a 92.5°C, unos 40 minutos a 95°C y unos 5 minutos a 97.5°C.

2. ANNEALING o unión de los "primers" con su secuencia complementaria. Una vez que se han separado las dos cadenas de ADN, que son las que actúan de molde para hacer las copias posteriores, los "primers" localizan las regiones que le son complementarias a las que se hibridarán en las condiciones de temperatura óptimas. La temperatura idónea depende de la longitud y contenido en G-C de los "primers", aunque la que da mejores resultados está entre 55-72°C. Este proceso requiere sólo unos pocos segundos. Incrementando la temperatura de annealing reducimos la extensión errónea con nucleótidos incorrectos en el extremo 3' de los "primers" y utilizando rangos de temperatura más estrictos, especialmente durante los primeros ciclos, incrementaremos la especificidad.

3. EXTENSION de los "primers" mediante la Taq-polimerasa. El tiempo depende de la longitud y concentración de la secuencia que vamos a amplificar y de la temperatura, de modo que si la concentración del sustrato es pequeña

requerirá mayor tiempo de extensión en los primeros ciclos. También en los últimos ciclos del proceso, donde se ha generado gran cantidad de producto que a su vez sirve de molde y el enzima esta casi consumido, emplearemos más tiempo en esta fase. Generalmente la extensión se realiza a 72°C, temperatura para la cual la polimerasa termoestable tiene su máxima actividad, y se estima que se incorporan 35-100 nucleótidos por segundo (aunque se han dado cifras muy distintas), por lo que 2 minutos serán suficientes para una secuencia de 2Kb.

Si la temperatura de extensión es demasiado baja y la concentración de nucleótidos es elevada se favorece la incorporación errónea de nucleótidos (Innis M. y Gelfand DH. 1990).

Las tres fases anteriores se repiten de forma cíclica un número determinado de veces que depende de la concentración inicial de DNA, generalmente se realizan de 25 a 40 ciclos. Un número excesivo de ciclos incrementa la cantidad de las inespecificidades y de las copias incorrectas.

# Proceso típico de la PCR

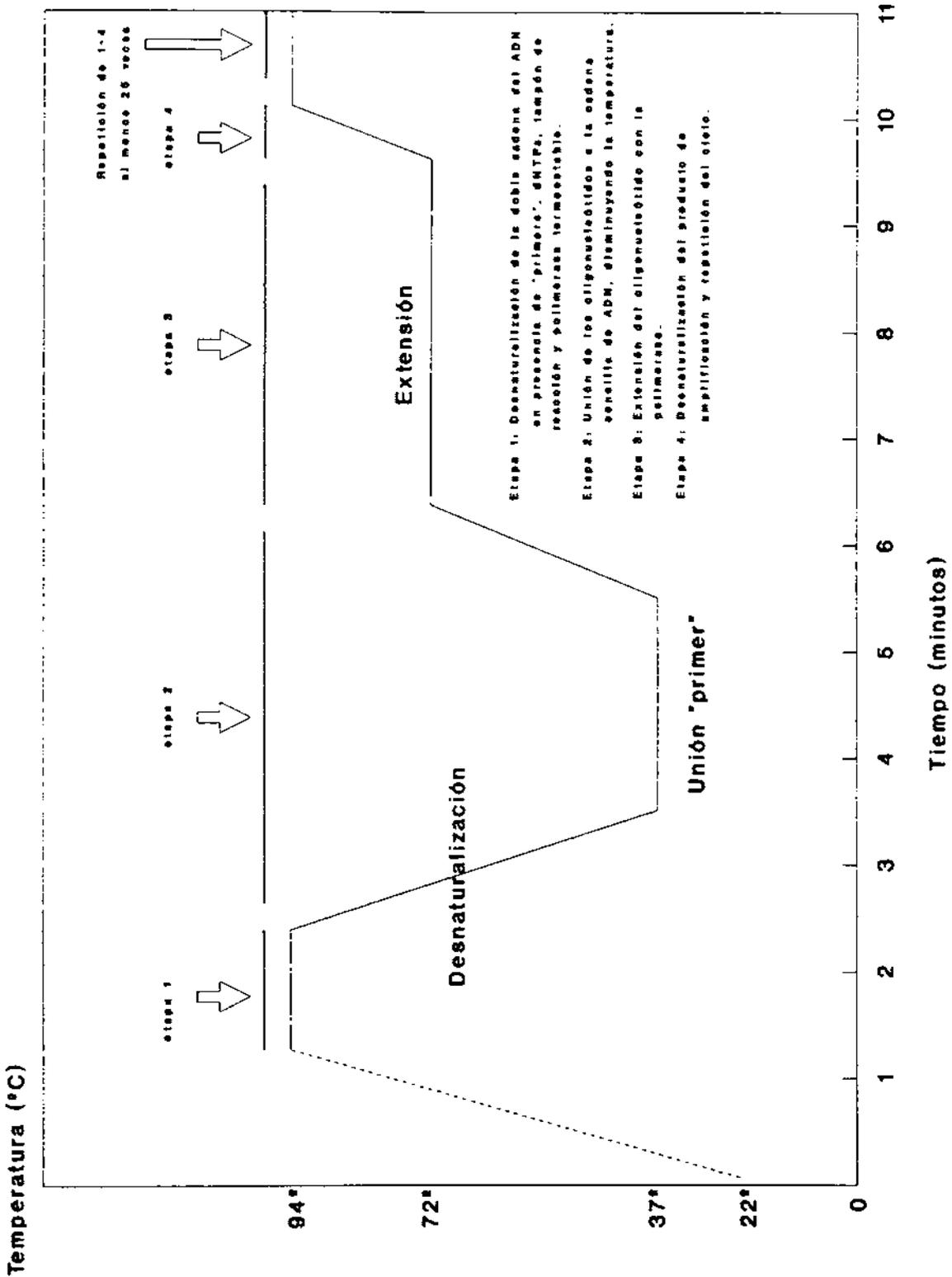


Fig.1. Desarrollo del proceso de amplificación del ADN por la técnica de PCR.

En cada ciclo se doblará la cantidad de DNA sintetizado en el ciclo anterior. El resultado es un aumento exponencial de la secuencia deseada, aproximadamente  $2^n$ , siendo "n" el número de ciclos realizado (en el supuesto de una sola célula y un gen de copia única).

<u>Amplificación exponencial</u>	
Ciclos	Cantidad Relativa
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1.024
11	2.048
12	4.096
13	8.192
14	16.384
15	32.768
16	65.536
17	131.072
18	262.144
19	524.288
20	1.048.576
21	2.097.152
22	4.194.304
23	8.388.608
24	16.777.216
25	33.554.432
26	67.108.864
27	134.217.728
28	268.435.456
29	536.870.912
30	1.073.741.824

La PCR no es un proceso ilimitado, sino que hay un agotamiento de la reacción de amplificación y en los últimos ciclos se atenúa el acumulo exponencial del producto amplificado, es el llamado Efecto Plateau, hecho en el que pueden influir numerosos factores como:

- El agotamiento de substratos como los dNTPs y los "primers".

- La pérdida de estabilidad de los reactivos tales como los enzimas o los dNTPs.

- Inhibición del producto final.

- Competición por los reactivos, productos no específicos o primer-dimer.

- Reannealing del producto específico a concentraciones superiores a  $10^{-8}$  M.

- Desnaturalización incompleta.

Se ha podido observar en algunos casos la amplificación preferencial de uno de los alelos respecto al otro en muestras de individuos heterocigotos (Walsh PS. y col. 1992). Este hecho puede deberse a distintas causas:

- Diferencias significativas entre los dos alelos en cuanto al porcentaje de GC que poseen. Esto afecta principalmente al proceso de desnaturalización, ya que las regiones con mayor contenido de GC requieren una mayor temperatura para completar su desnaturalización.

- Diferencias de tamaño entre los dos alelos, lo cual facilita la amplificación del fragmento más corto

principalmente cuando la cantidad de Taq-polimerasa es limitante o el DNA esta degradado.

-Errores en el annealing entre el oligonucleótido y el alelo específico en el extremo 3', y por lo tanto extensión errónea.

Por último hay otro problema con el que hemos de contar, es la aparición de los falsos positivos o "carry-over". Debido a la capacidad de la PCR de producir un elevado número de copias de una secuencia a partir de cantidades mínimas de ADN (Fig.2), pueden aparecer falsos positivos procedentes de la contaminación de muestras anteriormente amplificadas (Innis M. y Gelfand DH. 1990).

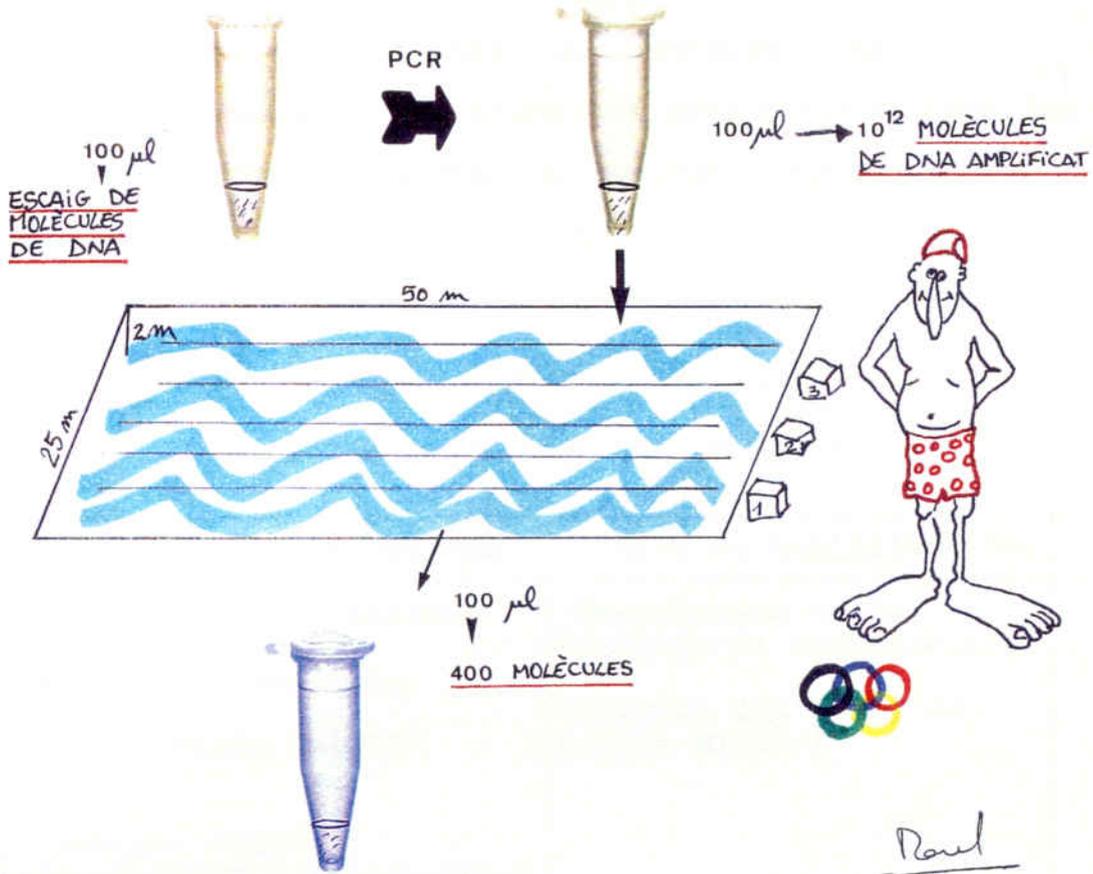


Fig.2. El problema de la contaminación es tan importante, que una pequeña cantidad de ADN en un volumen de 100 µl. de reacción de amplificación se convierte en una cantidad tal, que si estuviera en una piscina de 2500 m<sup>3</sup>, encontraríamos una concentración de moléculas de ADN de 400 moléculas por cada 100 µl de agua.

Para evitar el problema del carry-over podemos aplicar una serie de medidas de precaución (Kwok S. y Higuchi R. 1989):

-Aislar físicamente el material de pre-amplificación y los productos amplificados. Los dos procesos pueden realizarse en habitaciones separadas y con reactivos y pipetas distintos

**DISTINTAS AREAS DE TRABAJO  
Y  
ACTIVIDADES EN CADA UNA DE ELLAS**

Area de extracción de ADN	Area de amplificación
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Digestión de la muestra</li> <li>-Extracción orgánica</li> <li>-Purificación del ADN</li>   <li>-También: Análisis microscópico y macroscópico de la muestra</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Preparación de la reacción de amplificación</li>   <li>-Adición del ADN y del aceite mineral</li> </ul>

Area de productos amplificados
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Preparación del gel de agarosa</li> <li>-Electroforesis</li> <li>-Tipaje de la muestra</li> <li>-Almacenamiento de productos amplificados</li> <li>-Material de desecho</li> </ul>

-Autoclavar el H<sub>2</sub>O y todas las soluciones que sean posibles. Sin embargo, autoclavar bajo condiciones que favorecen la descontaminación bacteriana, degrada el ADN de bajo peso molecular. Por este motivo no pueden ser autoclavados ni "primers", ni dNTPs ni la polimerasa termoestable.

-Preparar, alicuotar y guardar los reactivos utilizados en la PCR en un área libre de productos amplificados.

-Utilizar guantes desechables.

-Evitar salpicaduras al abrir los tubos.

-Utilizar pipetas de desplazamiento positivo, que evitaren la contaminación de las muestras, por aerosol, al pipetear.

-Preparar una mezcla de todos los reactivos de amplificación, en las concentraciones adecuadas, antes de alicuotarla y añadir la muestra.

-Añadir la muestra de ADN al final, después de haber puesto todos los demás reactivos de amplificación.

-Realizar controles positivos y negativos.

-Limpiar el material utilizado con HCl 1N.

-Cubrir la superficie del transluminador-UV con un papel o plástico limpio para cada ocasión.

## 2.6. SATELITES: PRINCIPALES CARACTERISTICAS DE LOS MARCADORES ESTUDIADOS

En el caso de los organismos procariotas el tamaño del genoma da una idea bastante exacta del número de genes que tiene, pero en el caso de los eucariotas no es así ya que existen secuencias de ADN repetidas y no codificadoras que forman una parte importante del genoma.

Dentro del genoma humano parte de estas secuencias forman el llamado componente altamente repetitivo compuesto por secuencias cortas repetidas muchas veces en tandem.

La repetición en tandem de una secuencia corta da lugar en ocasiones a una fracción con propiedades físicas distintas, como es una composición de bases distinta al promedio del genoma, lo cual nos permite separarla en función de su densidad de flotación, (pues ésta depende del contenido en pares G-C). Esta fracción forma el llamado ADN-satélite.

Un número importante de secuencias de ADN repetitivo humano han sido identificadas y caracterizadas, aunque en muchas ocasiones no se sabe aún ni la organización ni la función de las mismas.

Generalmente las secuencias repetitivas humanas pueden dividirse en dos tipos (Oliva R. y col. 1991):

1.- Las que se repiten en tandem.

DNA-satélite: son secuencias repetitivas simples que se localizan cerca del centrómero. Forman cuatro familias distintas consistentes cada una de ellas en cientos de cortas repeticiones en tandem de 5 a 10 pb. e invertidas. Como mucho, sólo un 5% del genoma humano estará formado por secuencias satélite. Aunque no está demostrado, probablemente estas secuencias juegan un importante papel en la determinación de la estructura del cromosoma y en la división de las cromátidas durante la mitosis y meiosis.

Secuencias minisatélites hipervariables: llamadas también VNTR (Variable number of tandem repeats) o AmpFLPs. Son secuencias que oscilan entre  $\pm$  9 y 70 pb repetidas en tandem altamente polimórficas. Los polimorfismos de estos VNTRs se deben a inserciones y deleciones formadas en recombinaciones debidas a la proximidad de múltiples copias de la misma secuencia. Dentro de este tipo encontramos polimorfismos como el YNH24, para el que se han descrito hasta 44 alelos y en el que se ha observado un índice de heterocigosidad del 90% (Gasparini P. 1990; Gené M y col. 1991).

Hay que diferenciar especialmente entre los VNTRs a los llamados microsátélites o STR (short tandem repeat) formados por secuencias core de 2 (dinucleotide repeat), 3 (trinucleotide repeat) o 4 (tetranucleotide repeat) nucleótidos que se repiten en tandem. Como ejemplo de ello podemos citar el polimorfismo del pseudogen de la  $\beta$ -actina humana, llamado ACTBP2 (o SE33) y cuya unidad de repetición es un tetranucleótido:  $(AAAG)_n$  (Polymeropoulos MH. y col. 1992; Moos M. y Gallwitz D. 1983).

2.- Las que se encuentran repetidas en distintos lugares del genoma.

Secuencias Alu: Son las más comunes y se denominan de este modo porque contienen una diana para el enzima de restricción Alu I. Hay distintos tipos de secuencias Alu:

2.1.-las que forman el grupo SINE (short interspersed nucleotide repeats) que tienen unidades de repetición no mayores de 300 pb y no forman más del 5% del genoma humano.

2.2.-las que forman el grupo LINE (long interspersed nucleotide repeats) caracterizadas por tener unidades de repetición de aproximadamente 5000 pb.

Estas secuencias se dispersan en el genoma por retrotransposición. Han sido toleradas durante la

evolución humana ya que no tienen un valor adaptativo negativo.

Un importante número de sistemas de tipaje del ADN utilizados en Medicina Legal y Forense se basan en polimorfismos de tamaño de regiones de ADN repetitivo en tandem (VNTR). Ello se debe a los niveles altos de variabilidad alélica en número de copias repetidas y por lo tanto en fragmentos de longitud variable. El número de alelos de cada locus VNTR es de hecho la expresión de su variabilidad.

La transmisión de los alelos de acuerdo con los principios genéticos y el elevado polimorfismo del sistema justifican el interés de los minisatélites en Medicina Forense, especialmente en determinaciones de relaciones familiares e identificaciones individuales.

Los marcadores estudiados en este caso son polimorfismos de tamaño del tipo VNTR o minisatélites:

---

## YNZ22. Descripción y Patología

Se trata de un marcador VNTR altamente polimórfico que se localiza en el extremo distal del brazo corto del cromosoma 17.

Este polimorfismo fue estudiado en un principio por Nakamura Y. mediante la técnica RFLPs. Utilizando como enzimas de restricción BamHI obtuvo 11 alelos de distintos tamaños que iban de 1.1 a 2 Kb y un índice de heterocigosidad del 86%. Esta técnica se basa principalmente en la digestión del ADN con un enzima de restricción específica (que en este caso fue BamHI) que deja entre los lugares de corte una secuencia "core" repetida un número determinado de veces, distinto en cada individuo. Según el número de repeticiones de la secuencia "core" estos fragmentos tendrán distintos tamaños que se podrán separar mediante electroforesis y se visualizarán utilizando la técnica de Southern (Nakamura Y. y col. 1987).

Horn GT. demostró la posibilidad de utilizar la técnica de PCR para analizar el polimorfismo de la YNZ22 y describir 12 alelos distintos (Horn GT. 1989). Pero Gecz J. ha descrito una modificación en la técnica para observar 2 alelos más (Gecz J. 1991).

---

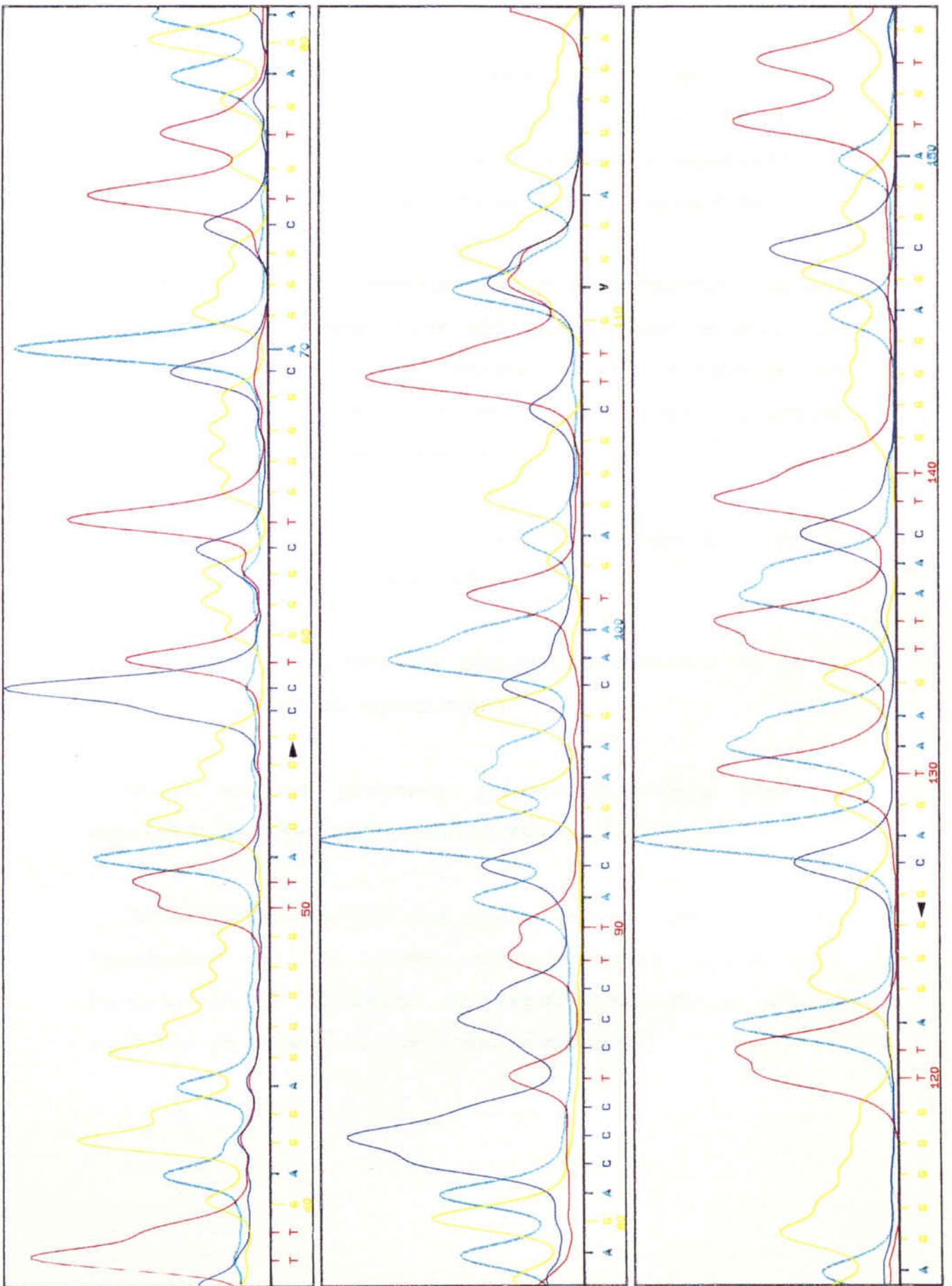
Se han descrito hasta 14 alelos que difieren en el número de veces que se repite una secuencia formada por 70pb. y cuyas longitudes van desde 168 pb (en el caso de una sólo unidad de repetición) a 1078 pb (si está formado por 14 unidades de repetición).

La secuencia "core" de este minisatélite es (Nakamura Y. 1987):

5'-TGG AGT CTC TGG GTG TCG TGC GTC AGA GT-3'

Se ha podido secuenciar directamente esta unidad de repetición, a partir de un individuo homocigoto para el alelo de dos unidades de repetición, mediante un secuenciador automático (Fig.3). Se ha comparado con la secuencia obtenida por Wolf RK. y col. en 1988, obteniendo los mismos resultados.

Fig.3. Secuencia de la unidad de repetición del minisatélite YNZ22. La unidad de repetición se halla entre las dos flechas.



Flanqueando a las unidades de repetición se encuentran las regiones estables formadas por 22 pb, en el extremo anterior a la primera unidad de repetición, y por 35 pb detrás de la última unidad de repetición.

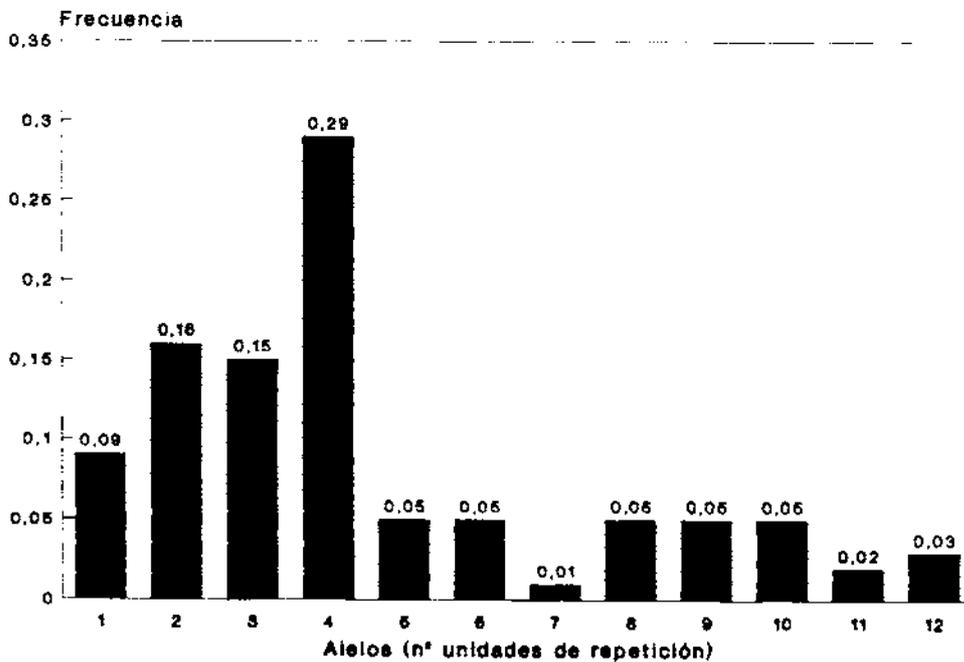
Horn GT. y col. describieron y construyeron los dos oligonucleótidos que serán utilizados como primers, en el proceso de annealing y extensión de la técnica PCR (Horn GT. y col. 1989). Estos primers están formados por 20 y 21 pb respectivamente:

5'-CGA AGA GTG AAG TGC ACA GG-3' (se coloca a 22 pb de la primera unidad de repetición)

5'-CAC AGT CTT TAT TCT TCA GCG-3' (se coloca a 35 pb de la última unidad de repetición)

Otros autores proponen primers distintos para la amplificación del minisatélite YNZ22.

Se ha observado que los alelos cortos son mucho más frecuentes que los largos, principalmente el que esta formado por 4 unidades de repetición. Estos alelos muestran un patrón de herencia mendeliana.



Frecuencias alélicas observadas en 118 individuos. (Batanian JR. 1990)

Además de ser de gran utilidad como marcador polimórfico, esta región del cromosoma 17 está estrechamente relacionada con el síndrome de Miller-Dieker.

Dobyns WB. probó que de 25 pacientes con el síndrome de Miller-Dieker (MDS), en 21 (probablemente 22) se confirmaba la delección de la región p13.3 del cromosoma 17, y era la causa del fenotipo MDS (Dobyns WB. y col. 1991).

Los individuos con esta patología congénita presentan una lisencefalia de tipo I (cerebro blando), lo cual provoca un profundo retraso mental así como otros problemas neurológicos. Presentan también unas características faciales típicas como la presencia de una frente prominente, el bitemporal hundido, la nariz corta y respingona, el labio superior prominente, la mandíbula pequeña, orejas malformadas y el paladar arqueado. Presentan también otras anomalías como problemas cardiológicos y retraso en el crecimiento (Sharief N. y col. 1990).

El MDS es el resultado de deleciones "de novo" en algunos pacientes y de una segregación desequilibrada de traslocaciones familiares en otros. Aunque son más comunes las deleciones "de novo" (VanTuinen P. y col. 1988).

El fenotipo causado por este síndrome parece ser el resultado de la deleción de varios genes no relacionados funcionalmente pero contiguos físicamente en el cromosoma 17.

Por otro lado, en la región 17p13 (del cromosoma 17) en la que se encuentra este VNTR se halla también el gen de la "p53". Dicha proteína actúa como anti-oncogen, de modo que su importancia radica en la pérdida o inactivación del gen que la codifica, que junto a la

---

activación de uno o más oncogenes constituyen los pasos en la ruta de la formación de cánceres como el de mama (Mackay J. y col. 1988), colorectal (Vogelstein B. y col. 1988,1989) y osteosarcoma (Toguchida J. y col. 1989).

La pérdida alélica del gen supresor de tumores "p53" ha sido correlacionada con la pérdida de heterocigosidad del polimorfismo YNZ22 (Matsumura K. y col. 1992, Singh S. y col. 1993).

El estudio de esta región del cromosoma 17, YNZ22, facilitará la realización de diagnósticos prenatales y consejo genético, así como otras aplicaciones médicas.

### **3' APO B. Descripción y Patología.**

Las apolipoproteínas, que se encuentran en el suero de los mamíferos, tienen la misión de transportar los lípidos y el colesterol procedentes de la dieta. Una de las más largas de estas proteínas es la llamada apolipoproteína B (apo-B), y constituye el único componente proteico de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Los niveles elevados de LDL, y por lo tanto de apo-B, incrementan el riesgo de problemas coronarios en los humanos.

---

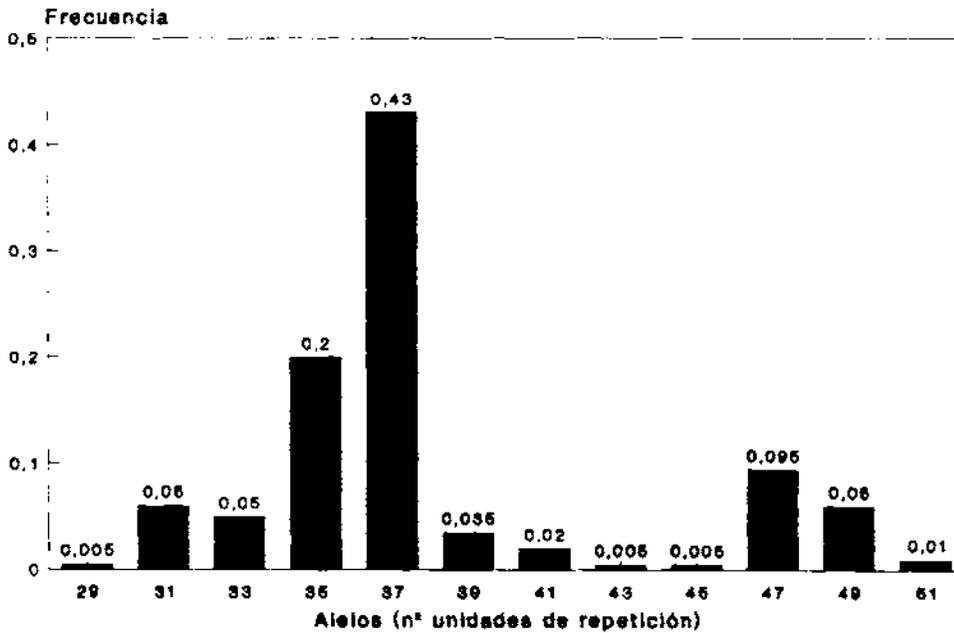
En los mamíferos se sintetizan dos formas de apo-B de distinto tamaño: una más pequeña, llamada apo-B48, que se produce sólo en el intestino; y otra prácticamente el doble de larga que la anterior, llamada apo-B100, que se produce en el hígado y es la forma que se encuentra en las LDL (Blackhart BD. y col. 1986).

El gen que codifica la cadena polipeptídica de la apo-B100 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 2 y tiene una longitud de 43 Kb. Este gen contiene una secuencia minisatélite localizada aproximadamente 0.5 Kb del extremo 3' del último codón de aminoácidos (Boerwinkle E. y col. 1989). Esta región hipervariable consiste en un VNTR de secuencias cortas ricas en pares A-T, siendo las unidades de repetición de 30 pb formadas por dos repeticiones de 14-16 pb (Decorte R. y col. 1993).

La secuencia "core" que se repite es (Knott TJ. y col. 1986):

5'-TTT TAT AAT TAA AAT A-3'

Se han descrito 12 alelos de distinto tamaño que tienen de 29 a 51 unidades de repetición y un tamaño que oscila de  $\pm$  570 a 900 pb. El alelo más frecuente es el de 691 pb o 37 unidades de repetición, seguido del de 659 pb o 35 unidades de repetición (Boerwinkle E. y col. 1989).



Frecuencias alélicas observadas en 125 individuos caucásicos. (Boerwinkle E. 1989)

Se han propuesto dos nomenclaturas alélicas distintas: 30,32,34,36....(Ludwig EH. y col. 1989) y 31,33,35,37... (Boerwinkle E. y col. 1989), pero éste último, en 1992, ha introducido una nueva terminología

basándose en la secuenciación de alelos amplificados de modo que el actualmente llamado alelo 39 corresponde al 37 de Boerwinkle E. (1989) y al 36 de Ludwig EH. (1989).

Hegele RA. estudió este polimorfismo utilizando la técnica de RFLPs y comparando el resultado de la acción de tres enzimas de restricción: EcoR I, Xba I y Msp I, en individuos control y pacientes con infarto de miocardio. Observó que los alelos de mayor tamaño, en los tres casos eran significativamente más frecuentes en los individuos con infarto de miocardio que en los casos control (Hegele RA. y col. 1986).

Cambien F. demostró que la presencia del alelo 48 estaba relacionada con un mayor riesgo de enfermedades coronarias (Cambien F. y col. 1992). Friedl W. observó que los genotipos que contenían los alelos 38, 44, 46 y 48 (según la nomenclatura de Ludwig EH. y col. 1989) mostraban una asociación con problemas coronarios (Friedl W. y col. 1990).

Este polimorfismo presenta un nivel de heterocigosidad del 75% y se hereda de forma autosómica codominante.

Boerwinkle E. describió en 1989 los oligonucleótidos, formados por 20 pb, empleados como primers en la amplificación de esta región:

---

5'-ATG GAA ACG GAG AAA TTA TG-3'

5'-CCT TCT CAC TTG GCA AAT AC-3'

Se ha descrito, también, una mutación en el nucleótido 10708 del gen de la apo-B100. Esta mutación tiene como consecuencia la sustitución de una Arginina por una Glicina en la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la apo-B100, de este modo se ve alterada la estructura de la proteína disminuyendo la afinidad de la LDL por su receptor. Esto origina una hipercolesterolemia que incrementa el riesgo de una aterosclerosis prematura. Dicha patología, denominada Hipercolesterolemia familiar, afecta a uno de cada 600 individuos de la población general (Wenham PR. y col. 1991) y es heredada de forma autosómica dominante.

#### **D1S80. Descripción.**

Este locus, también llamado MCT118, fue descrito por Nakamura Y. en 1988 y se encuentra situado en el extremo distal del brazo corto del cromosoma 1.

Inicialmente se utilizó la técnica de RFLP's para describir este polimorfismo y empleando como enzima de restricción HinfI se observaron más de 10 alelos distintos cuyos tamaños oscilaban entre 0.3 y 1.2 Kb.

---

Estos alelos siguen un patrón de herencia mendeliana segregándose de forma codominante, y presentan un índice de heterocigosidad del 90% (Nakamura Y. y col. 1988).

En 1990 Kasai K. logró amplificar mediante la técnica de PCR el locus D1S80 y observó que se trataba de un VNTR cuya unidad de repetición esta formada por 16 pb. y contiene una secuencia "core" :

5'-GNN GTG GG-3'

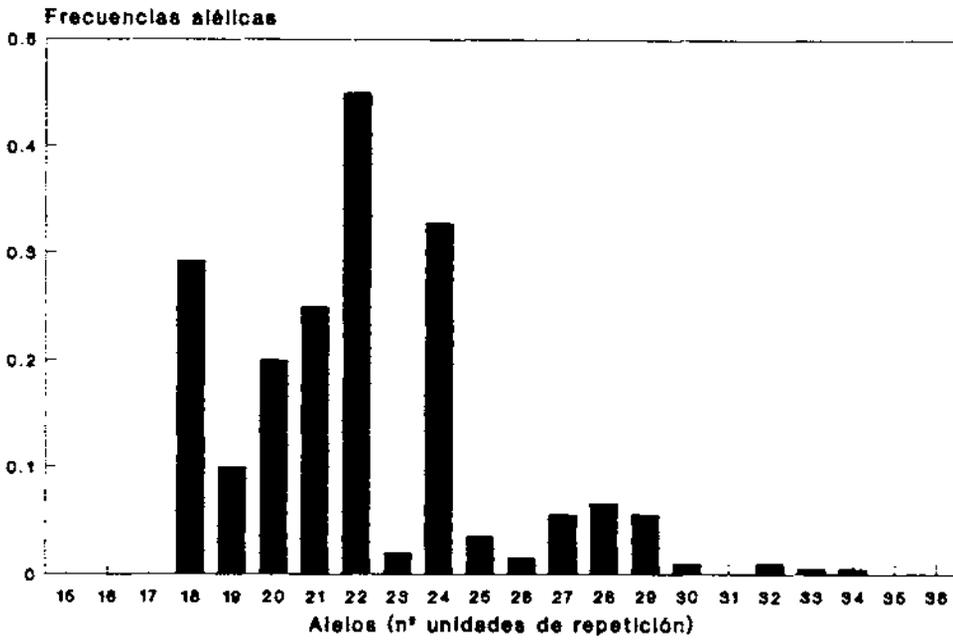
que es característica de un grupo de VNTR cuya unidad de repetición es rica en "G", como es el caso de YNZ22 (Kasai K. y col. 1990).

Kasai K. sintetizó los primers que dan un elevado grado de especificidad en la amplificación del locus MCT118, y que tienen 28 y 29 pb.:

5'-GAA ACT GGC CTC CAA ACA CTG CCC GCC G-3'

5'-GTC TTG TTG GAG ATG CAC GTG CCC CTT GC-3'

Se han descrito 21 alelos cuya longitud oscila desde 387 pb. (o 15 unidades de repetición) a 723 pb.(que representan 36 unidades de repetición). Entre estos alelos destacan por su mayor frecuencia los de 18 y 24 unidades de repetición (Sajantila A. y col. 1992).



Frecuencias alélicas observadas en 99 individuos caucásianos. (Budowie B. y col. 1991)

### 3. MATERIAL Y METODOS

## 3.1. MUESTREO

El estudio de los distintos polimorfismos de DNA expuestos en este trabajo se ha realizado en un conjunto de individuos pertenecientes a la población de Cataluña, que por su interés médico-legal, se considerará como tal cualquier residente habitual de Cataluña.

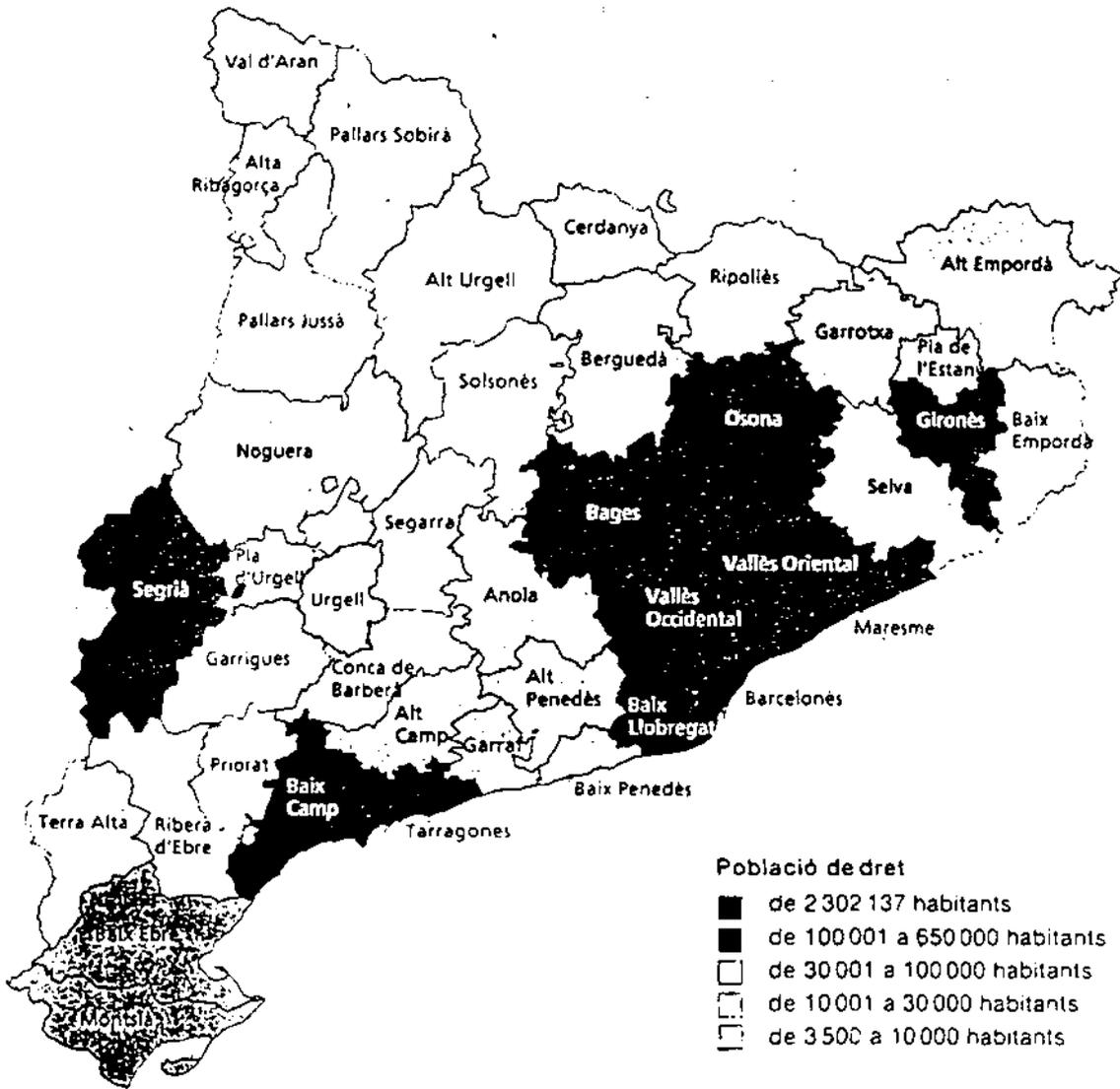
Població de dret 1991. Províncies.  
Distribució per situació de residència i sexe.

Províncies	Presentes			Absents			Població de dret		
	homes	dones	total	homes	dones	total	homes	dones	total
Barcelona	2247579	2378458	4626037	17780	10590	28370	2265359	2389048	4654407
Girona	250553	254682	505235	2471	1922	4393	253024	256604	509628
Lleida	171068	172766	343834	4895	4726	9621	175963	177492	353455
Tarragona	264125	270104	534229	4471	3304	7775	268596	273408	542004
Catalunya	2933325	3076010	6009335	29617	20542	50159	2962942	3096552	6059494

**Població de dret 1991. Comarques.**  
Distribució per situació de residència i sexe.

Comarques	Presentis			Absents			Població de dret		
	homes	dones	total	homes	dones	total	homes	dones	total
Alt Camp	16771	17009	33780	123	113	236	16894	17122	34016
Alt Empordà	44857	45211	90068	376	311	687	45233	45522	90755
Alt Penedès	34560	34942	69502	241	120	361	34801	35062	69863
Alt Urgell	9505	9201	18706	162	142	304	9667	9343	19010
Alta Ribagorça	1650	1523	3173	163	178	341	1813	1701	3514
Anoia	40405	41448	81853	362	235	597	40767	41683	82450
Bages	73083	77193	150276	1118	783	1901	74201	77976	152177
Baix Camp	64156	65927	130083	926	590	1516	65082	66517	131599
Baix Ebre	31380	32471	63851	426	368	794	31806	32839	64645
Baix Empordà	44522	44467	88989	540	401	941	45062	44868	89930
Baix Llobregat	301567	304748	606315	2800	1077	3877	304367	305825	610192
Baix Penedès	18779	18794	37573	289	218	507	19068	19012	38080
Barcelonès	1094185	1194669	2288854	7798	5485	13283	1101983	1200154	2302137
Berguedà	18742	19681	38423	314	228	542	19056	19909	38965
Cerdanya	6241	6025	12266	68	62	130	6309	6087	12396
Conca de Barberà	8742	8940	17682	170	149	319	8912	9089	18001
Garraf	37391	38875	76266	467	182	649	37858	39057	76915
Garrigues	9334	9274	18608	397	424	821	9731	9698	19429
Garrotxa	22209	23410	45619	235	206	441	22444	23616	46060
Gironès	61163	63935	125098	436	341	777	61599	64276	125875
Maresme	143097	148838	291935	714	454	1168	143811	149292	293103
Montsia	26593	26995	53588	431	288	719	27024	27283	54307
Noguera	17001	16892	33893	449	440	889	17450	17332	34782
Osona	57043	59565	116608	484	350	834	57527	59915	117442
Pallars Jussà	5942	5952	11894	471	495	966	6413	6447	12860
Pallars Sobirà	2580	2356	4936	234	248	482	2814	2604	5418
Pla d'Urgell	13899	14166	28065	380	357	737	14279	14523	28802
Pla de l'Estany	10354	10585	20939	84	49	133	10438	10634	21072
Priorat	4377	4462	8839	329	307	636	4706	4769	9475
Ribera d'Ebre	11147	11218	22365	348	342	690	11495	11560	23055
Ripollès	13225	13582	26807	183	177	360	13408	13759	27167
Segarra	8273	8320	16593	209	238	447	8482	8558	17040
Segrià	78913	81298	160211	1489	1204	2693	80402	82502	162904
Selva	48965	48364	97329	550	376	926	49515	48740	98255
Solsonès	5356	5167	10523	148	121	269	5504	5288	10792
Tarragonès	75882	78158	154040	1152	689	1841	77034	78847	155881
Terra Alta	6298	6130	12428	277	240	517	6575	6370	12945
Urgell	14136	14375	28511	613	665	1278	14749	15040	29789
Val d'Aran	2951	2850	5801	176	207	383	3127	3057	6184
Vallès Occidental	318039	327723	645762	2618	1319	3937	320657	329042	649699
Vallès Oriental	130012	131271	261283	867	363	1230	130879	131634	262513
<b>Catalunya</b>	<b>2933325</b>	<b>3076010</b>	<b>6009335</b>	<b>29617</b>	<b>20542</b>	<b>50159</b>	<b>2962942</b>	<b>3096552</b>	<b>6059494</b>

Població comarcal 1991



Font: Institut d'Estadística de Catalunya

La elección de la muestra ha sido realizada al azar evitando la existencia de parentesco, al menos de primer o segundo grado, entre los individuos que la componen. No se ha valorado ningún otro factor como la edad o el sexo de estos individuos ya que estos parámetros no influyen en el resultado.

En el caso del minisatélite D1S80 la muestra se compone de 425 individuos de los que:

-224 son padres y madres correspondientes a estudios sobre la paternidad de los que se han descartado los hijos y se conoce la no existencia de relación de parentesco entre los progenitores.

-183 pertenecen al colectivo de profesores, personal de administración y servicios y becarios de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

-18 son individuos presuntamente implicados en delitos y son muestras proporcionadas por la Sección de la Policía Científica de la DGP de Barcelona, y en otros casos son muestras judiciales generalmente remitidas por médicos forenses.

Para el marcador 3'Apo B se han estudiado 308 individuos de los que:

-213 corresponden a los progenitores de los estudios de investigación biológica de la paternidad.

-84 pertenecientes al grupo de empleados de la Facultad de Medicina, comentados en el apartado anterior.

-11 son individuos implicados en algún delito, ya sean víctimas o presuntos agresores.

En el caso del minisatélite YNZ22 se ha hecho un estudio de 326 individuos, de los cuales:

-220 son progenitores de los estudios de investigación de la paternidad.

-85 son empleados de la Facultad de Medicina.

-21 son individuos implicados en algún delito, ya sean víctimas o presuntos agresores.

### 3.2. MATERIAL

#### 3.2.1.-MATERIAL DE EXTRACCION DE ADN

##### Material Fungible

- Jeringuillas de 10 ml. "ICO-Steril",cono Luer.
- Agujas estériles 0.9x40 m/m "ICO-Steril",cono Luer.
- Microtubos de 1.5 ml."Eppendorf".
- Tubos corning de 50 ml."Afora".
- Pipetas pasteur.
- Puntas de pipeta:
  - Gilson: P-200
  - P-1000
- Parafilm.
- Cloroformo "Scharlau".
- Fenol "IBI".
- Proteinasa K "Boehringer Mannheim".
- Etanol "Merck".
- Acetato Amónico "Merck".
- Histopaque 1119 "Sigma".
- Ficoll Paque "Pharmacia".
- EDTA Na2 "Merck".
- SDS "Bio-Rad".
- 8-Hidroxiquinoleina "Merck".
- Tris-ClH "Boehringer".
- β-Mercaptoetanol "Fluka".
- Chelex-100 "Bio-Rad".

Material No Fungible

- Vortex "IKA-WERK".
- Vortex "Heidolph".
- Baño "Selecta" mod.Tem-Bloc.
- Baño "Selecta" mod.Tectron.
- Vibromático "Selecta" mod.384.
- Microfuga "BHG-Hermle" mod.Z-230 M, con cabezal de 12 tubos.
- Centrifuga "BHG-Hermle" mod.Z-320, con cabezal de 4 tubos.
- Centrifuga "Selecta" mod.P-4500 r.p.m., con cabezal de 6 tubos de 10 ml.
- Placa calefactora con magnetoagitador "SBS" mod.A-60.
- Esterilizador poupinel
- Autoclave "Selecta" mod. Autotester-G.
- Espectofotómetro UV-Vis de red de diodos "Hewlett-Packard" mod.8452-A.
- Cubetas de cuarzo para el espectofotómetro UV-Vis "Hellma".
- Desmineralizador "Intraser".
- Picadora "Moulinex".
- Microondas "Moulinex" mod.FM-1210.
- Máquina de hielo seco portátil "Carbueros Metálicos".
- DNA-Speed Vacc "Savant" mod.DNA-100.
- Frigorífico "Ignis".
- Congelador "Philips".
- Congelador "Liebherr".

- Cronómetro "Smiths".
- Cronómetro "Jumbo".
- Micropipetas "Gilson" mod.Pipetman: P-20
  - P-200
  - P-1000
  - P-5000
- Macropipeta "Nichiryo" mod.3100 de 1-5 ml.
- Macropipeta "Nichiryo" mod.Justor 1100 de 1 ml.
- Probetas "Afora":
  - 2 l.
  - 1 l.
  - 250 ml.
  - 100 ml.
  - 50 ml.
  - 25 ml.
  - 10 ml.
- Vasos de precipitados "Afora":
  - 2 l.
  - 1 l.
  - 500 ml.
  - 250 ml.
  - 100 ml.
  - 50 ml.
  - 25 ml.
- Destilador de agua "Pobel" de 2-4 l/h.
- Gradillas para tubos eppendorf "Kartell" de 20 y de 100 tubos.
- Gradillas para tubos eppendorf "Gri-Cel" de 50 tubos.

### 3.2.2.-MATERIAL DE AMPLIFICACION

#### Material Fungible

- Puntas de pipeta "Gilson": P-10  
P-200
- Microtubos de 0.5 ml. "Eppendorf"
- Cloruro Magnésico "Cetus".
- Aceite Mineral "Cetus".
- AmpliTaQ DNA-polymerase "Cetus"  
"Promega".
- AmpliTaQ Stoffel Fragment "Cetus".
- Primers 3' ApoB "Genset" y "Isogen".
- Primers YNZ22 "Genset", "Isogen" y "Pharmacia".
- Buffer x10 "Promega"  
"Cetus".
- dTTP "Promega"  
"Cetus".
- dGTP "Promega"  
"Cetus".
- dATP "Promega"  
"Cetus".
- dCTP "Promega"  
"Cetus".

Material no Fungible

-DNA Termal Cycler "Perkin-Elmer" (Fig.4).

-Micropipetas "Gilson" mod. Pipetman P-2

P-20

P-100.

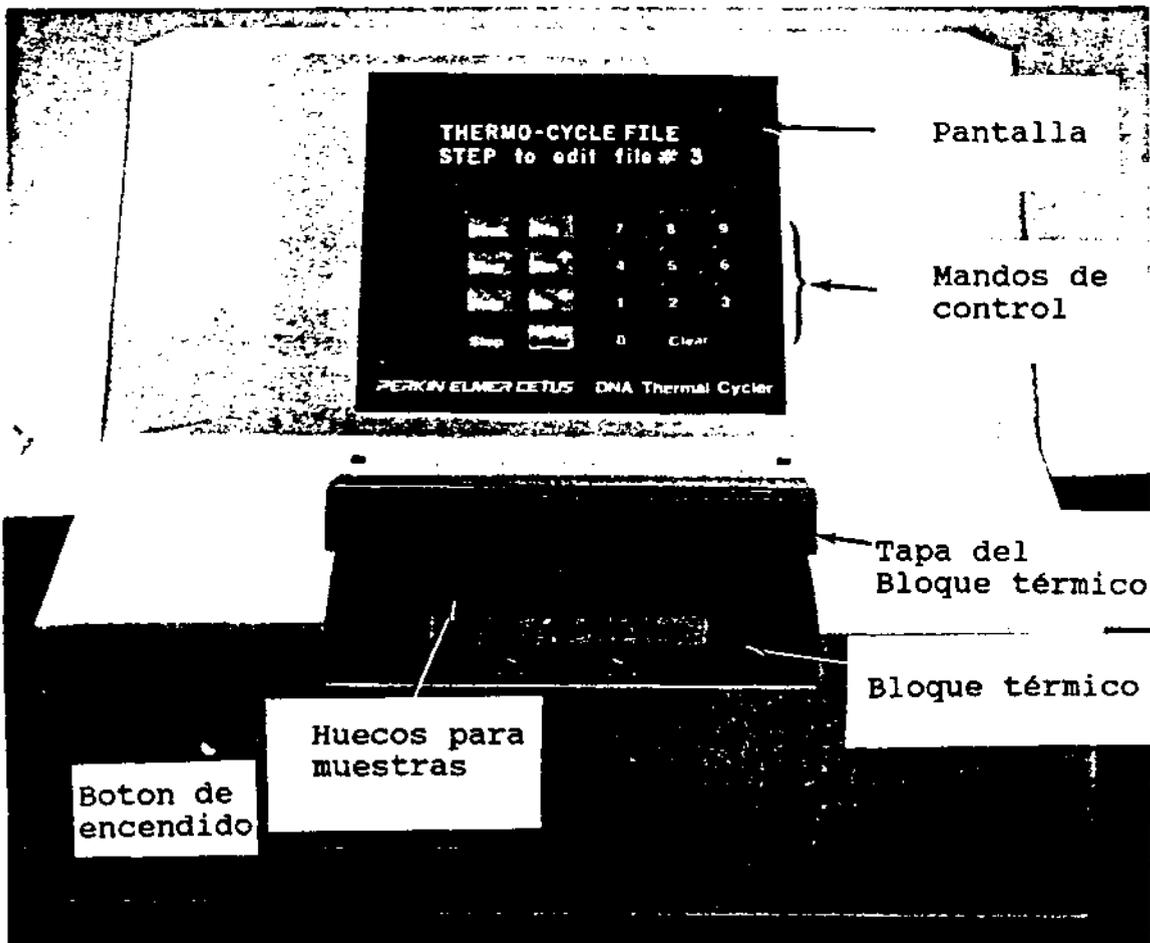


Fig.4. Termociclador automático utilizado para la elaboración de esta tesis.

3.2.3.-MATERIAL POST-AMPLIFICACION Y DE LECTURA  
FENOTIPICA

Material Fungible

- Microtubos de 1.5 ml."Eppendorf"
- Agarosa: -Standard Low- $m_r$  "Bio-Rad"
  - Low melt "FMC"
  - NuSieve GTG "FMC"
  - Sea-Kem GTG "FMC".
- Bromuro de Etidio "Merck"
- Azul de Bromofenol "Merk".
- Na EDTA "Merck".
- Ficoll 400 "Pharmacia".
- Xilen Cianol "Fluka".
- Tris 2M "Merck".
- Na<sub>2</sub> EDTA "Merck".
- Acetato Sódico "Merck".
- Acido Acético Glacial "Scharlau".
- Ladder 100 "Pharmacia".
- Geles ultradelgados de poliacrilamida pH 10-15 y pH 8-25 "Pharmacia".
- PhastGel. SDS Buffer Strips "Pharmacia"
- Metanol "Merck".
- Etanol "Merck".
- Glutaraldehido "Merck".
- Nitrato de Plata 0.4% "Pharmacia".
- Formaldehido 2% "Pharmacia".



-Campana mod. DS H-11  
mod. DS H-6.

-Macropipetas "Nichiryo" mod.3100 de 1-5 ml.  
mod.Justor 1100 de 1 ml.

-Micropipetas "Gilson" mod. Pipetman P-10.

### **3.2.5.-MATERIAL PARA EVITAR LA CONTAMINACION DE LA MUESTRA**

-Puntas de pipeta, con filtro:

Gilson: P-20  
P-100

-Lámparas de luz UV.

-HCl 1 M. "Merck".

### **3.2.6.-MATERIAL DE PROCESAMIENTO DE DATOS**

-Ordenador "Amstrad" mod.PC-2086.

-Impresora "Hewlett-Packard" mod.Deskjet 510.

### 3.3. METODOS

#### 3.3.1.RECOGIDA DE MUESTRAS

Para la realización de esta tesis se ha partido de muestras biológicas de distintos tipos y que, según la fuente de obtención, se encuentran en condiciones físicas distintas.

Cada una de las muestras analizadas requiere un proceso de recogida determinado:

-Sangre total no coagulada: obtenida por punción en vena y conservada en un tubo tipo Vacutainer-TM con algún tipo de anticoagulante, como por ejemplo EDTA-K<sub>3</sub>.

-Sangre total sin anticoagulantes: colocada directamente en un tubo eppendorf de 1.5 ml, y que se utiliza en caso de no poder disponer de linfocitos de los individuos que queremos estudiar.

-Manchas de sangre u otro fluido corporal: como vestigios biológicos recogidos como evidencias de una acción violenta en la que se intenta identificar al posible responsable u obtener más información del suceso. El estado de las manchas es distinto según el tiempo que haya transcurrido y el material sobre el que han caído. Si la mancha está seca y el soporte es

poroso, se recortará éste alrededor de la zona manchada y se colocará en un tubo eppendorf. Si, por el contrario, el soporte no es absorbente, se rascará la mancha y se recogerá en un tubo. Puede darse el caso de que las manchas no se hayan secado todavía, y si el soporte no es poroso se podrá recoger con una pipeta.

Se ha realizado una pequeña colección de manchas de sangre con distintos períodos de envejecimiento, y sometidas a condiciones ambientales: a 37°C, a 4°C, a la temperatura ambiental del laboratorio y a las distintas condiciones climáticas de la calle.

-Cabellos: el pelo se arranca de raíz, utilizando material estéril, y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 ml de modo que la raíz quede en el fondo cortándolo aproximadamente a 1 cm de la raíz.

-Tejidos, que pueden ser desde restos abortivos a cualquier sección corporal, como piel, músculo, tejido conectivo, etc.

Una vez obtenidas las muestras se pueden almacenar en el congelador hasta su posterior utilización para la extracción del ADN genómico.

### 3.3.2. EXTRACCION DE ADN

#### METODO PHENOL-CLOROFORMO

##### 1. Obtención de linfocitos a partir de sangre total.

Se parte de sangre total tratada con algún anticoagulante como la heparina, EDTA K<sub>3</sub> o desfibrinada, y se sigue el siguiente protocolo (Sigma).

1.-Se diluye la sangre, en proporción 1:1, con Solución Final y se mezcla. Esta solución se prepara de la siguiente manera: Se preparan dos soluciones distintas A y B que se mezclarán en una relación de 1 volumen de A y 9 volúmenes de B y se esterilizarán por filtración;

##### Solución A:

- D-Glucosa anhidra 0.1% (1 g/l)
- CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 5x10<sup>-5</sup>M (7.4 mg/l)
- MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 9.8x10<sup>-4</sup>M (199.2 mg/l)
- KCl 5.4x10<sup>-3</sup>M (402.6 mg/l)
- Tris 0.145 M (17.56 g/l)

##### Solución B:

- NaCl 0.14 M (8.19 g/l)

2.-En un tubo falcon de 50 ml. se pone Ficoll Paque (TM) en una cantidad de 3/4 partes del volumen total de sangre diluida. Sin embargo, también se puede utilizar Histopaque (TM), en cuyo caso no sólo se podrán extraer

los linfocitos, sino también el resto de leucocitos. De este modo con la misma muestra se obtiene más material.

En este caso la relación sangre diluida/Histopaque es de 1:1.

3.-Se va tirando lenta y suavemente la sangre encima del Histopaque procurando que las dos fases no se mezclen.

4.-Se centrifuga a 1500 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente.

5.-Se elimina la capa superior mediante una pipeta Pasteur y se recogen los linfocitos, que han quedado en la interfase, para ponerlos en otro tubo y para ello se utiliza una pipeta Pasteur estéril cuyo extremo se habrá doblado en un ángulo de aproximadamente 90° por la parte del capilar para recoger mejor el material de la interfase. Se intenta no coger ni Histopaque ni sobrenadante.

6.-Se lavan los linfocitos diluyéndolos en 3 volúmenes de Solución Final,

7.-Centrifugar a aproximadamente 1000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente.

8.-Se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet con otros 3 volúmenes de Solución final.

9.-Centrifugar de nuevo a 700 rpm unos 20 minutos.

10.-Se repiten las etapas 8 y 9.

El sedimento que se obtiene mediante este proceso son leucocitos.

Para realizar este proceso se utiliza material estéril.

Una vez obtenidos los leucocitos se procede a la extracción del ADN o bien se almacenan las muestras en el congelador.

**2.Obtención de ADN a partir de leucocitos u otro material celular homogeneizado.**

Se siguen los protocolos de "Current Protocols in Molecular Biology" (Auxbel FM. y col. 1987), aunque con pequeñas modificaciones.

1.-Lisis celular: Para ello hay que poner, en el tubo donde se encuentra el precipitado de linfocitos, 500  $\mu$ l de tampón de lisis y 2.5  $\mu$ l de proteinasa K, aunque en ocasiones se ha trabajado duplicando la cantidad de 5  $\mu$ l de proteinasa K. El tampón de lisis se prepara con:

100 mM NaCl

10 mM Tris

25 mM EDTA (pH 8.0)

se autoclava y se añade posteriormente:

0.5% SDS

se puede conservar a temperatura ambiente.

Se pone en tubos eppendorf y se realiza la lisis mecánica mediante el paso por la aguja de una jeringuilla de la que se hace entrar y salir el contenido del tubo en repetidas ocasiones, procurando no hacer mucha espuma.

Si se trata de algún material biológico, como restos abortivos, tejidos u órganos, se tritura previamente en un mortero de porcelana añadiendo nitrógeno líquido y se procede a la lisis mecánica anteriormente citada.

Se incuban los tubos eppendorf durante aproximadamente una hora a 50-56°C.

2.-Extracción fenólica: Se ponen 250  $\mu$ l de fenol saturado y 250  $\mu$ l de cloroformo (o bien 500  $\mu$ l de solución fenol-cloroformo-isoamyl-alcohol), y se agita exhaustivamente durante 5 minutos. Se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Agitar 5 minutos más y centrifugar a alta velocidad durante 10 minutos.

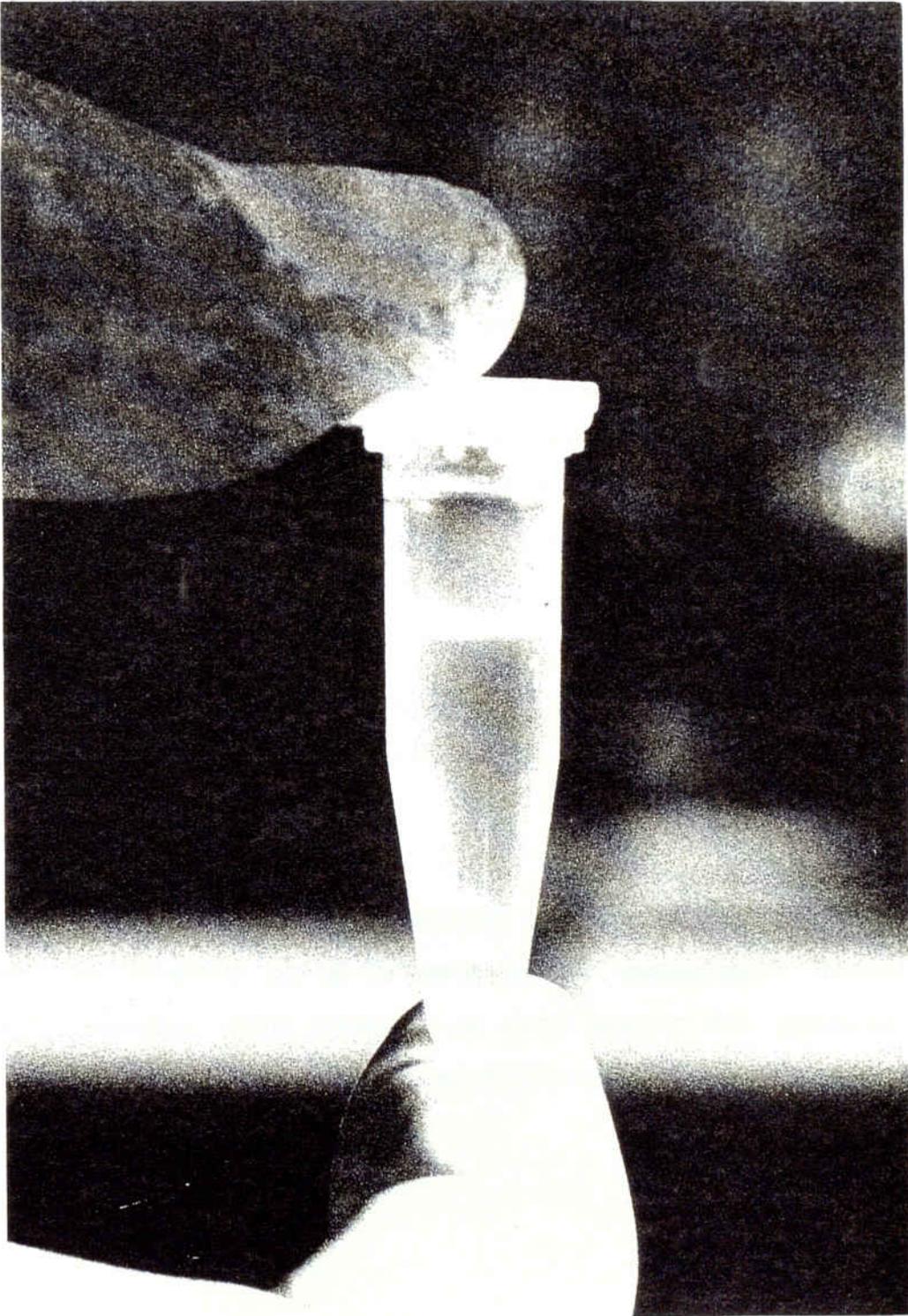


Fig.5. ADN precipitado con etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Quedan dos fases de las que la parte superior contiene

el ADN. Separar la fase superior y ponerla en otro eppendorf procurando no coger la interfase.

3.-Precipitación: Se pone la mitad del volumen que tenemos ( $\approx 500 \mu\text{l}$ ) de Acetato Amónico 7.5 M ( $250 \mu\text{l}$ ). También hemos utilizado en algún caso Acetato Sódico 3 M añadiendo en este caso la décima parte del volumen inicial ( $50 \mu\text{l}$ ).

Agitar bien y añadir dos volúmenes de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (1.5 ml.). Agitar exhaustivamente hasta observar un precipitado blanco que es el ADN (Fig.5).

Se deja 20 minutos a  $-80^{\circ}\text{C}$  , o 1 minuto en nitrógeno líquido o bien en el congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) toda la noche.

Centrifugar durante 15 minutos a alta velocidad y a  $4^{\circ}\text{C}$ , aunque en nuestro caso, por no disponer de centrífuga refrigerada, lo hemos hecho a temperatura ambiente y ello no parece afectar, ni cualitativa ni cuantitativamente, de forma sensible al resultado. Queda un precipitado y se decanta el líquido. Se añade 1 ml. de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para eliminar los residuos de sales, y se agita suavemente para posteriormente centrifugar a alta velocidad 15 minutos.

Se decanta el líquido y se centrifuga en una centrífuga de vacío durante 5 minutos para secar el pellet.

Se disuelve con la cantidad necesaria de  $\text{ddH}_2\text{O}$ , y una vez hecho esto lo guardamos en el congelador hasta su utilización, pero llegado a este punto del proceso la muestra puede estar perfectamente a temperatura ambiente.

### 3. Obtención de ADN a partir de manchas de esperma

Se han ensayado con distintos protocolos, pero se han obtenido buenos resultados con los de la casa comercial Promega: "Gene Print<sup>TM</sup> Data Typing" con algunas modificaciones.

Para la manipulación de las muestras es muy importante trabajar con materiales completamente estériles.

1.-Se recorta el soporte en el que se encuentran las manchas, si es absorbente, y se introduce en un tubo eppendorf. Si el soporte no es absorbente se rasca la mancha recogiendo la muestra e introduciéndola en un tubo. Podemos observar, previamente, la localización de la mancha bajo la luz de Wood.

2.-Se incuba, agitándose, durante toda la noche con 1ml. de tampón de lisis preparado con:

- 400  $\mu$ l de Tris-EDTA-NaCl
- 250  $\mu$ l de Sarkosyl 10%
- 100  $\mu$ l de Ditiotreitól 0.39M (DTT)
- 230  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O

3.-Al día siguiente se añaden 20  $\mu$ l de proteinasa K y se realiza una extracción fenólica del mismo modo que para los leucocitos. Se separa la fase acuosa, procurando no

coger la interfase, y se ajusta la concentración de NaCl a más de 100 mM añadiendo 10  $\mu$ l de NaCl 5 M.

4.-Se precipita el ADN con 1 ml de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se agita, y se deja durante media hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

5.-Centrifugamos durante 15 minutos y decantamos el etanol. Lavamos el precipitado con 1 ml de etanol 70% y se centrifuga 5 minutos.

6.-Se elimina el etanol, con una micropipeta y se acaba de secar en una centrifuga de vacío durante 5 minutos.

7.-Finalmente se redisuelve con ddH<sub>2</sub>O.

#### **4. Obtención de ADN a partir de muestras vaginales**

Se sigue el protocolo de Promega "Gene Print<sup>TM</sup> Data Typing" con ligeras modificaciones.

En este caso tenemos una torunda-escobillón (hisopo), con la que se habrá realizado el frotis vaginal, con células femeninas procedentes de la pared vaginal y células espermáticas. En algún caso se tiene como material suero fisiológico procedente de un lavado vaginal, y en esta situación se procede a la centrifugación del mismo para recoger el material celular.

Separaremos el algodón del aplicador de la torunda y lo colocaremos dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Incubamos con 450  $\mu$ l. de tampón HEPES preparado con:

- HEPES 10 mM.
- NaCl 150 mM.
- ddH<sub>2</sub>O
- Ajustando el pH a 7.5 con NaOH

Añadimos 50  $\mu$ l. de Sarkosyl 20% y agitamos durante toda la noche.

Colocamos el algodón en un tubo de 0.5 ml., que previamente habremos agujereado en la parte inferior e introducido dentro de otro de 1.5ml., y centrifugamos durante 3 minutos para obtener de este modo las células y fluido atrapados en la torunda.

Eliminamos el sobrenadante y volvemos a colocar el algodón dentro de tubo. Añadiremos 500  $\mu$ l de tampón de lisis y lo agitamos para que se mezcle bien, incubándolo durante 2 horas a 37°C.

Colocamos de nuevo el algodón en otro tubo de 0.5 ml, con el fondo previamente agujereado y lo centrifugamos durante 5 minutos a alta velocidad.

Tenemos en este momento dos fases:

1. la parte inferior o pellet, que es donde están las células masculinas, a la que añadimos:

-200  $\mu$ l TNE: Tris-base 10 mM  
NaCl 100 mM  
Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O 1 mM  
Ajustar a pH 8.0 con NaOH

-125  $\mu$ l Sarkosyl 10%  
- 50  $\mu$ l DTT 0.39 M  
-115  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O  
- 10  $\mu$ l proteinasa K (20mg/ml)

y la incubamos durante 2 horas a 37°C.

La fracción masculina necesita la presencia del DDT para activar la acción de la proteinasa K ya que el núcleo de los espermatozoides humanos esta fuertemente protegido por una membrana muy resistente.

2. el sobrenadante que corresponde a la fracción femenina.

Tanto una como la otra se somete a una extracción fenólica como en el caso de los linfocitos.

## 5. Cuantificación del ADN obtenido

Se realiza mediante un espectrofotómetro UV-VIS de red de diodos. Utilizamos las longitudes de onda de 260 (para el ADN) y 280 (para las proteínas en el caso de haberlas, aunque la presencia de éstas puede interferir en la pureza de la muestra).?

4.1.-Se hace la lectura de la densidad óptica (DO) de 1 ml de ddH<sub>2</sub>O (en este caso porque se dispone de cubetas de 1ml).

4.2.-Lectura de una cantidad de ADN entre 2 y 10µl redissuelto, según la cantidad de la que disponemos, añadidos al ddH<sub>2</sub>O.

4.3.-Se comprueba que la primera lectura ha sido correcta y que el ADN se encuentra disuelto de forma homogénea añadiendo por segunda vez la cantidad inicial de ADN y efectuando la lectura que ha de ser el doble de la anterior.

4.4.-Como sabemos que la absorción de 1 DO corresponde a una cantidad de 50 µg de ADN la concentración del ADN la calcularemos aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{DO_{260} * 50}{\text{cantidad de ADN redissuelto}} = [\text{ADN}] \mu\text{g}/\mu\text{l}.$$

Una concentración entre 0.2 y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  es la idónea para almacenar el ADN genómico, que después se resuspenderá según el polimorfismo que se vaya a estudiar.

4.5.-Para saber el índice de contaminación proteica, se calcula la proporción:  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$  . Este índice tendrá un valor menor cuanto mayor sea la contaminación por proteínas, de modo que este cociente tiene un valor óptimo cuando el resultado oscila entre 1.8-2.

METODO DE EXTRACCION MEDIANTE RESINAS QUELANTES  
"CHELEX"™

El Chelex es una resina quelante con una elevada afinidad por los iones metálicos polivalentes. Esta formado por copolímeros de estireno y divinilbenceno que contienen iones iminodiacetato y éstos actuan como grupos quelantes.

Se ha postulado que la presencia de Chelex durante la destrucción celular térmica por ebullición de la muestra, evita la degradación del ADN ya que actúa quelando los iones metálicos que catalizan la rotura del ADN sometido a altas temperaturas en soluciones de baja fuerza iónica.

Con este proceso obtenemos el ADN de la muestra desnaturalizada, sin purificarlo, ni aislarlo de todos los restos celulares destruidos que permanecen en suspensión pero inactivos (Walsh PS. y col. 1991).

## 6. Método rápido de obtención de ADN a partir de sangre total

Es importante que la sangre no se haya tratado con ningún anticoagulante como el EDTA, ya que es un quelante del  $Mg^{2+}$  y podría alterar la solución óptima de actuación de la polimerasa, con lo que podría inhibirse el proceso de amplificación.

1.-Se pone en un eppendorf 1 ml de ddH<sub>2</sub>O y unos 3  $\mu$ l de sangre total. Se agita y se deja en reposo a temperatura ambiente durante unos 15-30 minutos, agitándolo de vez en cuando.

2.-Centrifugamos durante 2 o 3 minutos a alta velocidad y eliminamos el sobrenadante, excepto 20 o 30  $\mu$ l.

3.-Añadimos, hasta tener un volumen total de 200  $\mu$ l, 5% Chelex

4.-Incubamos a 56°C durante 15-30 minutos y posteriormente realizamos un vortex durante 5-10 segundos.

5.-Incubamos durante 8 minutos en agua hirviendo y repetimos la agitación con vortex de 5-10 segundos.

6.-Centrifugamos a alta velocidad durante 2 o 3 minutos y ya se puede someter al proceso de amplificación. Para ello utilizaremos la cantidad de 20  $\mu$ l del sobrenadante, para un volumen de reacción de 50-100  $\mu$ l. En caso de no ser utilizado inmediatamente, se puede congelar hasta el momento de ser amplificado en cuyo caso se agitará con vortex de 5-10 segundos y se centrifugará a alta velocidad durante 2 o 3 minutos.

**7.Método rápido de obtención de ADN a partir de manchas de sangre.**

En este caso el procedimiento es el mismo que el anterior, la única diferencia es que el soporte de la mancha se recorta en un trozo pequeño y se diluye con 1ml de ddH<sub>2</sub>O para agitarlo durante aproximadamente una hora (depende de la antigüedad de la muestra y lo seca que esté). El resto del protocolo es igual a partir del paso 2 del apartado anterior.

**8.Obtención de ADN a partir de cabello.**

Para obtener ADN a partir de cabellos es imprescindible que éstos sean arrancados y no cortados para obtener la raíz, que es donde se encuentran las células del bulbo.

Incubamos el pelo con 200  $\mu$ l de Chelex al 5% de 6 a 8 horas o toda la noche a 56°C, procurando que la raíz quede sumergida en el Chelex. Se agita durante unos 5 a 10 segundos en el vortex y se incuba en agua hirviendo durante 8 minutos.

Volvemos a agitar con el vortex durante 5-10 segundos y finalmente centrifugamos a alta velocidad durante 2 ó 3 minutos. De este modo tenemos en el sobrenadante el ADN preparado para la amplificación.

#### **9.Método rápido de extracción del ADN a partir de muestras vaginales.**

Separamos el algodón de la torunda-escobillón, con la que se ha realizado el frotis vaginal, y lo troceamos con material completamente estéril. Introducimos la muestra en un tubo de 1.5 ml y lo incubamos con 1 ml de ddH<sub>2</sub>O durante 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación agitamos durante 2 minutos con el "vortex" y separamos el algodón, dejándolo en otro tubo a parte. Centrifugamos durante 1 minuto a alta velocidad y a temperatura ambiente.

Procurando no tocar el "pellet", eliminamos el sobrenadante dejando sólo 50  $\mu$ l, o el doble del volumen del "pellet" en el caso de ser éste muy grande, y lo resuspendemos. En este "pellet" hay mezcladas células epiteliales femeninas y células espermáticas.

Añadimos ddH<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 200  $\mu$ l y 2 $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) y agitamos exhaustivamente.

Incubamos a 37°C durante 1 hora para lisar las células epiteliales, pero no más de 2 horas ya que se lisarían las células espermáticas.

Centrifugamos a alta velocidad durante 5 minutos y separamos en dos tubos distintos:

Tubo 1 (con el ADN de las células epiteliales femeninas): en el que ponemos 150  $\mu$ l del sobrenadante y 50  $\mu$ l de Chelex 20%

Tubo 2 (con las células espermáticas que se encuentran en el "pellet"): lavamos el "pellet" resuspendiéndolo en 0.5 ml de tampón de lisis y agitamos con el "vortex". Centrifugamos durante 5 minutos a alta velocidad y descartamos el sobrenadante excepto 50  $\mu$ l y repetimos estos últimos pasos una o dos veces. Resuspendemos de nuevo con 1ml ddH<sub>2</sub>O, agitamos y centrifugamos 5 minutos para descartar el sobrenadante

excepto 50  $\mu$ l a los que añadimos 150  $\mu$ l de Chelex 5%, 2 $\mu$ l de proteinasa K (10 mg/ml) y 7  $\mu$ l de Ditioneitol (1M). Incubamos a 37°C entre 30 y 1 hora.

Agitamos, con el "vortex", los dos tubos de 5 a 10 segundos, y centrifugamos de 10 a 20 segundos a alta velocidad.

Incubamos durante 8 minutos en un baño de agua hirviendo.

Agitamos con "vortex" de 5 a 10 segundos y centrifugamos de 2 a 3 minutos a alta velocidad y a temperatura ambiente.

En este momento las muestras están preparadas para ser amplificadas. Pero si se guardan, ya sea en el congelador o a 2-8°C, hemos de repetir el último proceso antes de utilizarlas.

### 3.3.3. COMPROBACION DE LA EXTRACCION

Podemos comprobar que la extracción de ADN ha sido correcta observando mediante una electroforesis en un gel submarino de agarosa y bromuro de etidio, la banda del ADN-genómico. Si el material se ha degradado veremos un "smear". Si existe contaminación proteica veremos una señal de fluorescencia blanca en los pozos de carga.

La agarosa es adecuada para separar fragmentos de ADN desde unos cientos pares de bases hasta 20 kilobases, y en este caso es preferible a la poliacrilamida que es más útil para fragmentos más pequeños.

Las moléculas de ADN están cargadas negativamente y en un campo eléctrico migran a través del gel con una velocidad distinta en función de su tamaño.

Hacemos un gel del 0.8 o 1% de agarosa:

0.4 ó 0.5 gr agarosa

50 ml de TAE\*1 con Bromuro de Etidio

TAE\*1: 40 ml TAE\*50

enrasado a 2 l con ddH<sub>2</sub>O

70 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

TAE\*50: 242 gr Tris base  
37.2 gr Na<sub>2</sub>EDTA\*2H<sub>2</sub>O  
57.1 ml Acido Acético Glacial  
enrasar hasta 1 l con ddH<sub>2</sub>O

Calentamos en el microondas en dos tandas de 3 minutos hasta que los "granos" de la agarosa se disuelven y la solución es homogénea y transparente. Dejamos enfriar un poco antes de vertirlo en la bandeja de electroforesis, que habremos sellado previamente con cinta adhesiva. Ponemos un peine con los pozos que deseemos y lo dejamos una media hora hasta que se solidifique. Este método es el que se emplea para las cubetas Bio-Rad (TM), otras marcas emplean métodos distintos pero con el mismo fundamento.

Quitamos el peine y la cinta adhesiva y colocamos la bandeja con el gel dentro de la cubeta de electroforesis que, habremos llenado previamente con TAE\*1 hasta cubrir el gel. En ocasiones se ha trabajado con TBE en lugar de TAE y los resultados obtenidos han sido similares.

Llenamos los pocillos con el ADN genómico que habremos mezclado previamente con Colorante Standard \*10 en una proporción de 1/10 (por cada 10 µl de muestra 1µl de colorante).

Colorante Standard\*10:      -Ficoll 400 20%  
                                  -EDTA-Na<sub>2</sub> 0.1 M (pH 8)  
                                  -Azul de Bromofenol 0.25  
                                  -Xilen Cianol 0.25%

Cerramos la cubeta con la tapa y aplicamos un voltaje de  $\pm 60$  voltios durante aproximadamente una hora. En general se consigue una mejor resolución de los fragmentos grandes con electroforesis largas a voltajes bajos, sin embargo, con estas condiciones los fragmentos pequeños difunden más rápidamente (Sealey PG. y Southern EM. 1987) .

Podemos visualizar el gel mediante el transluminador de UV, puesto que contiene bromuro de etidio que es un colorante fluorescente que se intercala entre los pares de bases del ADN y permite su observación en presencia de luz ultravioleta. Es importante manipular los geles de agarosa y los tampones con precaución y medidas de seguridad, ya que el bromuro de etidio es altamente cancerígeno.

La banda de ADN genómico se encontrará muy cerca del pozo ya que debido a su gran tamaño migra poco.

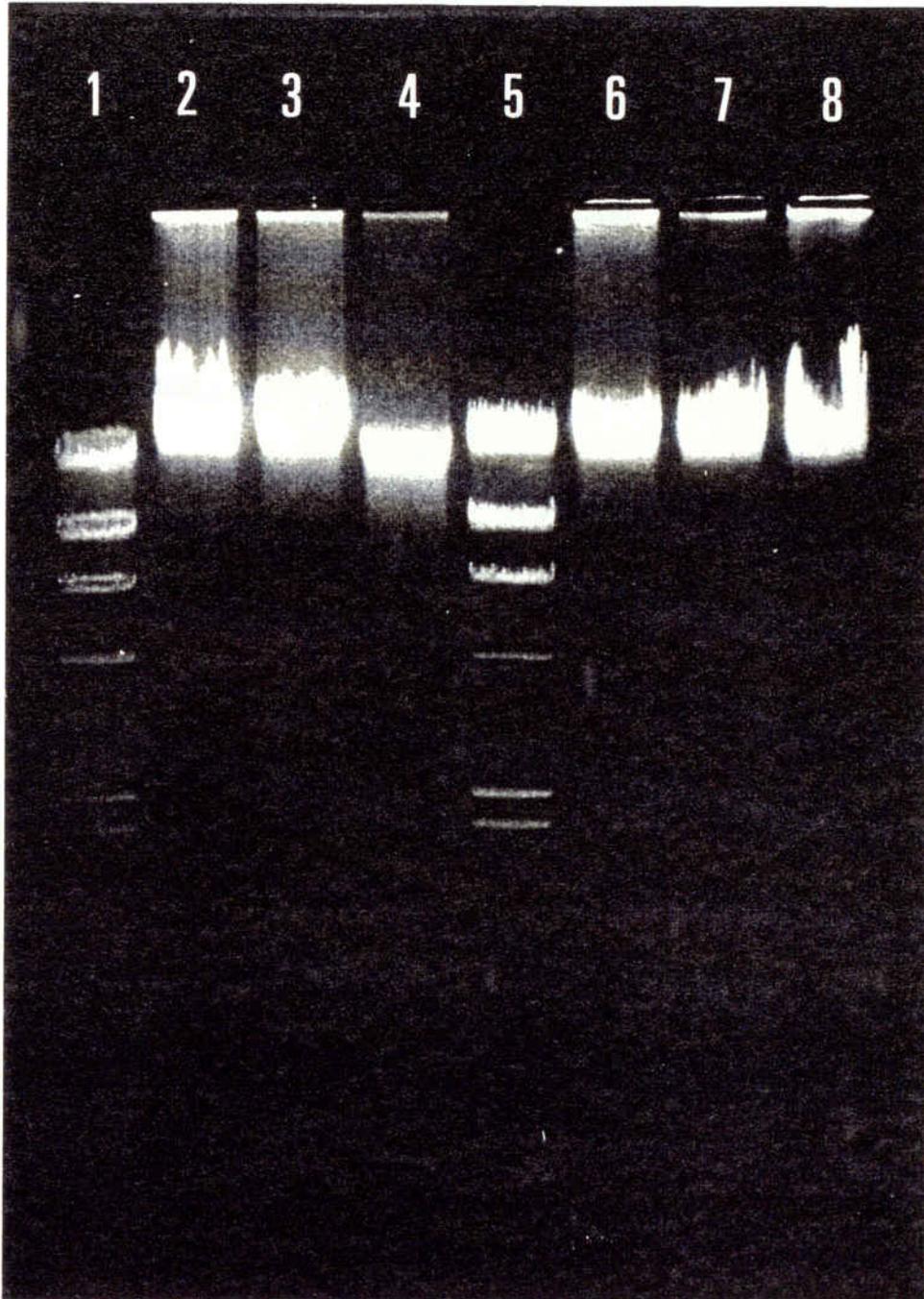


Fig.6. Electroforesis de distintas extracciones de ADN. En los carriles 1 y 5 hay un marcador de talla: "Ladder-100". El ADN del carril 4 es el que presenta menor grado de contaminación proteica y "smear".

### 3.3.4. METODO DE AMPLIFICACION

Durante éste proceso disponemos de material completamente estéril y específico para los productos que se utilizan en la fase pre-amplificación, para evitar posibles contaminaciones de productos ya amplificados.

1.-Amplificación de la región del cromosoma 17 correspondiente al minisatélite YNZ22 (Batanian JR. y col. 1990).

En un tubo eppendorf de 0.5 ml estéril preparamos una mezcla de reacción compuesta por:

-H<sub>2</sub>O bidestilada y estéril, en el volumen adecuado para que el total de la reacción sea de 25  $\mu$ l.

-2.5  $\mu$ l de 10xBuffer "Promega" formado por:

500 mM de KCl  
100 mM de Tris-HCl  
pH=8.8 a 25°C  
1% de Tritón X-100

-1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (la concentración final es 1mM)

-2  $\mu$ l de dNTPs "Promega" diluidos 10 veces de modo que las concentraciones de cada uno de los NTPs es 10 mM

-0.2  $\mu$ l de Primer 1 ( $\approx$ 200 ng)

-0.2  $\mu$ l de Primer 2 ( $\approx$ 200 ng)

-10-15 ng de ADN genómico

-0.25  $\mu$ l de ADN amplytaq de 2.5 unidades/ $\mu$ l

-una gota de aceite mineral, para evitar la evaporación de la mezcla de reacción durante la desnaturalización.

Según los protocolos consultados la ADN-Amplytaq se añade cuando se han inactivado las proteínas, al calentar a 95°C durante 5 minutos la reacción y se alcanzan los 80°C. Sin embargo, hemos podido comprobar que el resultado es el mismo si añadimos la polimerasa junto con los demás reactivos, antes de incorporar el aceite mineral. Ello es más práctico y disminuye el riesgo de contaminación del enzima y de las muestras.

Es muy importante para una amplificación óptima, que la concentración de primers y  $Mg_2Cl$  sea la adecuada ya que:

-Una concentración de  $Mg_2Cl$  demasiado baja reduce la eficiencia de amplificación, y demasiado alta, da lugar a productos inespecíficos.

-Si la concentración de primers es baja se origina poco o ningún producto de amplificación, y si es demasiado alta se forman productos no específicos además de los llamados primer-dimer, que no es más que la unión entre dos "primers" o regiones de los mismos que son complementarias. Generalmente las concentraciones de trabajo se encuentran entre 0.2-0.5  $\mu\text{M}$ .

-También las concentraciones de dNTPs han de estar equilibradas, ya que si algún dNTP se encuentra en distinta proporción que el resto tenderá a incorporarse de forma errónea.

Una vez preparada la mezcla de reacción se somete a un proceso de desnaturalización-unión-extensión específico para cada región a amplificar. En el caso del minisatélite YNZ22 el proceso de amplificación sigue un ciclo de temperaturas, para un termociclador "Perkin-Elmer" de:

95°C durante 5 minutos	┌
95°C durante 1 minuto	
60°C durante 1 minuto	x 34 ciclos
72°C durante 3 minutos	
	└
autoextensión de 10 segundos	
72°C durante 7 minutos	
mantenimiento a 4°C	

Finalmente, se realiza la separación electroforética o se almacena el producto en el congelador destinado exclusivamente a material ya amplificado, hasta su tipaje.

2.-Amplificación de la región del cromosoma 2 correspondiente al extremo 3' del gen de la apolipoproteína-B (Boerwinkle E. y col. 1989).

En este caso, del mismo modo que para el minisatélite YNZ22, es preciso preparar la solución de reacción en un tubo eppendorf estéril de 0.5 ml.

- H<sub>2</sub>O bidestilada y estéril, en la cantidad adecuada para que el volumen final sea de 50  $\mu$ l
- 5  $\mu$ l de 10xBuffer "Promega"
- 3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (la concentración final es 1.5 mM)
- 5  $\mu$ l de dNTPs "Promega" diluidos para que la concentración final de cada NTP sea 10mM
- 1.6  $\mu$ l de Primer 1 de 300 ng/ $\mu$ l ( $\approx$ 500 ng)
- 1.6  $\mu$ l de Primer 2 de 300 ng/ $\mu$ l ( $\approx$ 500 ng)
- 10-50 ng de ADN
- 0.3  $\mu$ l de ADN Amplytaq de 2-5 unidades/ $\mu$ l
- una gota de aceite mineral

---

Una vez preparada la reacción y sin dejar pasar mucho tiempo, ya que en este momento pueden darse amplificaciones inespecíficas, se somete a un ciclo de temperaturas de desnaturalización, unión y extensión específicas:

94°C durante 5 minutos

94°C durante 1 minuto

60°C durante 6 minutos

72°C durante 1 minuto

┌  
|  
| x 26 ciclos  
|  
└

60°C durante 10 minutos

mantenimiento a 4°C

**3.-Amplificación de la región del cromosoma 1 correspondiente al minisatélite D1S80 (Budowle B. y col. 1991).**

Se utiliza en este caso un Kit de amplificación de la casa comercial "Cetus" que proporciona la mezcla de reacción ya preparada en las concentraciones adecuadas.

Se emplean 20  $\mu$ l de mezcla de reacción para cada amplificación:

- 1xBuffer (10mM Tris-Cl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatina)
- 200μM de cada dNTP
- 1μM de cada primer (Kasai et al. 1990)
- 2.5 unidades de Amplitaq Cetus polimerasa

y se añaden 10 μl de MgCl<sub>2</sub> y 10 ng de ADN (20 μl de Chelex o de ADN en una concentración de 500ng/ml). El volumen final es de 50 μl. Finalmente se añade una gota de aceite mineral. Se ha trabajado con volúmenes finales de 25μl, lo que permite un ahorro considerable, y los resultados han sido buenos.

Por otro lado se han realizado amplificaciones de este VNTR de forma manual (Gené M. y col. 1993):

- H<sub>2</sub>O bidestilada y estéril, en la cantidad adecuada para que el volumen final sea de 25 μl
- 2.5 μl de 10xBuffer "Promega"
- 1 μl de MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM (la concentración final es 1mM)
- 2 μl de dNTPs "Promega" diluidos para que la concentración final de cada NTP sea 10mM
- 1 μl de Primer 1 (≈500 ng)
- 1 μl de Primer 2 (≈500 ng)
- 5 ng de ADN
- 0.2 μl de ADN Amplytaq de 2-5 unidades/μl
- una gota de aceite mineral

El proceso de amplificación consta del siguiente ciclo de temperaturas:

94°C durante 8 minutos	┌	
94°C durante 1 minuto		
65°C durante 1 minuto		x 30 ciclos
72°C durante 1 minuto		
	└	
mantenimiento a 4°C		

El producto de amplificación se puede almacenar a -20°C hasta su posterior tipaje.

### 3.3.5. DETERMINACION DE LOS DISTINTOS FENOTIPOS

#### 3.3.5.1. GELES DE POLIACRILAMIDA

**Electroforesis en geles miniatura de poliacrilamida y revelado con Nitrato de plata**

Se utilizan, en este caso, geles de poliacrilamida ultrafinos, que al ser sometidos a un voltaje elevado conducen la corriente con el mínimo calor desprendido y la mínima distancia para el transporte del mismo. Las cubetas de separación están termostatzadas y refrigeradas por elementos Peltier, y estas características de refrigeración hacen posible aumentar

la intensidad del campo y obtener buenos resultados en poco tiempo.

Distancias de separación cortas y elevadas intensidades de campo reducen el tiempo de separación sin perder el poder de resolución. Todo ello se realiza en un sistema integrado con un microprocesador que controla todas las condiciones, tanto las de separación como las de revelado.

El tamaño de los geles es de 50\*43\*0.45 mm y la concentración de poliacrilamida es de T=4 y C=3.

Tanto para el polimorfismo de YNZ-22 como el de 3'APO-B se probó este sistema de tipaje alélico, utilizando geles de poliacrilamida de rango de pH=10-15.

Las muestras ya amplificadas se prepararon con un 10% de colorante standard y fueron aplicadas sobre el gel con un aplicador de 8 muestras de 0.5  $\mu$ l cada una.

Las condiciones de la electroforesis fueron de 250 V, 10 mA, 3 W y una temperatura de 15°C hasta conseguir alcanzar 100 Vh.

Una vez separados los fragmentos de tamaño distinto se fija el gel, durante 5 minutos, con una solución, semejante a la de fijado de las proteínas, de:

30 gr sulfosalicílico

300 ml metanol

600 ml de ddH<sub>2</sub>

La tinción se realiza siguiendo el proceso siguiente:

2 minutos en Etanol 10% - Ac.acético 5% a 50°C

4 minutos en Etanol 10% - Ac.acético 5% a 50°C

6 minutos en Glutaraldehido 5% a 50°C

3 minutos en Etanol a 50°C

5 minutos en Etanol a 50°C

6 minutos y 30 segundos en Nitrato de plata

0.4% a 40°C

30 segundos en dH<sub>2</sub>O a 30°C

30 segundos en dH<sub>2</sub>O a 30°C

El revelado del gel se realiza en una cubeta a parte donde hay: 1 ml de Formaldehido 2%

150 ml Solución de Carbonato Sódico 2.5%

A fin de conservar el gel, se puede hacer un post-revelado: 2 minutos en Acido acético 5% a 50°C

3 minutos en Acido acético 10% y

Glicerol 5% a 50°C.

Existen métodos alternativos parecidos, cuyo fundamento es el mismo y las diferencias principales son el número total de baños y/o los tiempos.

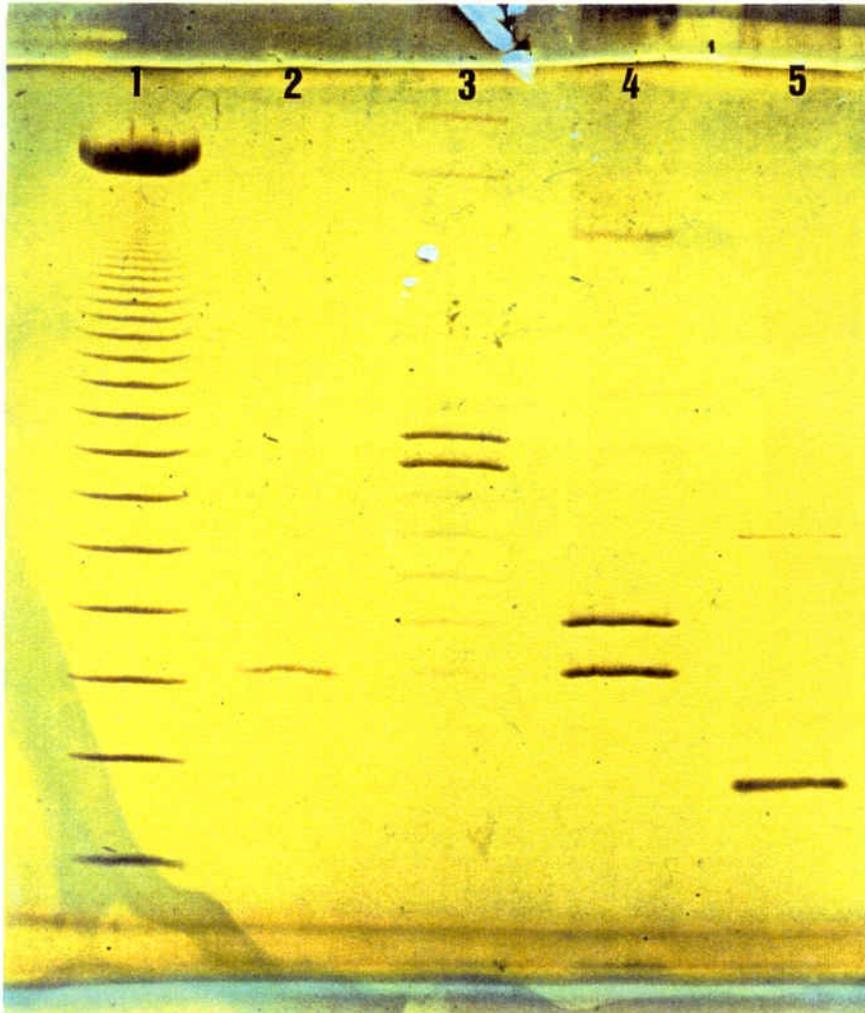


Fig.7. Electroforesis con geles miniatura de poliacrilamida de distintos fenotipos de YNZ22. En el extremo izquierdo se encuentra el marcador de talla "Ladder-100", y de izquierda a derecha los fenotipos son: 3-15;9-10;3-4;1-6.

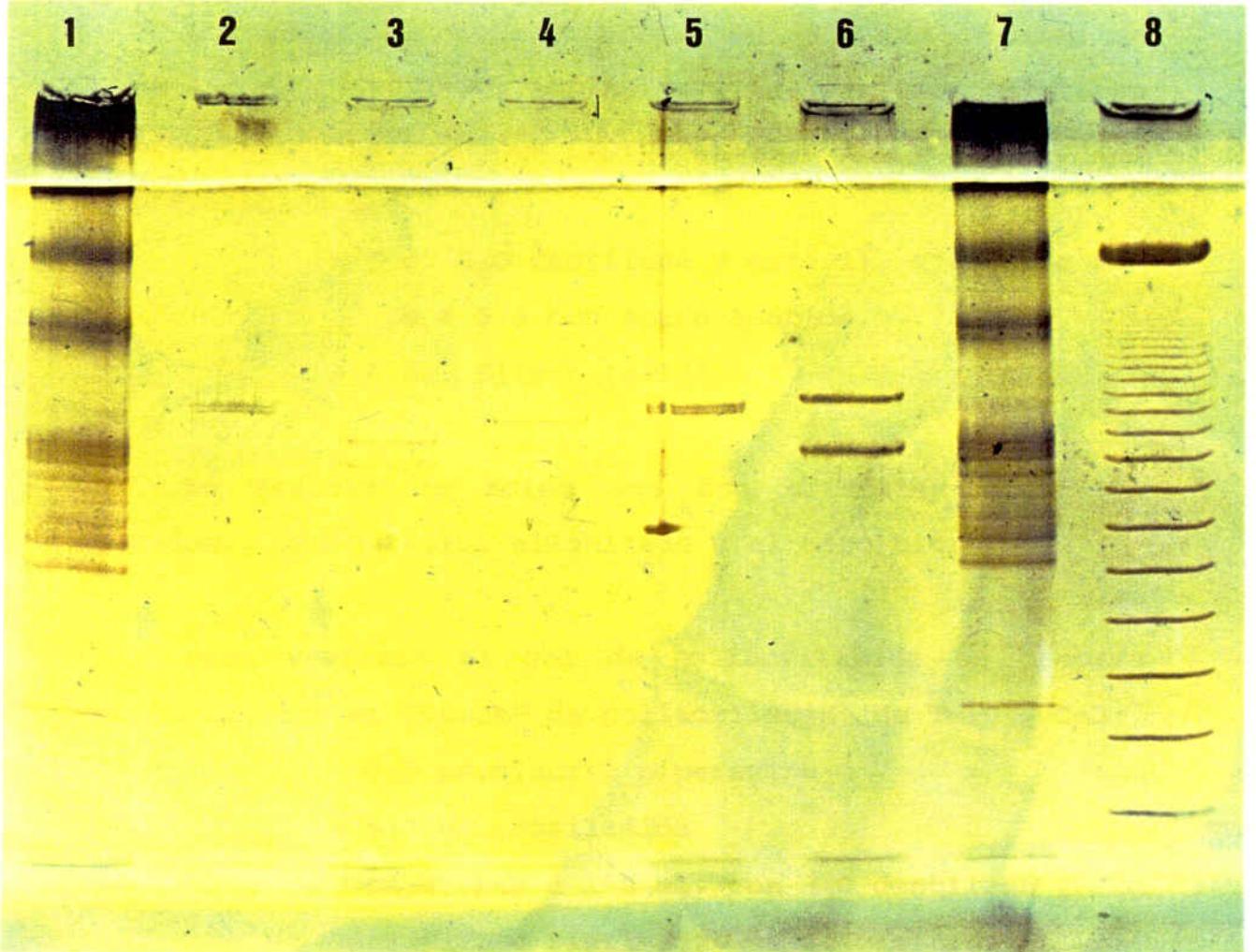


Fig.8. Electroforesis con geles miniatura de poliacrilamida de distintos fenotipos de 3'Apo-B. En los carriles 1 y 7 hay un marcador alélico, y en el carril 8 un "Ladder-100". En los carriles del 2 al 6 los fenotipos observados son: 45-47;33-39;37-45;47-49;35-51.

### Electroforesis en geles de poliacrilamida y revelado con Nitrato de plata

Los geles de poliacrilamida, en este caso tienen un tamaño de 120\*200\*0.6 mm. Se realizan con unos cristales previamente silanizados (aproximadamente 1 hora) con una preparación de:

- 2 l. H<sub>2</sub>O destilada y estéril, ajustando el pH a 3.5 con Acido Acético.
- 8 ml. Silano (A-174)

Se realiza un molde con dos cristales separados 0.6mm., uno de ellos silanizado y el otro hidrófobo.

Para realizar el gel de poliacrilamida se prepara previamente un "stock" de poliacrilamida de T=10 y C=3:

- 0.3 gr. diacril piperazina
- 9.7 gr. acrilamida
- se enrasa a 100 ml. con H<sub>2</sub>O destilada y estéril, y finalmente se desgasifica 15 minutos.

Se prepara el gel , que tendrá una T=5 y C=3 finales:

- 10 ml. "stock" de poliacrilamida
- 10 ml. tampón tris-formato (0.12 M. pH=9)
- 200 µl. persulfato amónico 10%
- 20 µl. TEMED

Esta solución se vierte, con cuidado para no hacer burbujas, entre los dos cristales. Se deja gelificar durante aproximadamente 30 minutos, a temperatura ambiente.

Se preparan también unos "strips" de agarosa del 2% con:

- 225 ml. tampón: 125 gr. Acido Bórico  
17.31 gr. Tris-base  
enrasado a 2l. con ddH<sub>2</sub>
- 4.5 gr. Agarosa
- 1% Azul de Bromofenol

y se cortan tiras de 1 cm.

Una vez preparado el gel se coloca sobre una fuente de electroforesis refrigerada y a ambos extremos se colocan las tiras de agarosa, con las que contactarán los electrodos.

Las muestras amplificadas se preparan con Colorante Standard en proporción 1:10 y se aplican al gel con papeles absorbentes de un tamaño aproximado de 5x3 mm.

Las condiciones de electroforesis son de:

- prefocalización de 30 minutos a 100 V..
- aplicación de las muestras a  $\pm$  1cm. del ánodo.
- focalización de aproximadamente 1 hora y 20 minutos a 600 V.

Una vez separados los fragmentos de tamaño se fija y tiñe con un sistema rápido de detectar proteínas y ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida y agarosa, después de la electroforesis. El "kit" de revelado "Silver Stain Plus", de Bio-Rad, que esta compuesto por:

- "Fixative enhancer concentrate"
- "Sylver complex solution"
- "Reduction moderator solution"
- "Image developement reagent"
- "Developement accelerator reagent"

1. Proceso de fijación:

Se prepara un volumen final de 200 ml.con:

- 100 ml. metanol
- 20 ml. ácido acético
- 70 ml. H<sub>2</sub>O bidestilada
- 10 ml. de "Fixative enhancer concentrate"

se deja el gel en esta solución durante 20-30 minutos en agitación.

2. Proceso de lavado:

Se decanta el líquido de fijación y se lava el gel con 200 ml. de H<sub>2</sub>O bidestilada agitando durante 20 minutos, pero cambiando el H<sub>2</sub>O a los 10 minutos.

3. Proceso de tinción:

En un vaso de precipitados con 35 ml. de H<sub>2</sub>O bidestilada en agitación, se añaden:

- 5 ml. "Silver complex solution"
- 5 ml. "Reduction moderator solution"
- 5 ml. "Image development reagent"
- 50 ml. "Development accelerator reagent"  
(formado por 50 gr. de "Development  
accelerator reagent" y 950 ml. H<sub>2</sub>O  
bidestilada)

se decanta el H<sub>2</sub>O del lavado y se coloca el gel en la solución anteriormente preparada, durante 20 minutos en agitación.

#### 4. Proceso de parada de la reacción:

Para ello se utilizan 200 ml. de ácido acético al 5% y tras decantar el líquido de revelado se deja el gel esta solución de parada.

#### 3.3.5.2. GELES DE AGAROSA

##### **Electroforesis submarina en geles de agarosa**

Este sistema nos permite el tipaje de las distintas muestras de una forma más rápida y aunque el poder de resolución suele ser menor que en el caso de los geles de poliacrilamida, el rango de separación es mayor.

Para visualizar los alelos del minisatélite YNZ-22 hacemos un gel de agarosa al 2%:

1 gr agarosa Sea-Kem GTG  
50 ml tampón TAE\*1 con Bromuro de Etidio  
(0.3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

Calentamos en el microondas en dos tandas de 3 minutos cada una y a temperatura media. Cuando los granos de agarosa se han disuelto se deja enfriar un poco a  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ , para no estropear la cubeta, y se vierte en la bandeja de metacrilato, previamente sellada por los lados con cinta adhesiva. Colocamos el peine y dejamos que gelifique a temperatura ambiente, durante aproximadamente media hora. Este proceso puede agilizarse un poco si se coloca en la nevera cuando ya ha empezado a gelificar.

Quitamos el peine con cuidado, para no romper las separaciones que hay entre los pozos, y la cinta adhesiva. Colocamos la bandeja en la cubeta, que llenaremos con TAE\*1 con Bromuro de Etidio hasta que el gel quede cubierto por el tampón.

Llenamos cada pocillo con las muestras amplificadas y preparadas con colorante standar\*10 en proporción 1/10. Es necesario poner al menos en uno de los pozos un marcador de talla, para poder comparar el tamaño de las bandas alélicas con las bandas de tamaño ya conocido del

marcador. En el caso del minisatélite YNZ22, el marcador de talla preferentemente utilizado es el Ladder-100 que forma bandas separadas entre sí 100 pares de bases.

Aplicamos un voltaje de 60-70 V durante unas 2 horas y 30 minutos aproximadamente.

Una vez concluida la electroforesis se pueden visualizar, observando el gel en el transluminador-UV, los alelos correspondientes a cada individuo.

En el caso de los polimorfismos 3'APO B y D1S80 el gel de agarosa ha de ser de una concentración mayor, de 2.5% a 3%, además de ser de mayor tamaño, en este caso se utiliza una cubeta más grande ya que el tiempo de electroforesis es de unas 5 horas a 60. Es necesaria una mayor separación ya que en este caso las distintas bandas alélicas se encuentran más juntas.

El marcador de talla en este caso es una mezcla de ADN genómico correspondiente a distintos individuos con bandas alélicas distintas que se amplifican juntos.

Se han utilizado otras agarosas obteniendo resoluciones distintas. La agarosa "SeaKem GTG" ofrece una mayor resistencia y por lo tanto es adecuada para la separación de fragmentos relativamente grandes. Sin embargo con la agarosa "Nusieve GTG" se obtiene una

mejor resolución y bandas más nítidas. En el caso de lecturas dudosas, cabe la posibilidad de mejorar la resolución mediante la agarosa "Metaphor". Sin embargo, tanto la agarosa "Nusieve GTG" como "Metaphor" son de difícil manejo y los geles se rompen fácilmente.

### 3.3.6. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Para evitar la contaminación en las muestras se han separado las áreas de trabajo, así como el material. Se ha destinado un área para el proceso de pre-amplificación, utilizando micropipetas, puntas y el resto de material de forma exclusiva para esta actividad. Otra área esta destinada a los productos amplificados y se utiliza, también material específico para ello. De este modo se intenta evitar en lo posible el fenómeno de "carry-over".

Por otro lado hay que trabajar con precaución ya que se manejan productos altamente peligrosos como es el bromuro de etidio que es cancerígeno, y para el cual hay una zona destinada a su manipulación en la que los guantes son de uso obligatorio.

Para la visualización de los geles de agarosa, mediante el transluminador-UV es preciso protegerse con una pantalla o al menos con unas gafas de metacrilato, para evitar posibles quemaduras debidas a la radiación ultravioleta.

---

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. D1S80

En 425 individuos pertenecientes a la población de Cataluña tipados para el locus D1S80, se han observado 26 alelos distintos. Las variantes alélicas se encuentran en un rango de 240 a 640 pb, lo que implica que tienen de 15 a 40 unidades de repetición de 16 pb. (Fig.9).

La nomenclatura de los alelos indica el número de unidades de repetición.

Los alelos más comunes son el 18 con una frecuencia del 23.05% y el 24 de 36.47%. El resto de los alelos se presentan en una frecuencia del 6% o menos (Fig.10). Se ha observado una banda que se encuentra muy por encima del alelo más grande del marcador alélico comercial proporcionado por Cetus, entre 900 y 1000 pb.

Se observan en total 83 fenotipos distintos de los que ninguno se encuentra en más de 7% de los individuos, excepto las combinaciones de 18/24 y 24/24 cuyas frecuencias son de 15% y de 14.6% respectivamente (Tabla 1.).

El índice de heterocigosidad observado es de 77.64%

Para verificar la hipótesis de apareamiento al azar en la población estudiada se comparan las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas cuantificándolo mediante el estadístico de  $X^2$ . Debido al elevado número de alelos y a la escasa frecuencia en que se presentan la mayoría de ellos, utilizamos el método propuesto por B. Budowle (1991) consistente en agrupar los genotipos que tienen un número de individuos menor que 4.

Genotipos	Nºindividuos observados	Nºindividuos esperados	Valor $X^2$
Agrupados	104	98.831009	0.27034
18-18	29	22.59764	1.81391
18-20	3	4.38117	0.43541
18-21	7	5.07294	0.73203
18-22	5	7.14823	0.64559
18-24	64	71.48236	0.78321
18-25	8	8.99294	0.10963
18-26	8	8.61176	2.48932
18-28	8	12.22117	1.45799
18-29	10	11.29882	0.1493
18-31	13	10.60705	0.53984
20-24	5	6.92941	0.53722
21-24	9	8.02352	0.11883
22-24	10	11.30588	0.15083
23-24	1	5.47058	3.65337
24-24	62	56.52941	0.52941
24-25	11	14.22353	0.73056
24-26	9	7.29411	0.39896
24-28	24	19.32941	1.12855
24-29	18	17.87059	0.00093
24-31	17	16.77647	0.00297
	425	424.998	16.6782

para 9 grados de libertad:

$$0.05 < p < 0.1$$

Según R.Chakraborty (1991) existe la posibilidad de agrupar individuos homocigotos y heterocigotos, dando una orientación sobre la relación entre ambos grupos, de modo que la probabilidad de aceptar la hipótesis de equilibrio es de:

	Nºindividuos observados	Nºindividuos esperados	Valor $\chi^2$
Homocigotos	95	85.92706	0.9580003
Heterocigotos	330	339.0731	0.2427807
	425	425.0001	1.200783

para 1 grado de libertad:

$$p = 0.273165$$

Una vez se ha comprobado que la población esta en equilibrio genético para el locus D1S80, se pueden utilizar los datos poblacionales para calcular la probabilidad de exclusión a priori y la eficiencia bioestadística de modo que se podrá aplicar este marcador en los estudios de investigación biológica de la paternidad.

Probabilidad de Exclusión "a priori" = 63.25%

---

Eficiencia Bioestadística = 9.33651

El polimorfismo D1S80 se ha estudiado en 120 casos de paternidad, de los que 87 eran paternidades prácticamente probadas con marcadores convencionales (antígenos eritrocitarios, HLA, proteínas plasmáticas y enzimas eritrocitarios) con una probabilidad de exclusión "a priori" acumulada >99.95. El porcentaje de exclusiones corresponde al 66.6% , ya que de 33 casos de no paternidad pudieron excluirse 22, utilizando el marcador D1S80. Ello concuerda con el valor de 63.25% calculado "a priori".

También tiene interés el cálculo de la probabilidad de coincidencia y el poder de discriminación, aplicable en estudios de identificación.

Probabilidad de coincidencia = 0.061193

Poder de discriminación = 0.938806

Con el objetivo de comparar la distribución alélica de este marcador en la población catalana, respecto a otras poblaciones mundiales (Fig.11 y 12), analizadas por otros autores, se realizan estudios comparativos utilizando en este caso el test de la  $X^2$  en tablas de contingencia y la representación gráfica del Triángulo de Streng (Fig.13).

---

Comparación de las frecuencias génicas, del minisatélite D1S80, entre la población catalana y algunas poblaciones mundiales.

---

Cataluña/Alemania (Schnee-Griese J. y col. 1993, n=250)

$$\chi^2 = 15.82 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Dinamarca (Thymann M. y col. 1993, n=210)

$$\chi^2 = 12.92 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p = 0.608$$

Cataluña/Finlandia (Sajantila A. y col. 1992, n=140)

$$\chi^2 = 41.99 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Holanda (Kloosterman AD. y col. 1993, n=150)

$$\chi^2 = 88.24 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Italia (Novelli G. y col. 1992, n=100)

$$\chi^2 = 273.80 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Italia (Tagliabracci A. y col. en prensa, n=89)

$$\chi^2 = 80.07 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Rusia (Chystiakov DA. y col. en prensa, n=120)

$$\chi^2 = 20.09 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p = 0.164$$

Cataluña/Suecia (Langö A. y col. en prensa, n=455)

$$\chi^2 = 51.84 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña /Suiza (Kratzer A. y col. en prensa, n=201)

$$\chi^2 = 19.99 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p = 0.171$$

---

#### 4.2. 3' APO B

En 308 individuos pertenecientes a la población de Cataluña tipados para el locus 3' Apo B, se han observado 16 alelos distintos. Las variantes alélicas tienen de 29 a 55 unidades de repetición de 14-16 pb. (Fig.14).

La nomenclatura de los alelos indica el número de unidades de repetición (Boerwinkle E. y col. 1989).

Los alelos más comunes son el 35 con una frecuencia del 20.94% y el 37 de 36.36%. El resto de los alelos se presentan en una frecuencia del 8% o menos (Fig. 15). Se ha observado alelos intermedios con un número de repeticiones par, de 30 y 36 unidades de repetición.

Se observan en total 50 fenotipos distintos de los que ninguno se encuentra en más de 8.4% de los individuos, excepto las combinaciones de 35/37 y 37/37 cuyas frecuencias son de 14.6% y de 12% respectivamente (Tabla 2).

El índice de heterocigosidad observado es de 80.84%

Para verificar la hipótesis de apareamiento al azar en la población estudiada se comparan las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas cuantificándolo mediante el estadístico de  $\chi^2$ . Debido al elevado número de alelos y a la escasa frecuencia en que se presentan la mayoría de ellos, utilizamos el método propuesto por B. Budowle (1991) consistente en agrupar los genotipos que tienen un número de individuos menor que 4.

Genotipos	Nºindividuos observados	Nºindividuos esperados	Valor $\chi^2$
Agrupados	67	59.8964	0.84247
31-35	12	11.09902	0.7313
31-37	20	19.27272	0.2744
31-47	3	4.38798	0.43903
31-49	5	4.38798	0.8536
33-35	10	7.95779	0.52409
33-37	11	13.81818	0.57476
35-35	14	13.5073	0.01797
35-37	45	46.90909	0.07769
35-39	4	4.81655	0.13842
35-47	9	10.68019	0.26432
35-49	9	10.68019	0.26432
37-37	37	40.72727	0.34111
37-39	8	8.36363	0.01581
37-45	6	4.72727	0.34265
37-47	23	18.54545	1.06996
37-49	26	18.54545	2.99643
37-51	6	5.45454	0.05454
47-49	3	4.2224	0.04711
	308	307.9994	9.86998

para 9 grados de libertad

$$0.3 < p < 0.5$$

Según R.Chakraborty (1991) existe la posibilidad de agrupar individuos homocigotos y heterocigotos, de modo que la probabilidad de aceptar la hipótesis de equilibrio es de:

	Nºindividuos observados	Nºindividuos esperados	Valor $\chi^2$
Homocigotos	59	62.7565	0.2248579
Heterocigotos	249	245.2435	0.0575404
	308	308	0.2823983

para 1 grado de libertad:

$$0.505 < p < 0.6$$

Una vez se ha comprobado que la población está en equilibrio genético para el locus 3'Apo B, se pueden utilizar los datos poblacionales para calcular la probabilidad de exclusión a priori y la eficiencia bioestadística de modo que se podrá aplicar este marcador en los estudios de investigación biológica de la paternidad.

Probabilidad de Exclusión "a priori" = 62.39%

---

Eficiencia Bioestadística = 9.423664

El polimorfismo 3'ApoB se ha estudiado en 30 casos de paternidad, de los que 25 eran paternidades prácticamente probadas y corroboradas con otros marcadores convencionales. El porcentaje de exclusiones corresponde al 60% , ya que de 5 casos de no paternidad pudieron excluirse 3, utilizando el marcador 3'Apo B. Ello concuerda con el valor de 62.39% calculado "a priori".

También tiene interés el cálculo de la probabilidad de coincidencia y el poder de discriminación, aplicable en estudios de identificación.

Probabilidad de coincidencia = 0.0634579

Poder de discriminación = 0.9365421

Como en el caso anterior se puede comparar la distribución alélica de este marcador en la población catalana, respecto a otras poblaciones mundiales, analizadas por otros autores (Fig. 16, 17 y 18), realizando estudios comparativos utilizando en este caso el test de la  $\chi^2$  en tablas de contingencia y de forma gráfica con el Triángulo de Streng (Fig. 19).

---

Comparación de las frecuencias génicas, del minisatélite 3' Apo-B, entre la población catalana y algunas poblaciones mundiales.

---

Cataluña/Albania (De Benedictis G. y col. en prensa, n=91)

$$\chi^2 = 20.65 \quad (16 \text{ g.d.l.}) \quad 0.1 < p < 0.2$$

Cataluña/Alemania (Schnee-Griese J. y col. 1991, n=340)

$$\chi^2 = 19.49 \quad (16 \text{ g.d.l.}) \quad 0.2 < p < 0.3$$

Cataluña/Austria (Ludwig EH. y col. 1989, n=318)

$$\chi^2 = 19.91 \quad (16 \text{ g.d.l.}) \quad 0.2 < p < 0.3$$

Cataluña/China (Evans AE. y col. 1993, n=148)

$$\chi^2 = 178.62 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Dogrib "Canadá" (Deka R. y col. 1992, n=37)

$$\chi^2 = 84.65 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Francia (Boerwinkle E. y col. 1989, n=125)

$$\chi^2 = 13.94 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad 0.5 < p < 0.7$$

Cataluña/Grecia (De Benedictis G. y col. en prensa, n=83)

$$\chi^2 = 10.29 \quad (16 \text{ g.d.l.}) \quad 0.8 < p < 0.9$$

---

Cataluña/India (Renges HH. y col. 1992, n=107)

$$\chi^2 = 60.83 \quad (19 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Italia "Centro y Sur" (d'Aloja E. y col. 1992, n=109)

$$\chi^2 = 28.55 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad 0.01 < p < 0.02$$

Cataluña/Italia (Novelli G. y col. 1992, n=100)

$$\chi^2 = 92.65 \quad (16 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Japón (Higashimori K. y col. 1992, n=89)

$$\chi^2 = 172.28 \quad (16 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Kachari "Nord-Este India" (Deka R. y col. 1992, n=53)

$$\chi^2 = 124.33 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Nueva Guinea (Deka R. y col. 1992, n=45)

$$\chi^2 = 95.35 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Pehuenche "Chile" (Deka R. y col. 1992, n=87)

$$\chi^2 = 154.11 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Rusia (Chistyakov DA. y col. en prensa, n=120)

$$\chi^2 = 154.11 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Suecia (Renges HH. y col. 1992, n=89)

$$\chi^2 = 25.55 \quad (15 \text{ g.d.l.}) \quad p = 0.043$$

### 4.3 YNZ2

En 311 individuos pertenecientes a la población de Cataluña tipados para el locus YNZ22, se han observado 14 alelos distintos. Las variantes alélicas tienen de 1 a 14 unidades de repetición de 70 pb. (Fig.20).

La nomenclatura de los alelos indica el número de unidades de repetición.

Los alelos más comunes son el 2 con una frecuencia del 21.47% y el 4 de 26.68%. El resto de los alelos se presentan en una frecuencia del 12% o menos (Fig. 21).

Se observan en total 56 fenotipos distintos de los que ninguno se encuentra en más de 4.9% de los individuos, excepto las combinaciones de 2/4 y 4/4 cuyas frecuencias son de 9.5% y de 11.04% respectivamente (Tabla 3).

El índice de heterocigosidad observado es de 79.14%

Para verificar la hipótesis de apareamiento al azar en la población estudiada se comparan las frecuencias fenotípicas observadas y esperadas cuantificándolo mediante el estadístico de  $\chi^2$ . Utilizamos el método propuesto por B. Budowle (1991) consistente en agrupar los genotipos que tienen un número de individuos menor que 4.

Genotipos	Nºindividuos observados	Nºindividuos esperados	Valor $\chi^2$
Agrupados	64	69.46326	0.42968
1-2	13	10.12861	0.81401
1-3	5	5.71543	0.08955
1-4	8	11.14147	0.88577
2-2	16	15.75562	0.00379
2-3	14	17.78135	0.80413
2-4	31	34.66238	0.38696
2-5	8	5.40192	1.24955
2-6	5	5.40192	0.0299
2-8	8	6.52733	0.33225
2-9	17	14.40514	0.46742
2-10	4	7.20257	1.42399
3-3	8	5.01688	1.77381
3-4	15	19.55948	1.06286
3-9	7	8.12861	0.1567
3-10	8	4.0643	3.81114
4-4	26	19.0643	2.52323
4-5	8	5.94212	0.71267
4-6	6	5.94212	0.00056
4-8	5	7.18006	0.66192
4-9	15	15.84565	0.04513
4-10	5	7.92282	1.07826
6-9	4	2.46945	0.94862
8-9	4	2.98392	0.34598
9-10	7	3.2926	4.17445
	311	310.9994	24.21232

para 15 grados de libertad

$$0.05 < p < 0.1$$

Según R.Chakraborty (1991) existe la posibilidad de agrupar individuos homocigotos y heterocigotos.

	Nºindividuos observados	Nºindividuos esperados	Valor $\chi^2$
Homocigotos	58	47.40676	2.367105
Heterocigotos	253	263.5933	0.4257234
	311	311.0001	2.792829

para 1 grado de libertad:

$$0.09 < p < 0.095$$

Se admite que la población esta en equilibrio genético para el locus YNZ22, y se pueden utilizar los datos poblacionales para calcular la probabilidad de exclusión a priori y la eficiencia bioestadística de modo que se podrá aplicar este marcador en los estudios de investigación biológica de la paternidad.

Probabilidad de Exclusión "a priori" = 70.1867%

Eficiencia Bioestadística = 9.354846

---

El polimorfismo YNZ22 se ha estudiado en 78 casos de paternidad, de los que 58 eran paternidades prácticamente probadas y corroboradas con otros marcadores más convencionales. El porcentaje de exclusiones corresponde al 65% , ya que de 20 casos de no paternidad pudieron excluirse 13. Ello concuerda con el valor de 70.18% calculado "a priori".

También tiene interés el cálculo de la probabilidad de coincidencia y el poder de discriminación, aplicable en estudios de identificación.

$$\text{Probabilidad de coincidencia} = 0.0397315$$

$$\text{Poder de discriminación} = 0.9602685$$

En este caso también comparamos la distribución alélica de este marcador en la población catalana, respecto a otras poblaciones europeas, analizadas por otros autores (Fig. 22, 23 y 24), realizando estudios comparativos utilizando en este caso el test de la  $\chi^2$  en tablas de contingencia y gráficamente con el Triángulo de Streng (Fig. 25).

---

Comparación de las frecuencias génicas, del minisatélite YNZ22, entre la población catalana y algunas poblaciones mundiales.

---

Cataluña/Alemania (Rand S. y col. 1992, n=88)

$$\chi^2 = 12.564 \quad (13 \text{ g.d.l.}) \quad p = 0.4820$$

Cataluña/Italia (Tagliabracci A. y col. en prensa, n=202)

$$\chi^2 = 16.815 \quad (13 \text{ g.d.l.}) \quad p = 0.2079$$

Cataluña/Rusia (Chistyakov DA. y col. en prensa, n=120)

$$\chi^2 = 66.517 \quad (13 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/USA (Rand S. y col. 1992, n=118)

$$\chi^2 = 22.195 \quad (13 \text{ g.d.l.}) \quad p = 0.0524$$

Cataluña/Dogrib "Canadá" (Deka R. y col. 1992, n=38)

$$\chi^2 = 138.277 \quad (13 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Kachari "Noreste India" (Deka R. y col. 1992, n=53)

$$\chi^2 = 51.242 \quad (14 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Cataluña/Nueva Guinea (Deka R. y col. 1992, n=45)

$$\chi^2 = 125.592 \quad (13 \text{ g.d.l.}) \quad p < 0.001$$

Tabla 1. Genotipos observados para el minisatélite D1S80 en la población catalana (n=425).

Alelos "D1S80"

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	R*	Frec.
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00235
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.00117
17	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00353
18	-	-	29	-	3	7	5	6	64	8	8	2	9	10	-	13	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	0.23058
19	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00117
20	-	-	-	-	1	-	5	2	-	-	2	4	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02235
21	-	-	-	-	2	-	9	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0.02588	
22	-	-	-	-	-	1	10	2	1	-	2	1	1	2	1	1	2	1	-	-	-	-	1	-	-	1	0.03647	
23	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01764
24	-	-	-	-	-	-	-	-	62	11	9	3	24	18	3	17	4	-	2	-	-	-	3	-	-	2	0.36470	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	2	3	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	0.04588
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02353
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.01765
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	4	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06235
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	0.05765
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00941
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05411
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00823
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00235
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00353
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00117
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00117
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00235
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00353
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00117
R*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00588

Tabla 2. Genotipos observados para el minisatélite 3' Apo-B en la población catalana (n=308).

"3'Apo B" Alelos

	29	30	31	33	35	36	37	39	41	43	45	47	49	51	53	55	Frec.
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0.00162
30	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00162
31			2	5	12	-	20	2	-	-	-	3	5	1	-	-	0.0860
33				2	10	-	11	2	-	1	1	2	2	-	-	-	0.0617
35					14	2	45	4	4	-	3	9	9	3	-	-	0.209
36						-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	0.00649
37							37	8	3	-	6	23	26	6	-	1	0.363
39								1	1	-	-	2	2	-	-	-	0.0373
41									-	-	-	1	1	-	-	-	0.0162
43										-	-	-	-	-	-	-	0.00162
45											-	2	-	-	-	-	0.021
47												2	3	1	1	-	0.0828
49													-	2	-	-	0.0828
51														1	-	-	0.0243
53															-	-	0.00162
55																-	0.00162

Tabla 3. Genotipos observados para el minisatélite YN222 en la población catalana (n=311).

## Alelos de YN222

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	15	Prec.
1	2	13	5	8	1	3	-	3	3	3	-	2	-	-	0.07234
2		16	14	31	8	5	3	8	17	4	3	2	-	-	0.22508
3			8	15	3	3	2	3	7	8	2	-	-	1	0.12701
4				26	8	6	3	5	15	5	2	2	2	-	0.42758
5					1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03858
6						-	1	2	4	-	-	-	-	-	0.03858
7							1	1	-	-	-	-	-	-	0.01929
8								1	4	1	-	-	-	-	0.04662
9									3	7	1	-	-	-	0.10289
10										-	1	1	-	-	0.05144
11											-	-	-	-	0.01447
12												-	-	-	0.01125
13													-	-	0.00321
15														-	0.00160



Fig.9. Electroforesis en gel de agarosa del polimorfismo D1S80. Los fenotipos observados de izquierda a derecha son: 18-21; 21-24; 18-24; 24-29; 18-31; 21-31; 21-24. (M=Marcador alélico)

Fig. 10 Frecuencias alélicas del polimorfismo D1S80 en 425 individuos de la población catalana.

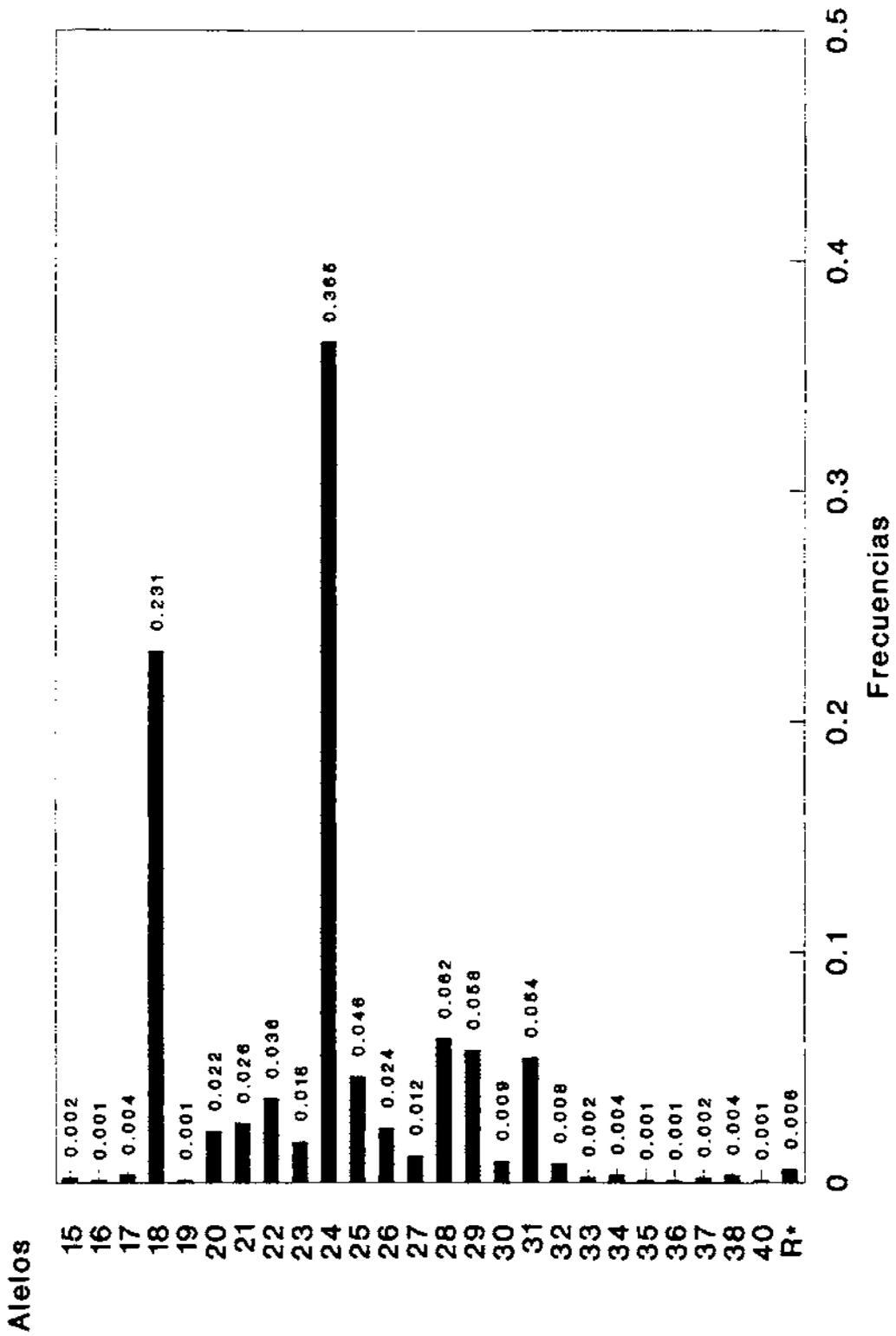


Fig. 11 Distribución alélica del polimorfismo D1S80 en la población catalana y otras del centro y sur de Europa.

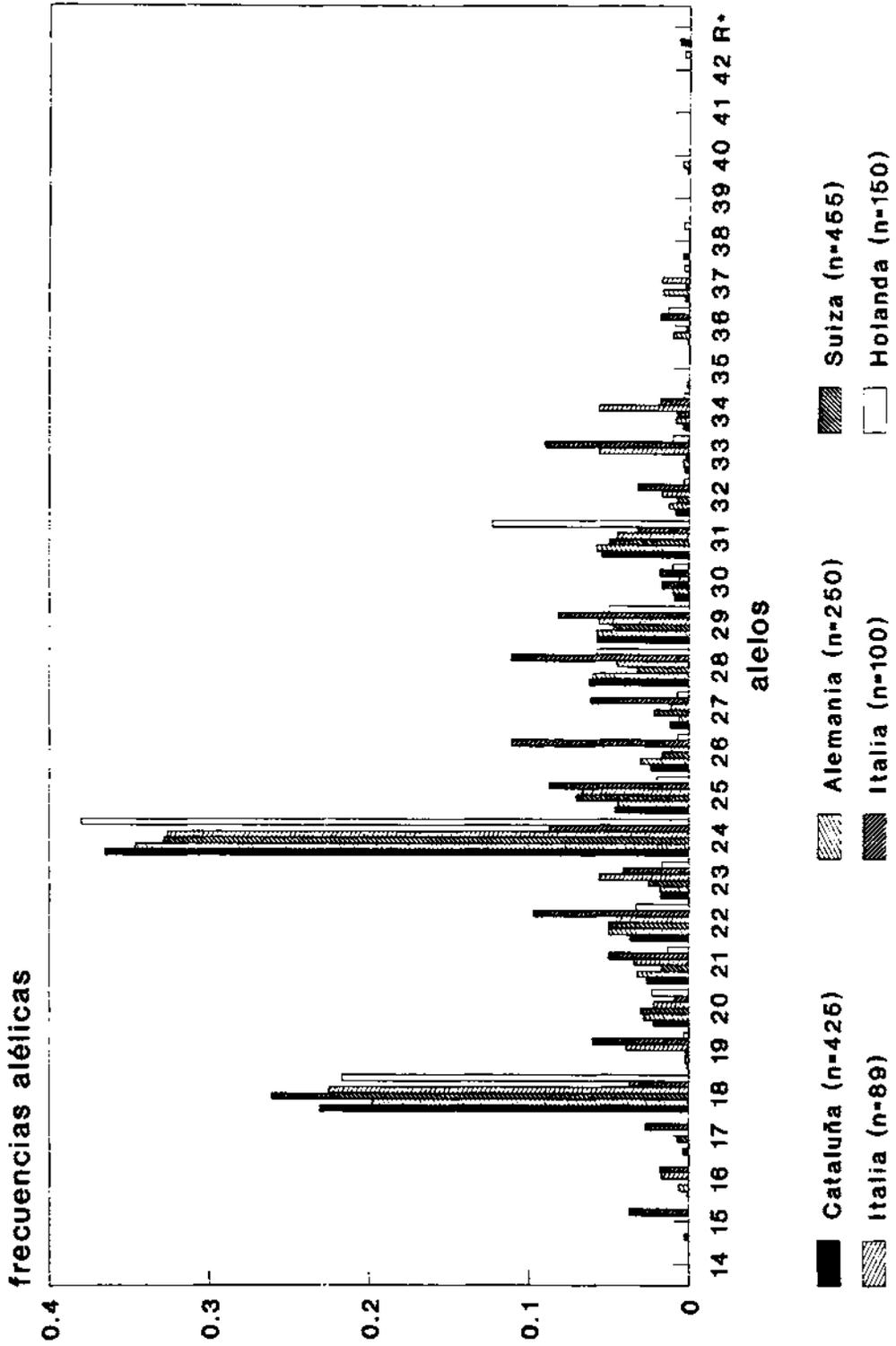


Fig.12 Distribución alélica del polimorfismo D1S80 en la población catalana y otras del norte de Europa.

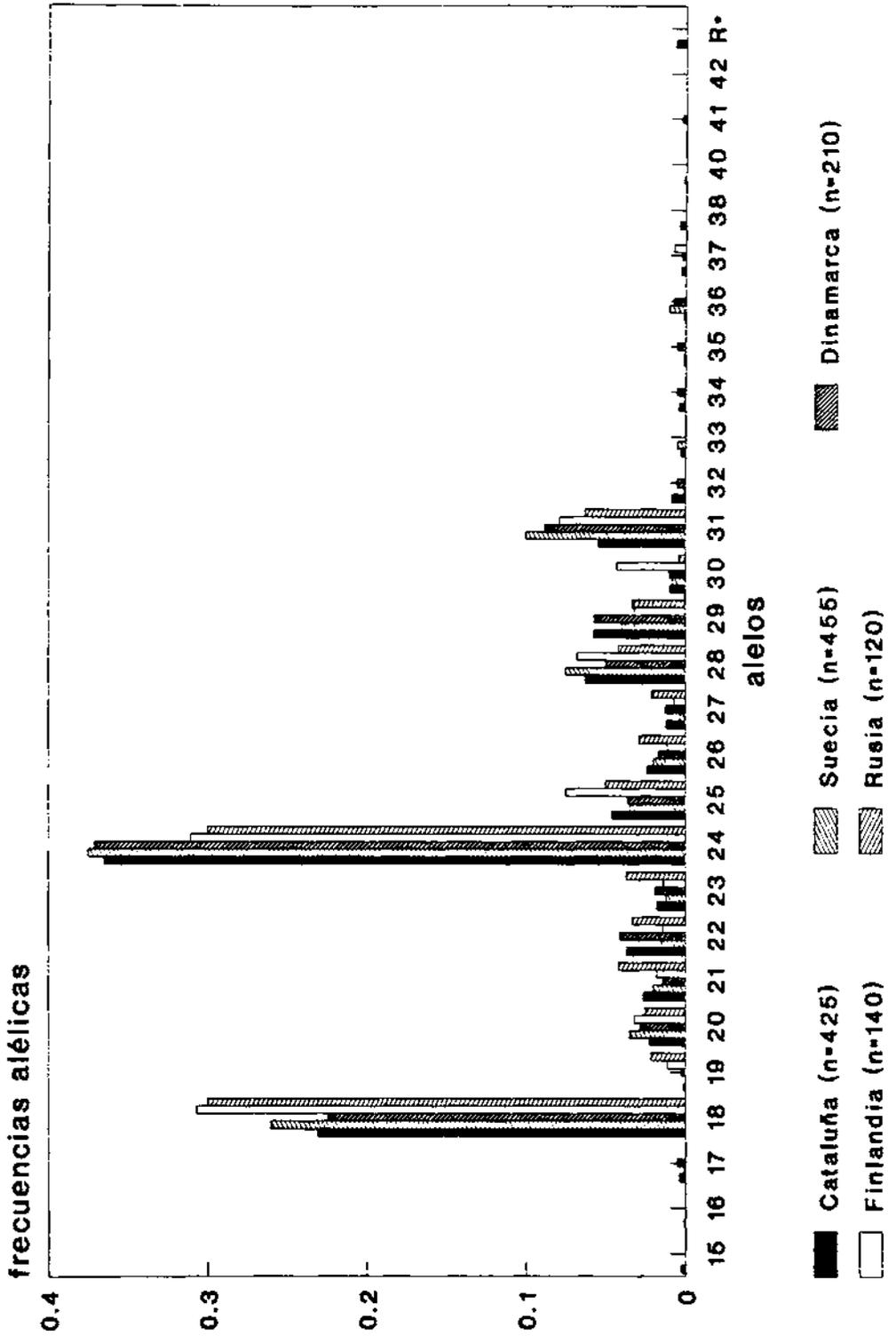
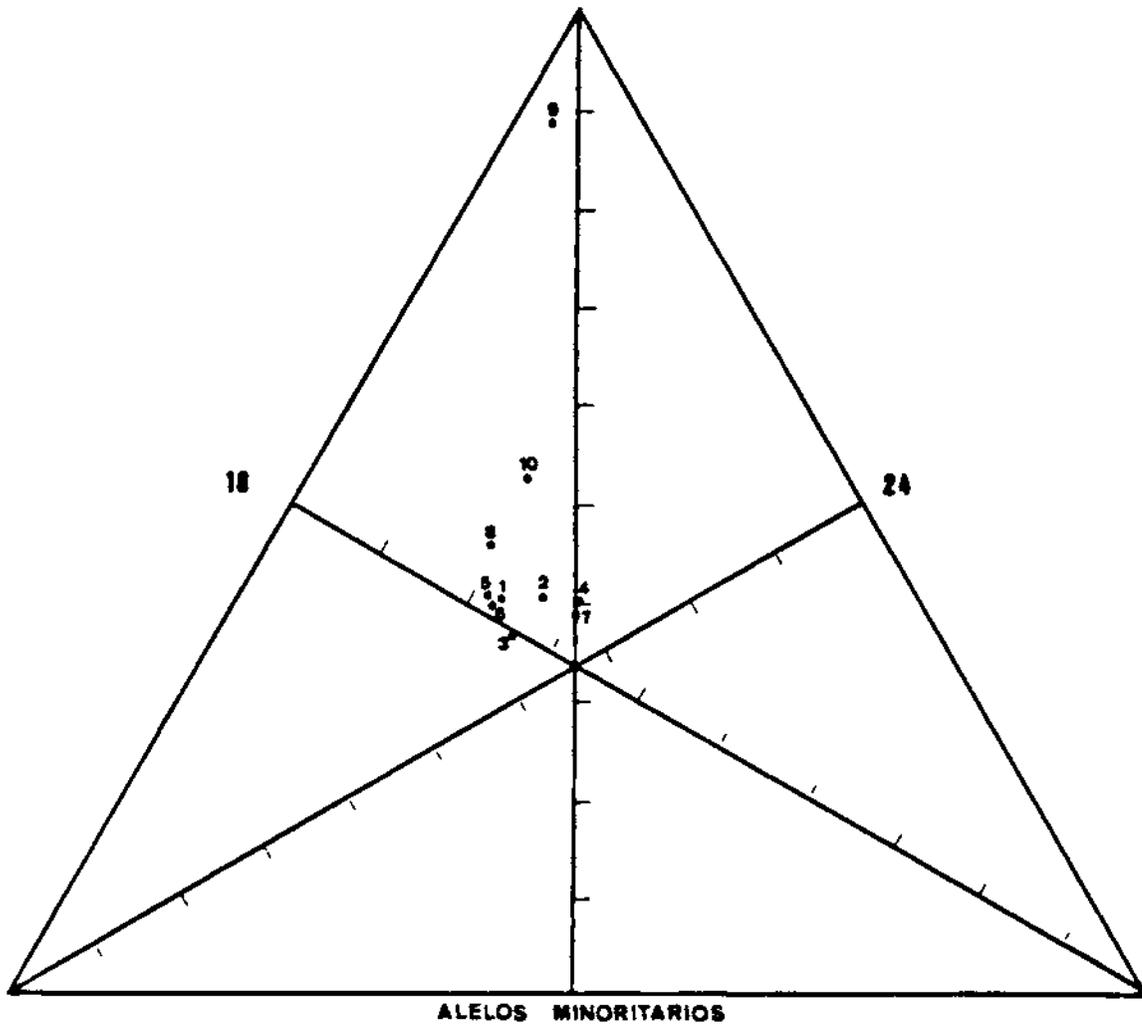


Fig. 13 Representación gráfica, mediante el triángulo de Streng, de las distancias génicas de D1S80 entre la población catalana y algunas poblaciones mundiales.



1. Cataluña
2. Suiza (Kratzer A. y col. en prensa)
3. Suecia (Langö A. y col. en prensa)
4. Rusia (Chystiakov DA. y col. en prensa)
5. Holanda (Kloosterman AD. y col. 1993)
6. Dinamarca (Thymann M. y col. 1993)
7. Finlandia (Sajantila A. y col. 1992)
8. Alemania (Schnee-Griese J. y col. 1993)
9. Italia (Novelli G. y col. 1992)
10. Italia (Tagliabracci A. y col. en prensa)

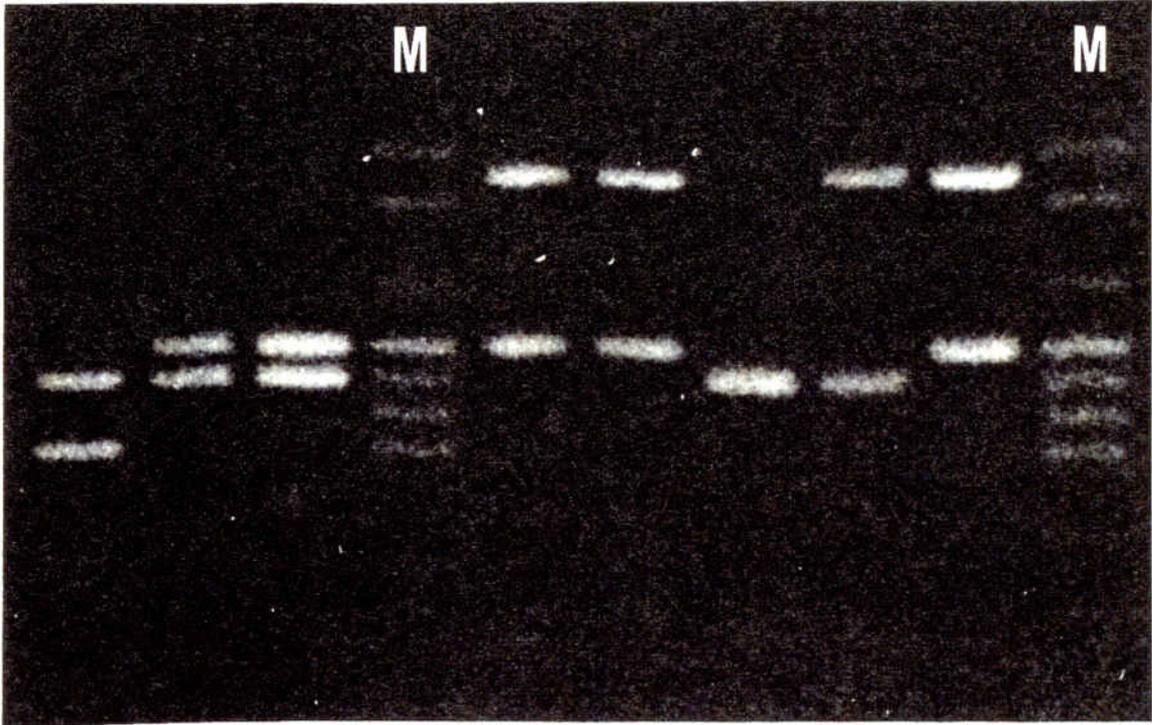


Fig.14. Electroforesis en gel de agarosa del polimorfismo 3'Apo-B. Los fenotipos, de izquierda a derecha, son: 31-35; 35-57; 35-37; 37-49; 37-49; 35-35; 35-49; 37-49. (M=Marcador alélico).

Fig. 15 Frecuencias alélicas del polimorfismo 3'APO-B en 308 individuos de la población catalana.

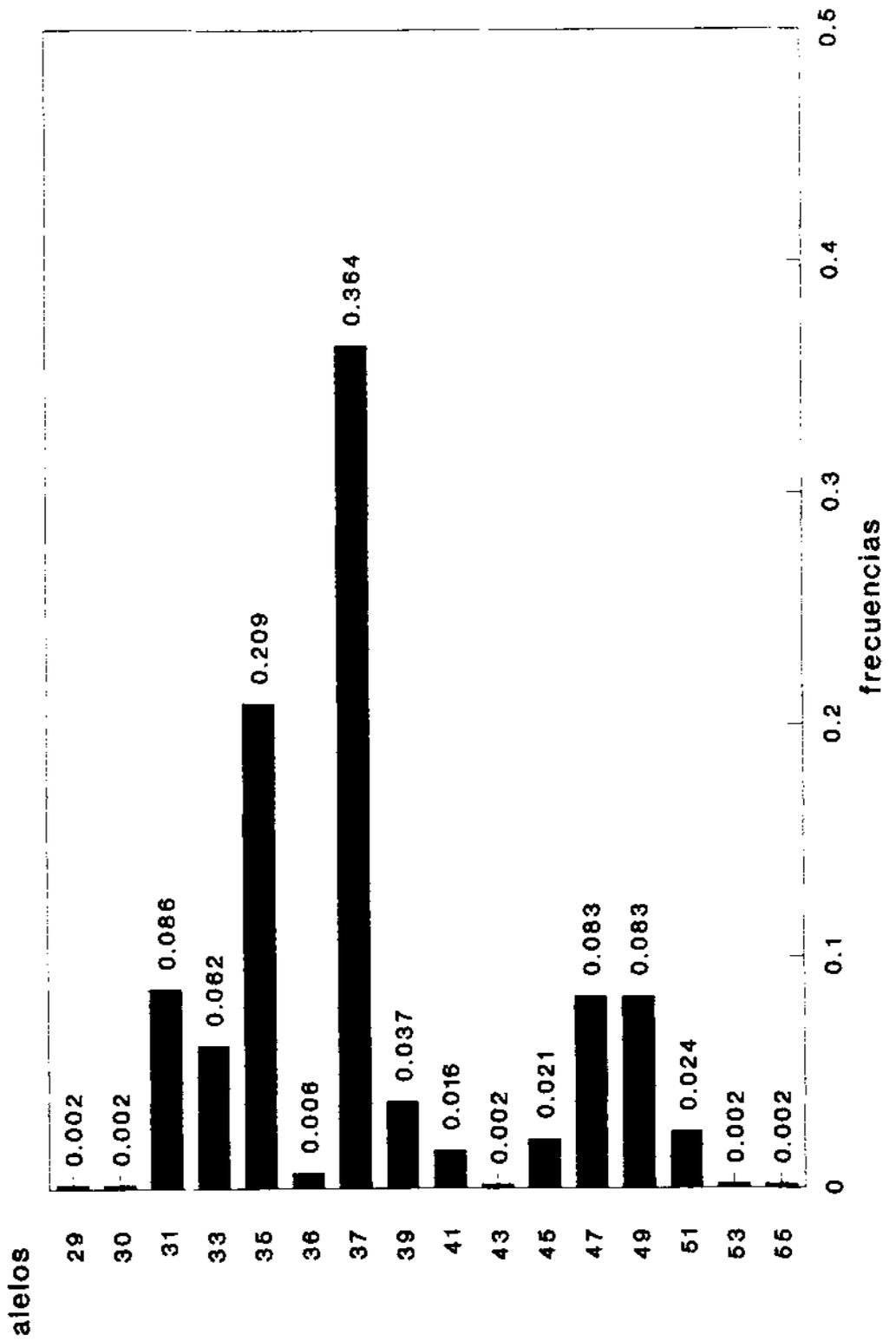
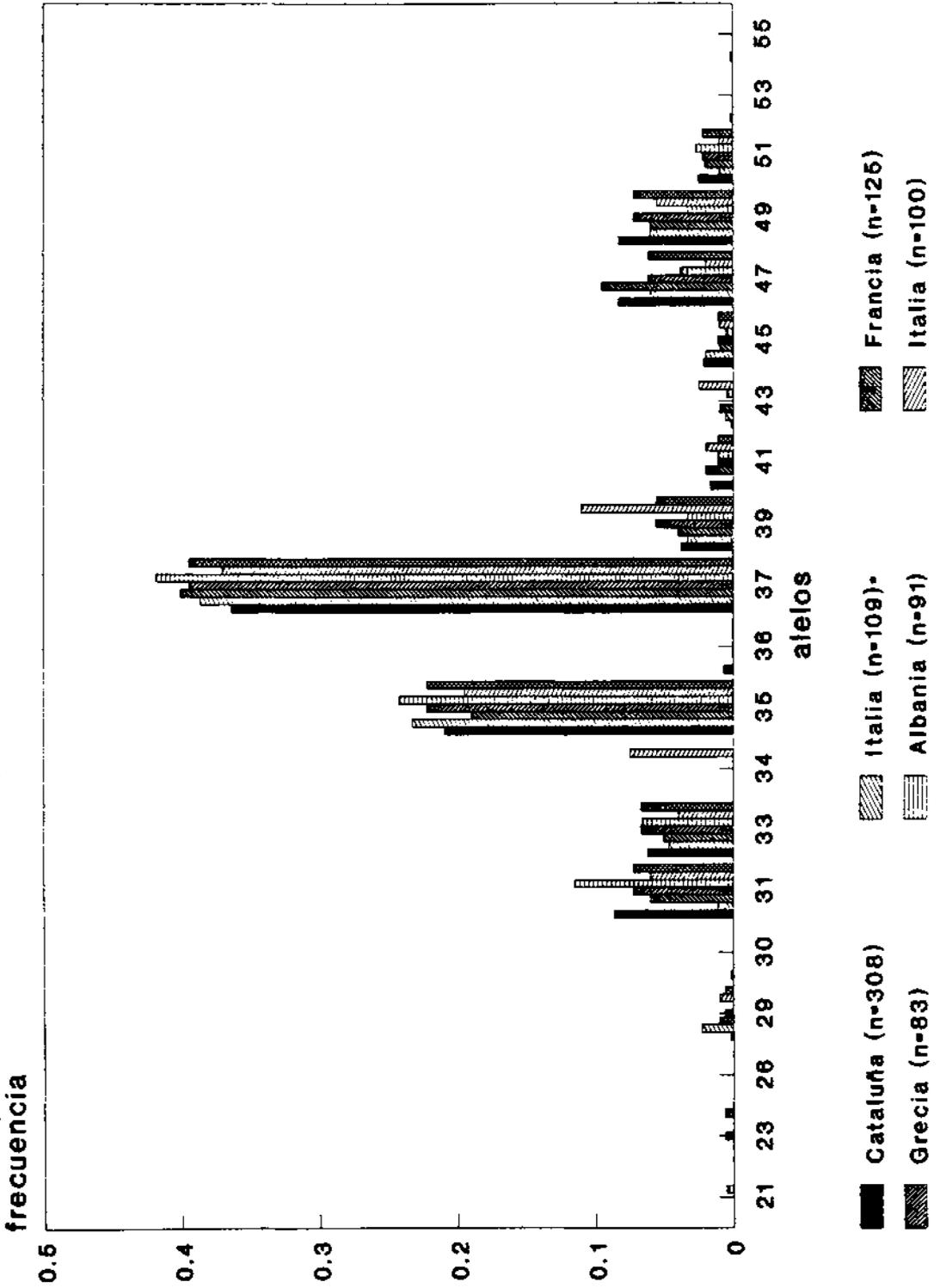


Fig. 16 Distribución alélica del polimorfismo 3'Apo-B en la población catalana y otras poblaciones mediterráneas.



\* Centro y Sur de Italia

Fig. 17 Distribución alélica del polimorfismo 3'Apo-B en la población catalana y otras poblaciones europeas.

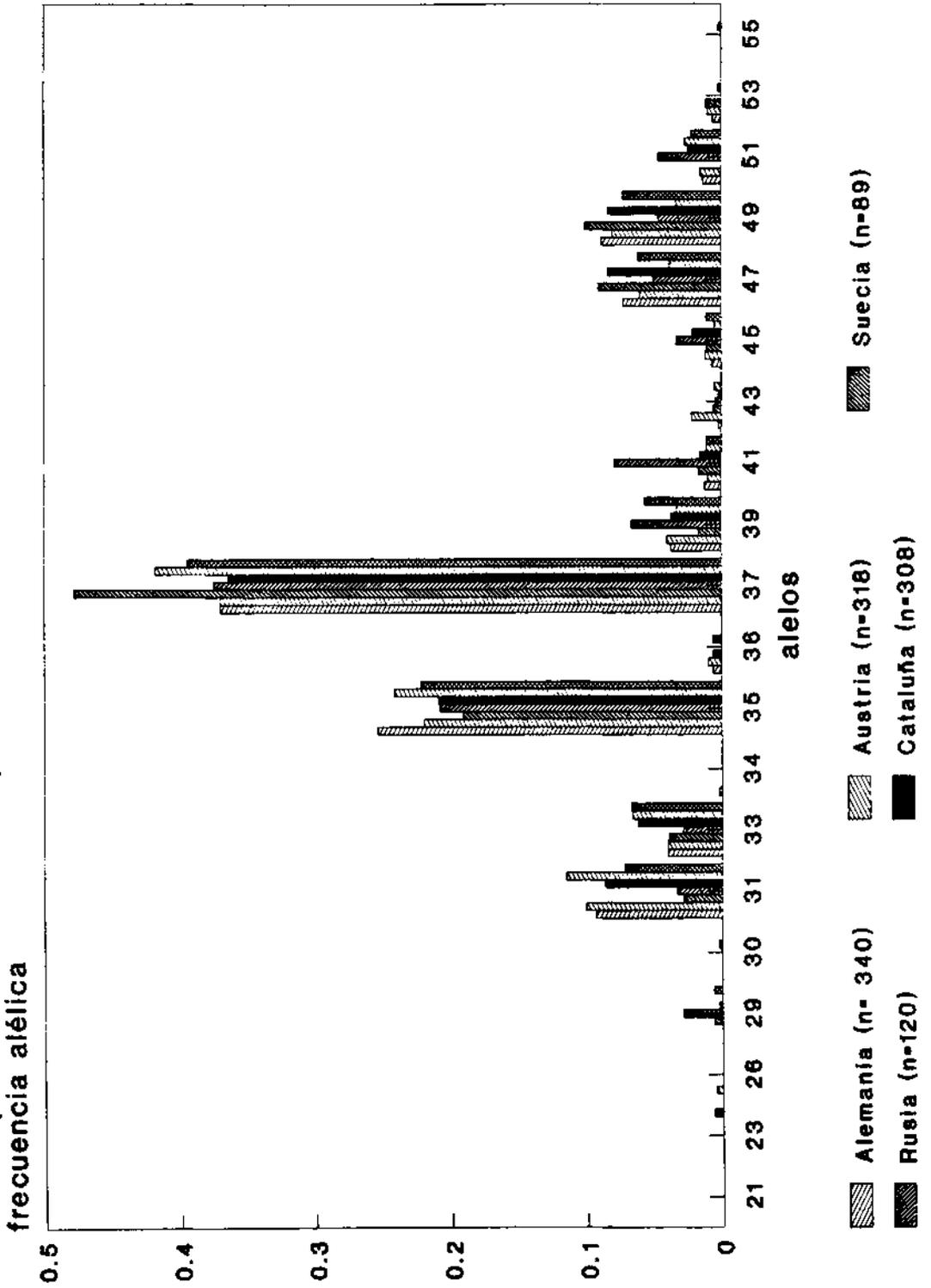


Fig. 18 Distribución alélica del polimorfismo 3'Apo-B en la población catalana y otras poblaciones no europeas.

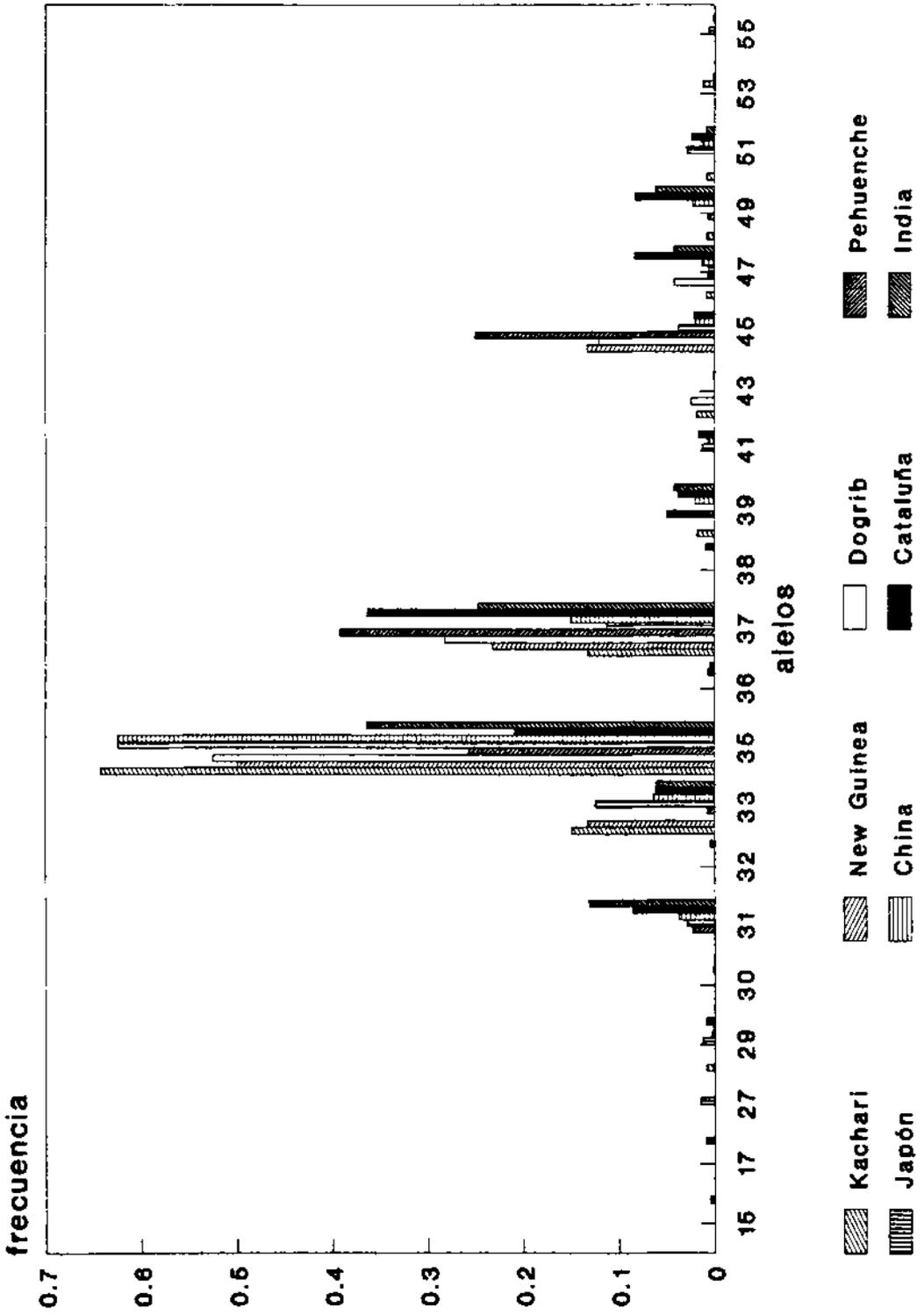
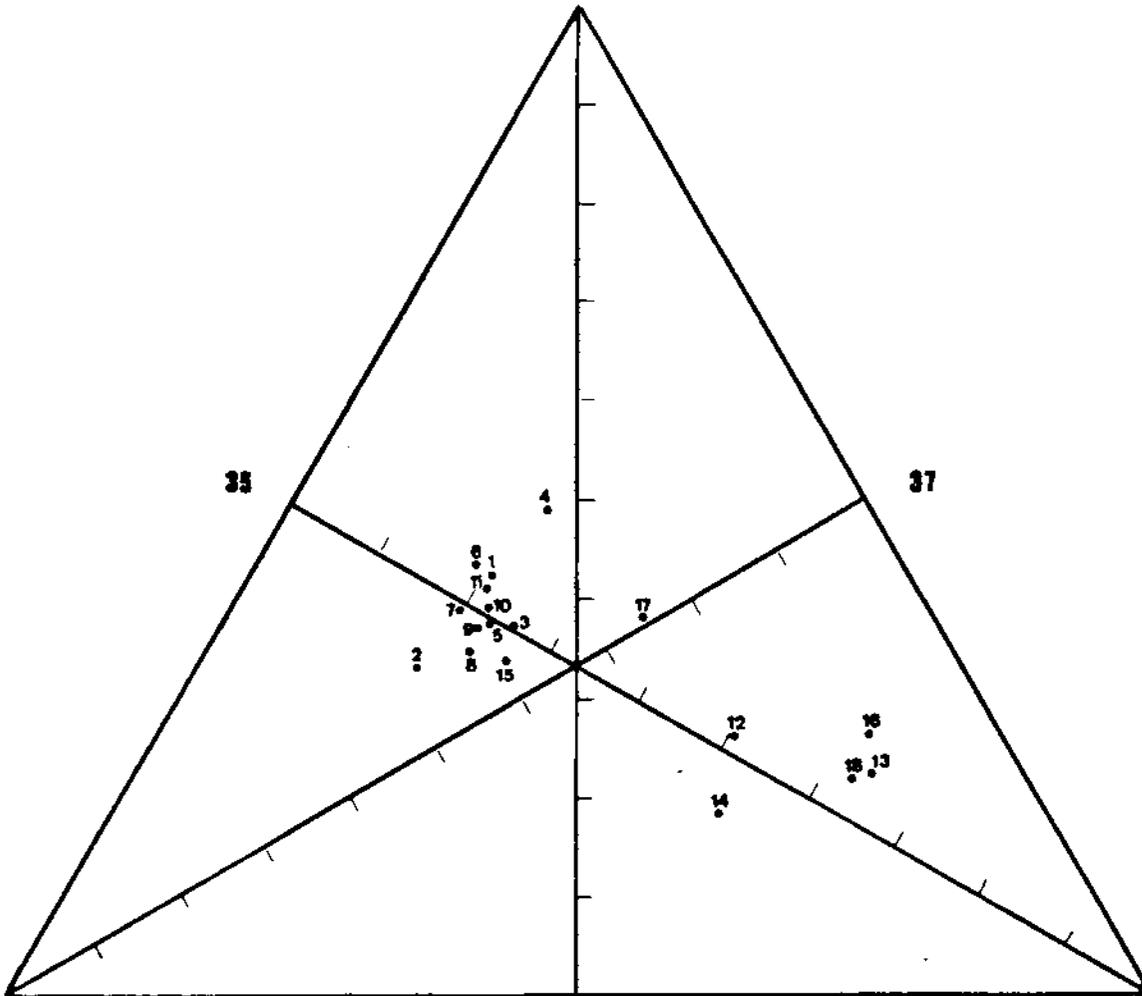


Fig. 19 Representación gráfica, mediante el triángulo de Streng, de las distancias génicas de 3'Apo-B entre la población catalana y algunas poblaciones mundiales.



- ALELOS MINORITARIOS
1. Cataluña
  2. Suecia (Renges HH. y col. 1992)
  3. Alemania (Schnee-Griese J. y col. 1991)
  4. Italia (Giorgetti R. y col. 1991)
  5. Austria (Ludwig EH. y col. 1989)
  6. Italia (Novelli G. y col. 1992)
  7. Francia (Boerwinkle E. y col. 1989)
  8. Albania (De Benedictis G. y col. en prensa)
  9. Grecia (De Benedictis G. y col. en prensa)
  10. Italia (d'Aloja E. y col. 1992)
  11. Rusia (Chistyakov DA. y col. en prensa)
  12. New Guinea (Deka R. y col. 1992)
  13. Kachari (Deka R. y col. 1992)
  14. Dogrib (Deka R. y col. 1992)
  15. Pehuenche (Deka R. y col. 1992)
  16. Japón (Higashimori K. y col. 1992)
  17. India (Renges HH. y col. 1992)
  18. China (Evans AE. y col. 1993)

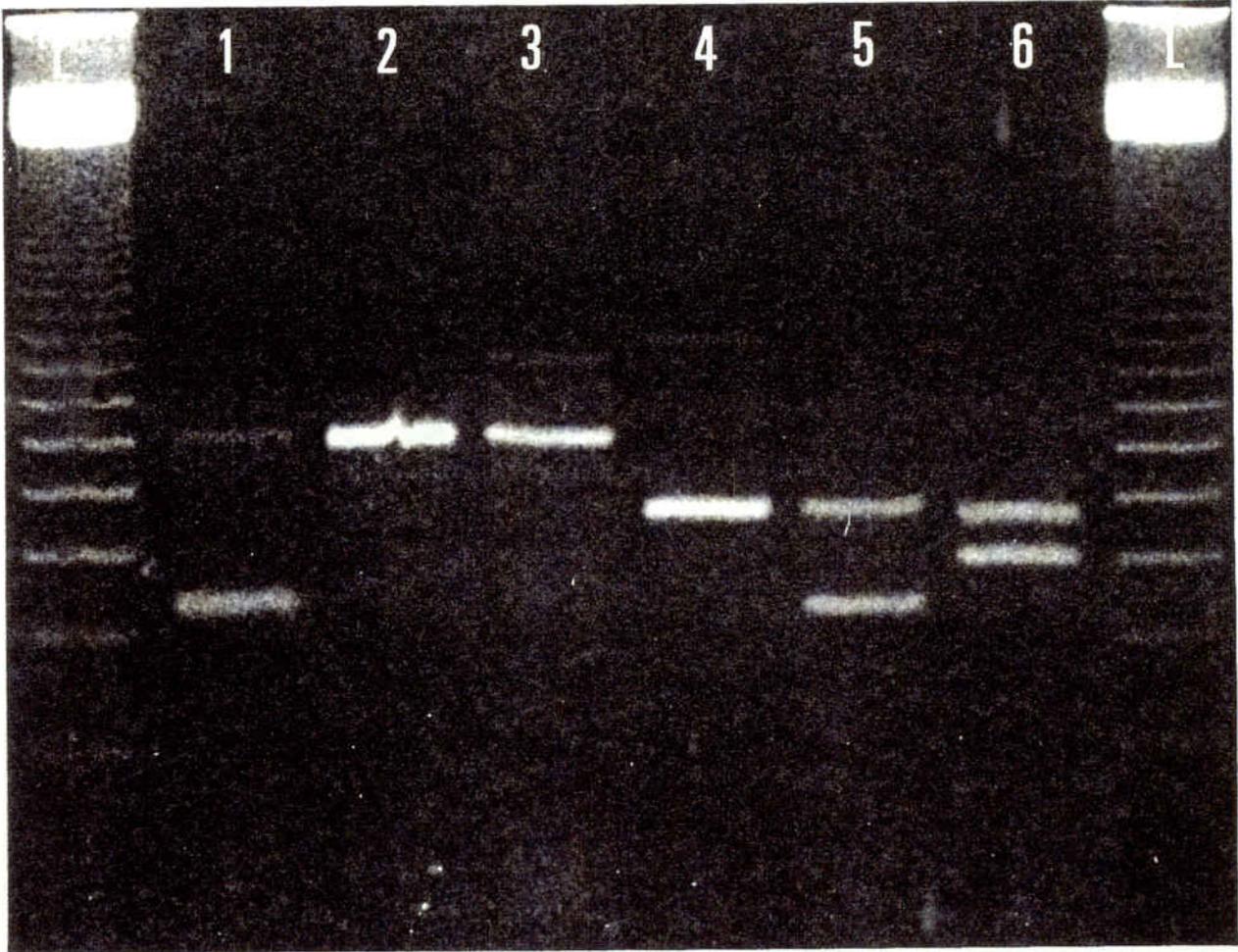


Fig.20. Electroforesis en gel de agarosa del polimorfismo YNZ22. Los fenotipos observados, de izquierda a derecha, son: 2-6; 6-6; 6-9; 4-10; 2-4; 3-4 (L=Ladder-100).

Fig. 21 Frecuencias alélicas del polimorfismo YNZ22 en 311 individuos de la población catalana.

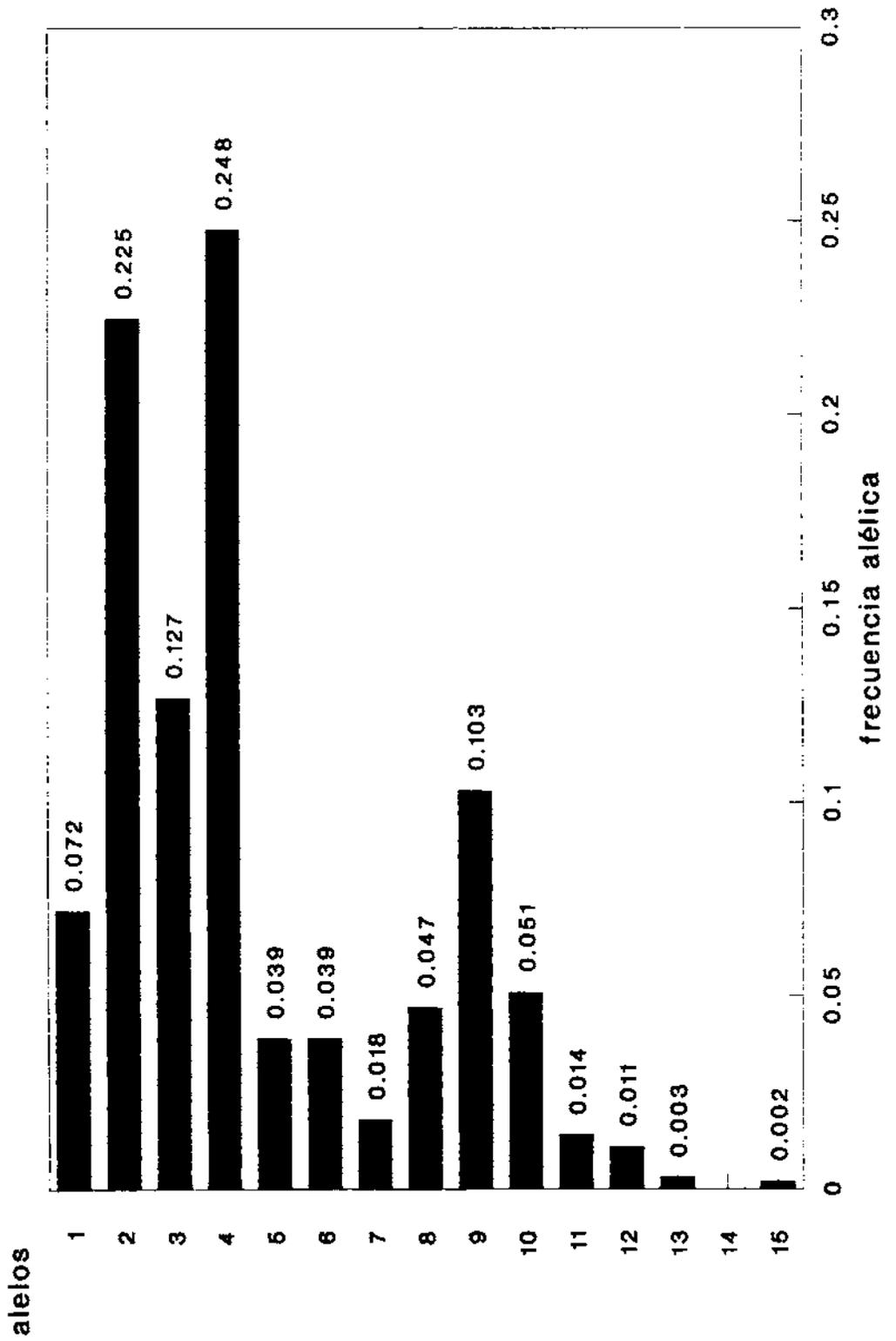


Fig. 22 Distribución alélica del polimorfismo YNZ22 en la población catalana y otras poblaciones europeas.

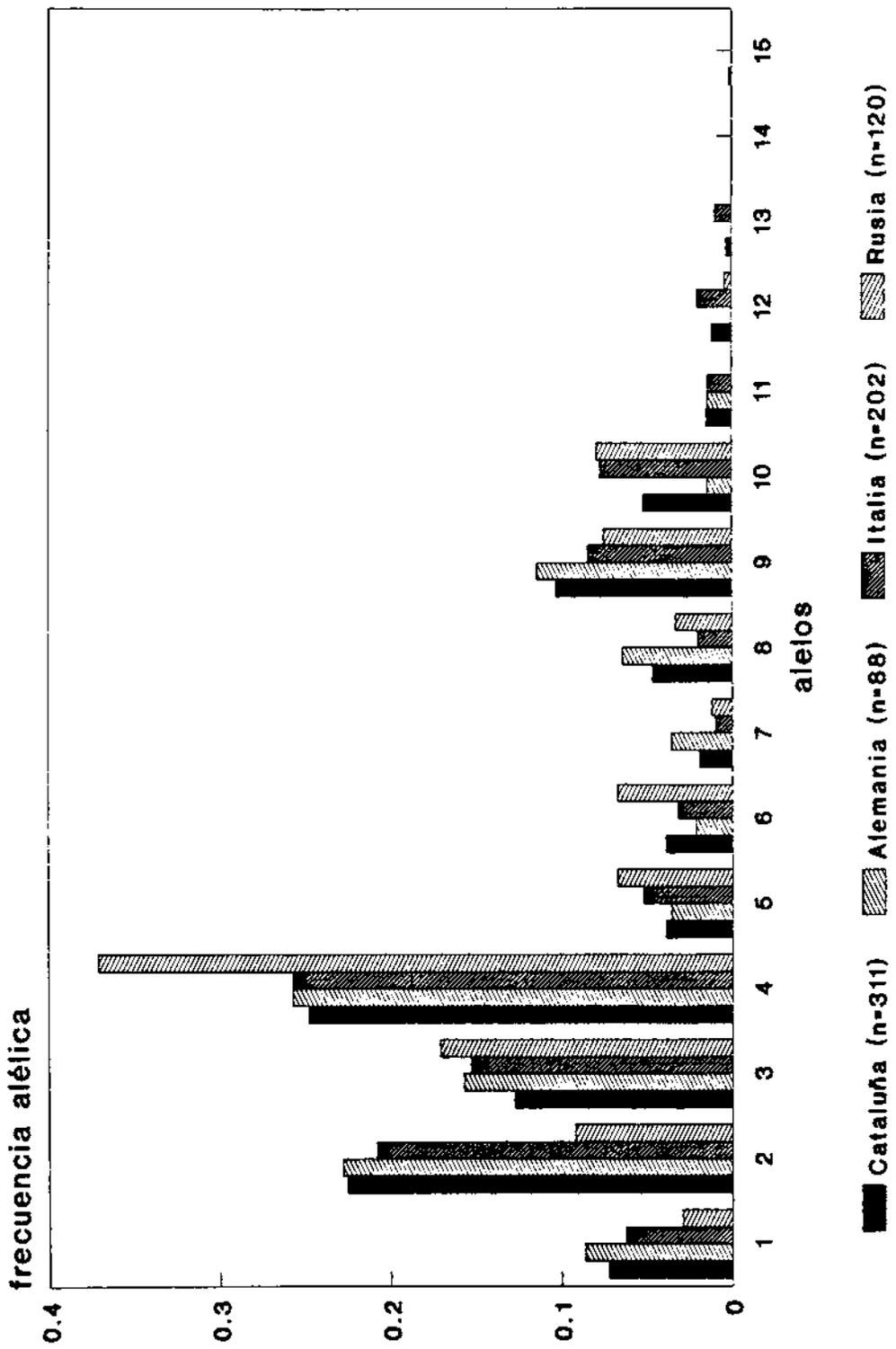


Fig. 23 Comparación de la distribución alélica de YNZ22 entre la población catalana y la de USA.

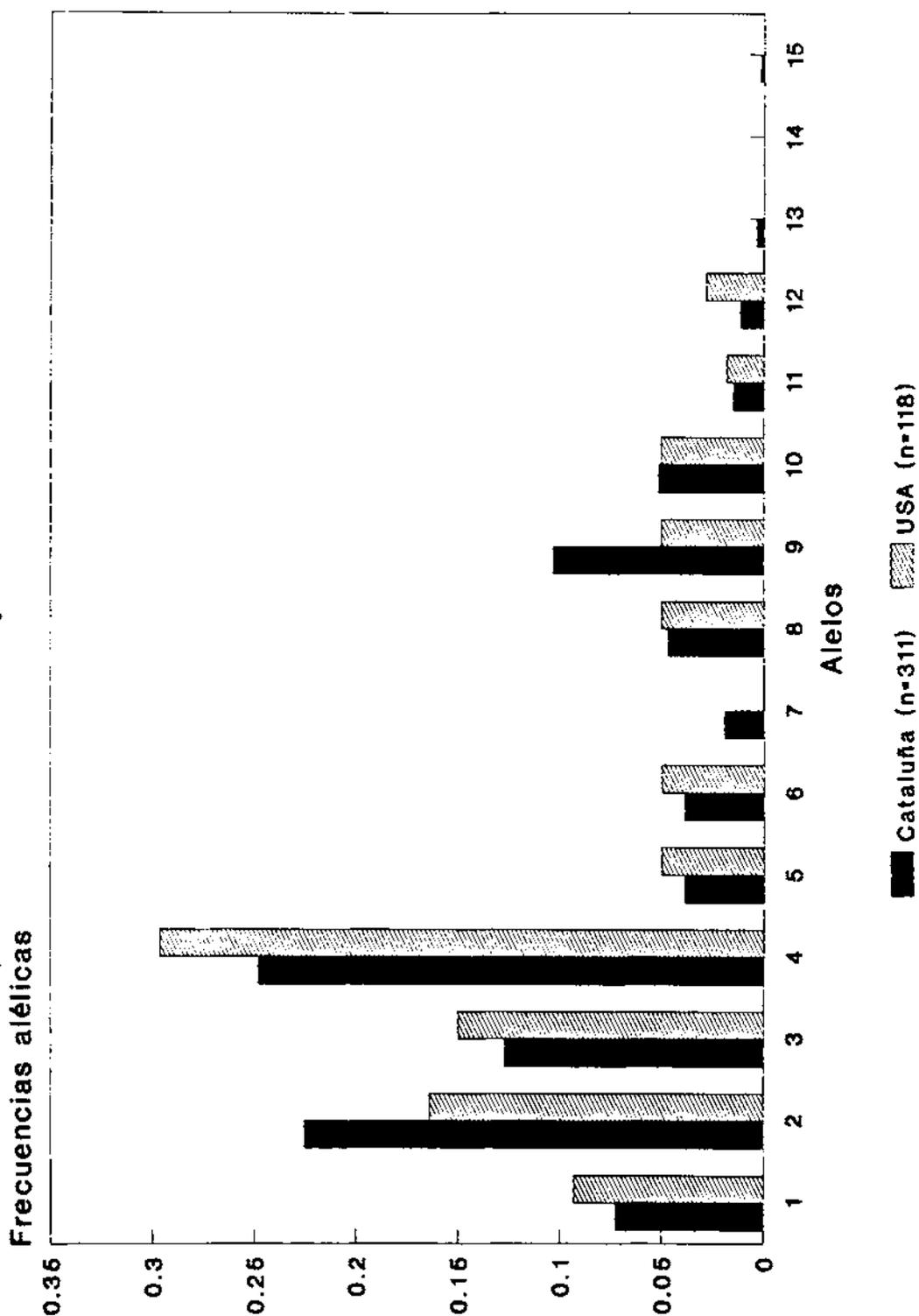


Fig. 24 Distribución alélica del polimorfismo YNZ22 en la población catalana y algunos grupos étnicos.

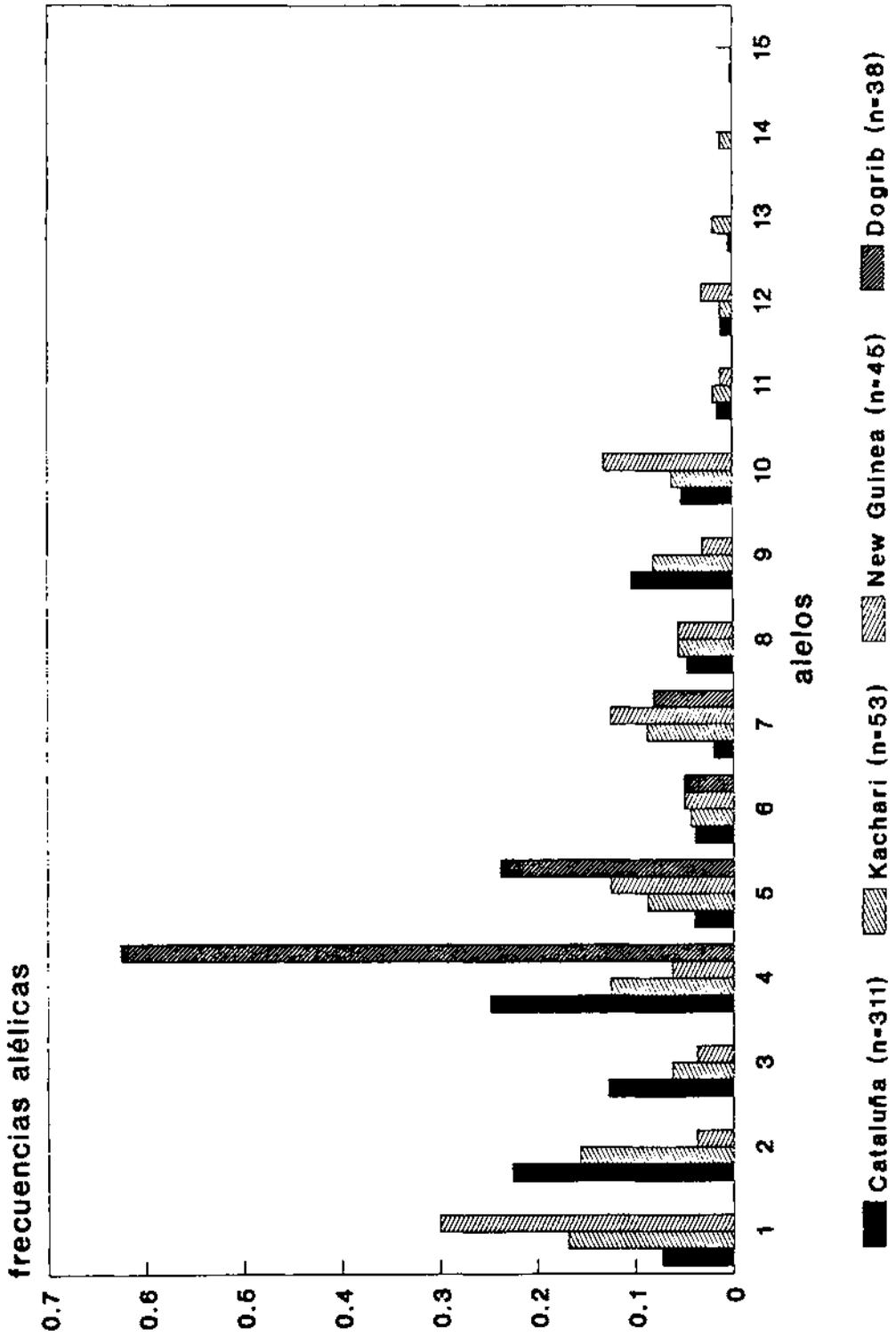
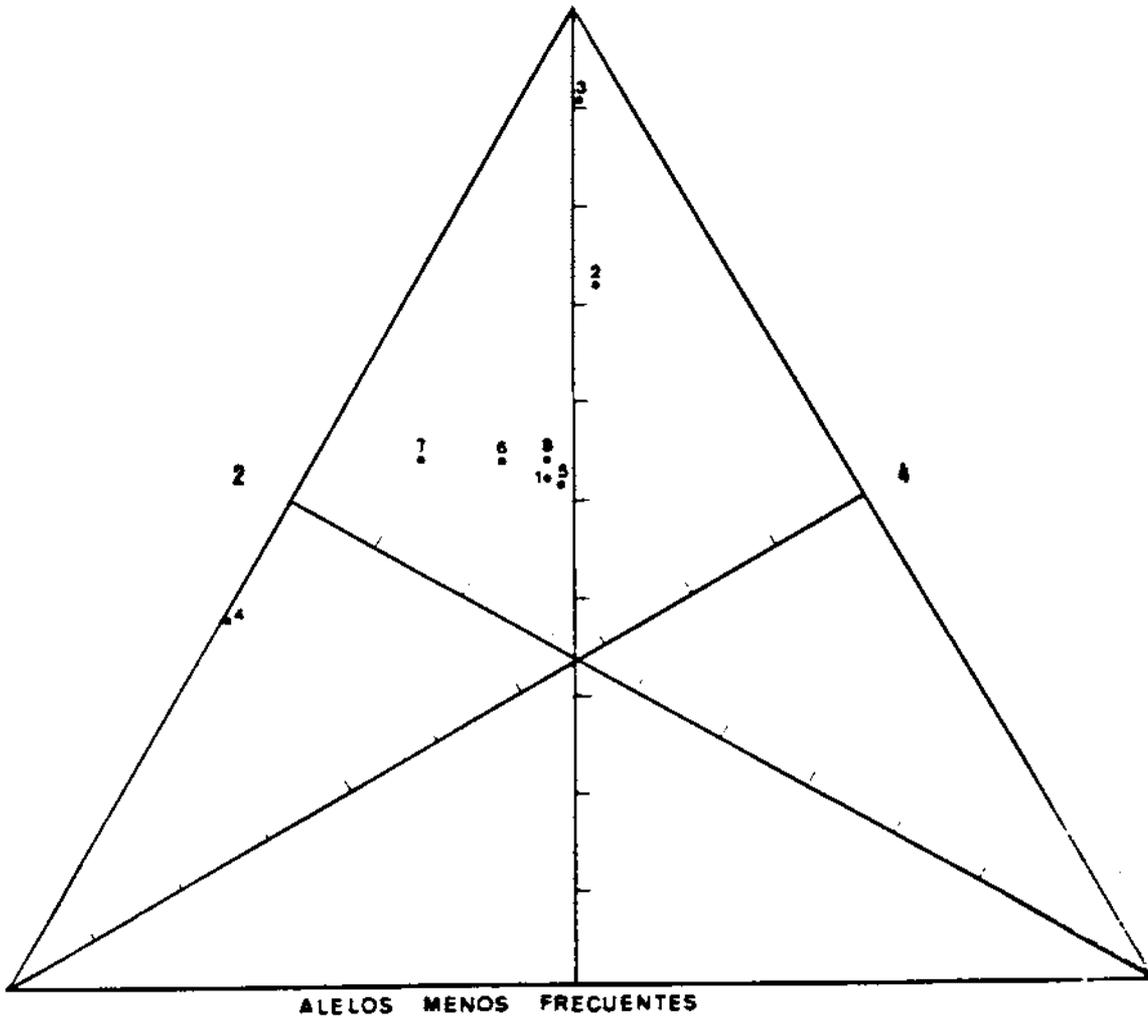


Fig. 25 Representación gráfica, mediante el triángulo de Streng, de las distancias génicas de YN222 entre la población catalana y algunas poblaciones mundiales.



1. Cataluña
2. Kachari (Deka R. y col. 1992)
3. New Guinea (Deka R. y col. 1992)
4. Dogrib (Deka R. y col. 1992)
5. Alemania (Rand S. y col. 1992)
6. USA (Rand S. y col. 1992)
7. Rusia (Chistyakov DA. y col. en prensa)
8. Italia (Tagliabracci A. y col. en prensa)

## 5. *DISCUSSION*

## 5. DISCUSION

### 5.1. Discusiones de tipo técnico.

#### *5.1.1. Obtención de linfocitos.*

La utilización de Histopaque (TM), en lugar de Ficoll Paque (TM), nos permite obtener no sólo los linfocitos, sino todos los leucocitos, disponiendo de este modo de más material (ADN) con el mismo volumen de sangre total.

#### *5.1.2. Extracción del ADN.*

Las muestras de las que partimos son variadas y su manipulación previa a la amplificación, varía en función de su naturaleza. Sin embargo, si existe la posibilidad de realizar una extracción fenólica del ADN, en lugar de utilizar una resina quelante tipo Chelex, es preferible, puesto que obtenemos una mayor cantidad de ADN que además podemos cuantificar perfectamente, y una muestra más pura. En el caso de muestras especiales, como las de pelo con raíz, el método Chelex es una buena solución por su sencillez y rapidez, así como por sus buenos resultados.

Los protocolos empleados de extracción fenólica, con las pequeñas modificaciones efectuadas, permiten obtener un ADN con un buen grado de pureza y calidad.

Para evitar la degradación del ADN durante la incubación con proteinasa-K y al mismo tiempo conseguir una buena lisis celular, el tiempo de incubación, a temperaturas entre 50 y 60°C, no debe superar las 2 horas, preferiblemente entre 45 minutos y 1 hora. Para la extracción de ADN a partir de muestras de semen, la adición de DTT facilita la destrucción del núcleo celular del espermatozoide y por lo tanto la obtención de una mayor cantidad de ADN.

### 5.1.3. La técnica PCR

Tanto la rapidez como la sencillez de esta técnica la hacen preferible, para el estudio de polimorfismos de ADN como los VNTR's, a la técnica de Southern-RFLP's, que requiere un proceso mucho más lento y laborioso. Un minisatélite, por PCR, se puede extraer, amplificar y tipar en una mañana de trabajo.

Por otro lado, al no ser habitualmente preciso utilizar marcadores radiactivos, hace que sea más segura para la salud del manipulador y económica. El caso de los STRs pueden ser una excepción.

Gracias a la PCR es posible amplificar fragmentos de ADN a partir de cantidades mínimas de muestra o de muestra degradada, siendo de gran utilidad en el campo de la criminalística.

La técnica de PCR tiene mayor poder de resolución que los RFLP's. Los polimorfismos, estudiados por RFLPs, cuyos alelos presentan un rango estrecho de tamaños, es decir, entre el alelo de mayor tamaño y el de menor hay una diferencia de pocos nucleótidos, pueden presentar problemas para su identificación. En el caso de los RFLPs es muy difícil discriminar dos alelos distintos si todos se encuentran en un rango estrecho de tamaños, y entre ellos hay una diferencia de pocos nucleótidos.

Uno de los principales inconvenientes es la enorme facilidad de contaminación del material y reactivos que se utilizan para las amplificaciones.

En ocasiones hay una amplificación preferencial de los alelos de menor tamaño cuando la diferencia de tamaño entre ellos es grande, dando lugar a una interpretación errónea del genotipo. De este modo se puede considerar como homocigoto lo que en realidad es un heterocigoto, y en estos casos podría ser conveniente corroborar los homocigotos secuenciando el fragmento amplificado, o empleando RFLP's. Nuevos instrumentos de la biotecnología, como la polimerasa Taq-extender

(Stratagene) capaz de amplificar fragmentos de gran tamaño, podrían obviar este problema.

#### 5.1.4. Amplificación.

Es importante alicuotar cada uno de los reactivos que van a emplearse en la amplificación, principalmente el tampón y el  $Mg_2Cl$ , ya que el hecho de congelarlos y descongelarlos los degrada impidiendo una perfecta amplificación.

Es muy importante que los "primers" y los dNTP's estén en suspensión completamente homogénea, para que la concentración empleada en cada amplificación sea la correcta.

#### D1S80

Es un polimorfismo que no presenta demasiados problemas en el proceso de amplificación, y tanto utilizando el kit comercial de amplificación de "Cetus" en el que está preparada la solución de reacción como añadiendo manualmente todos los elementos que intervienen en el proceso, los resultados son óptimos.

La visualización e identificación de los distintos alelos es muy objetiva y no presenta ambigüedades.

En ocasiones se observa una banda muy por encima del alelo más grande del marcador de talla y cuyo tamaño es de 900-1000 pb. Se podría pensar que es una banda adicional, "ghost," descrita en el protocolo como el resultado de la amplificación de una cantidad excesiva de ADN. Sin embargo, se encontró un caso de paternidad en el que la madre y el hijo compartían únicamente este alelo (Fig.26).

Por otro lado, este alelo de gran tamaño se ha encontrado en 5 individuos de los 425 tipados, lo que indica la posibilidad de que sea un alelo poco frecuente. Actualmente otros autores han descrito un alelo que podría corresponder al denominado R\* (Thymann M. y col. 1993).

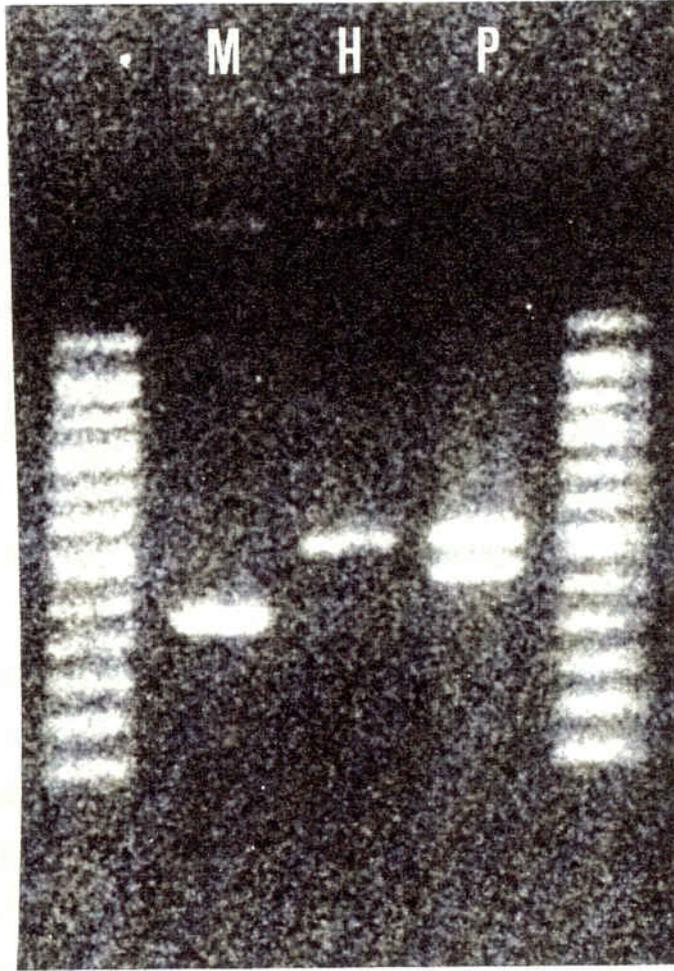


Fig.26. Electroforesis en gel de agarosa del polimorfismo D1S80 en un caso de paternidad en el que la madre y el hijo comparten el alelo R\* (M:21-R\*; H:25-R\*; P:23-25)

### 3' APO-B

La optimización del proceso de amplificación de este minisatélite ha sido más laboriosa que en el caso del VNTR D1S80.

La visualización e identificación de los alelos es objetiva y la resolución buena, de modo que pueden observarse alelos intermedios como el 30 y 36 que por otro lado no son muy frecuentes (Fig.27).

El moderado número de alelos que posee este sistema permite, sin mucha dificultad, elaborar marcadores alélicos generados con la agrupación de varias muestras, que facilitan enormemente la identificación alélica.

El elevado número de alelos descritos en este polimorfismo lo convierten en un marcador muy útil. Además tiene una eventual importancia desde el punto de vista clínico por la asociación entre alelos de gran tamaño 39, 45, 47 y 49 con coronariopatías de origen genético producidas por alteración de la apolipoproteína-B, que cursan con niveles elevados de colesterol y triglicéridos en suero (Friedl W. y col. 1990; Hegele RA. y col. 1986).

Actualmente existen "kits" comerciales para su estudio, pero no se ha considerado necesario su uso, debido a los buenos resultados obtenidos. Por otro lado, también existe la posibilidad de estudiar este marcador con un secuenciador automático, marcándolo con fluorescencia, pero sólo se ha considerado recomendable para alelos raros, como los intermedios de gran tamaño.

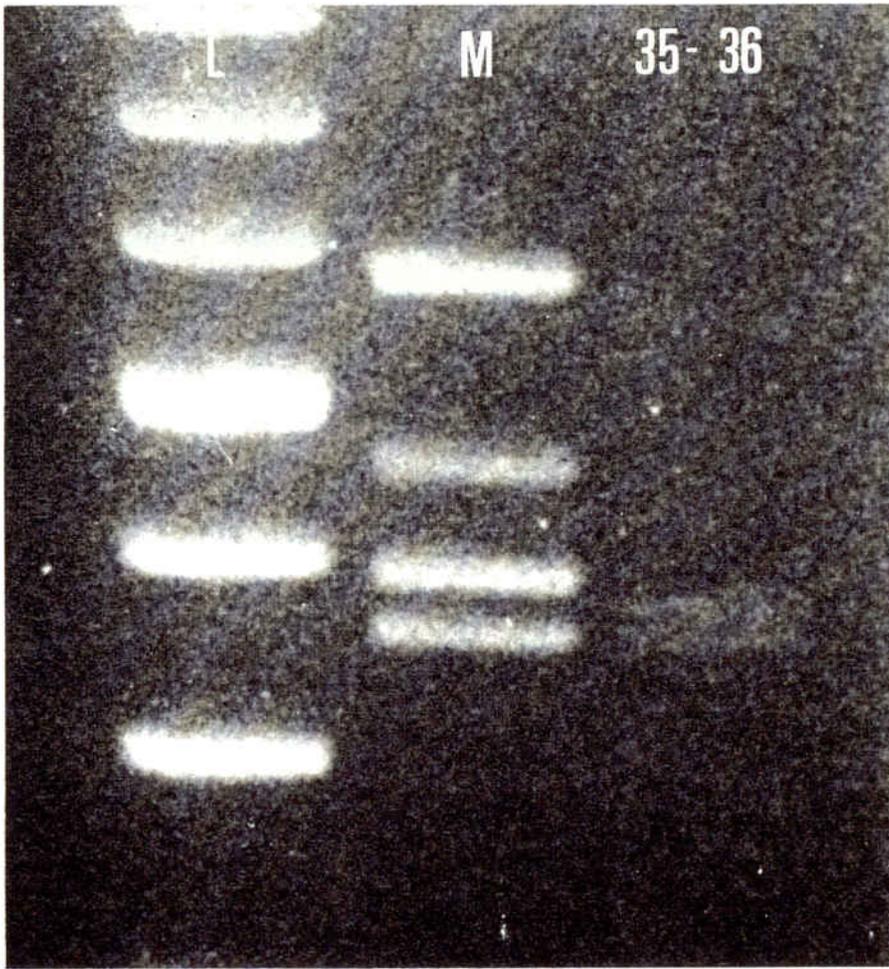


Fig.27. Electroforesis en gel de agarosa de un caso de alelo intermedio del polimorfismo 3'Apo-B. El fenotipo observado es 35-36.

YNZ22

Debido al gran tamaño que tiene la secuencia de repetición de este polimorfismo, los alelos de gran tamaño difieren mucho de los más pequeños. Esto supone un problema en el proceso de amplificación, ya que favorece la amplificación diferencial de los alelos de menor tamaño en función de los más grandes, y hay que trabajar prácticamente al límite de las posibilidades de amplificación por la técnica PCR. De todos modos, se ha conseguido optimizar la técnica de tal manera que la intensidad de las bandas es similar en alelos muy alejados entre sí en cuanto a tamaño (Fig.28).

La visualización e identificación de los alelos es muy objetiva.

El problema que se puede presentar en algún caso, es que al comparar con un marcador de talla comercial (de 100pb.) los tamaños de algunas bandas no se corresponden exactamente con él. Sería conveniente, en un futuro próximo, poder secuenciar los alelos de gran tamaño ya que existe la posibilidad de que entre las unidades de repetición se hallen nucleótidos intermedios (como ocurre con otros VNTRs, como la ACTBP2). La presencia de estos nucleótidos supone que la unidad de repetición tendrá un tamaño superior a los 70pb.

Deka R. (1992) describe unos alelos de gran tamaño, de 24 o 25 unidades de repetición, que no pueden ser amplificados por la técnica PCR y que dan falsos homocigotos. En este caso, se sugiere la comprobación de los fenotipos mediante la técnica "Southern blotting", o la utilización de una polimerasa que recientemente ha salido al mercado, Taq-extender, y que es capaz de amplificar fragmentos de gran tamaño. Sin embargo, en la población catalana se ha confirmado el equilibrio de Hardy-Weinberg con los tipajes realizados por PCR lo cual hace suponer que estos alelos de gran tamaño deben encontrarse con unas frecuencias muy bajas y pueden ser considerados como alelos raros.

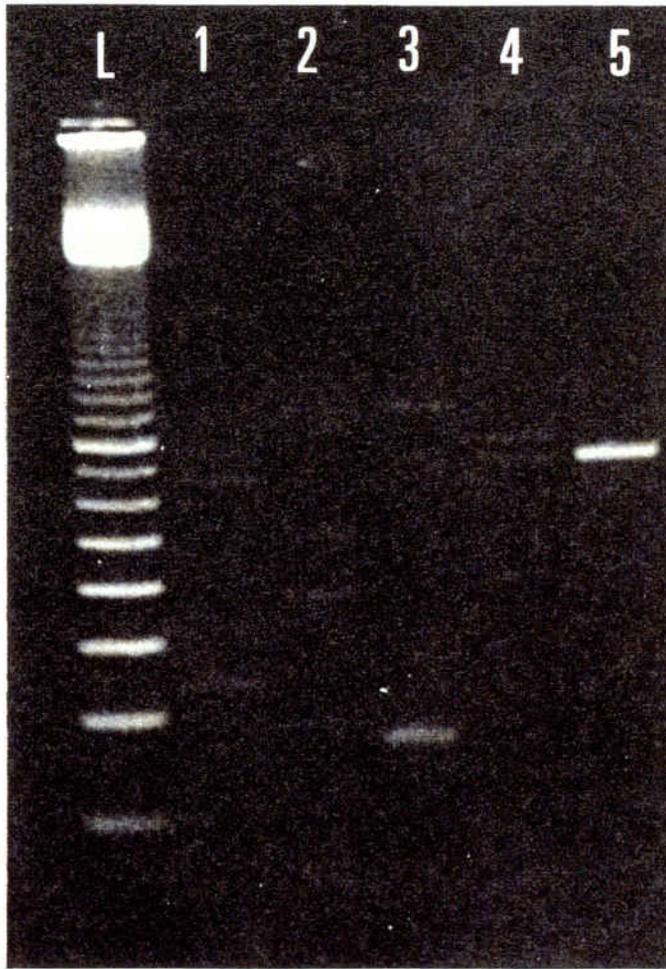


Fig.28. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación de YNZ22 de distintos individuos. De izquierda a derecha, los fenotipos son: 2-8; 4-6; 1-12; 9-10; 9-9. (L=Ladder-100).

#### 5.1.5. Electroforesis.

Para tipar los distintos VNTR's podemos utilizar los geles de agarosa o bien de poliacrilamida. Sin embargo, la utilización de la agarosa resulta más fácil y rápida de preparar y más manejable que la poliacrilamida.

Por otro lado con geles de agarosa se puede interrumpir la electroforesis en cualquier momento, efectuar una lectura y reanudarla posteriormente. Se pueden tipar más muestras a la vez y observar los genotipos a simple vista, sin necesidad de ampliar la imagen, como en el caso de los geles miniatura.

Los geles miniatura de poliacrilamida permiten la observación de los alelos en amplificaciones poco intensas, sin embargo hay un incremento del background que puede llevar a confusión.

Los geles de agarosa resultan más económicos, y lo que es más importante permiten un mayor rango de separación de las bandas que los de poliacrilamida, pudiéndose distinguir incluso los alelos intermedios de forma objetiva.

Los geles realizados con agarosa "SeaKem GTG" ofrecen una buena separación de los fragmentos, sin embargo, en casos de lectura dudosa se han realizado geles con

agarosa "Nusieve GTG" y "Metaphor" que proporcionan una mejor resolución y una imagen más nítida de las bandas. El principal problema que presentan, en especial la agarosa "Metaphor", es que los geles son muy frágiles, poco manejables y es difícil desprender el peine que forma los pozos, de modo que en muchas ocasiones éstos se rompen.

La concentración de agarosa empleada para tipar cada uno de los polimorfismos es distinta en función del rango de pares de bases entre los que se encuentran los alelos. En el caso de la YNZ22, cuyos alelos tienen de 168 a 1148 pb. es suficiente una concentración del 2% pero para la 3'ApoB o el D1S80 que tienen un rango más estrecho es necesaria una concentración mayor, de 2.5-3.5% para que las bandas queden bien separadas.

5.2. Comparación entre los polimorfismos de tamaño minisatélites y microsatélites, así como con polimorfismos de secuencia.

En base a la experiencia, en el laboratorio de Genética Forense de la Facultad de Medicina (Universidad de Barcelona), sobre distintos tipos de marcadores como los polimorfismos de secuencia (concretamente HLA DQ $\alpha$ ) y los de tamaño microsatélites (ACTBP2, TC11), se pueden aportar algunas consideraciones acerca de la mayor o menor utilidad de éstos sobre los minisatélites descritos.

Los polimorfismos de tamaño son mucho más polimórficos que los de secuencia, por lo que, en general, resultan más eficaces en la identificación individual. Pero, por otro lado, marcadores como HLA DQ $\alpha$ , tipados con sondas ASO, son mucho más reproducibles y no suelen presentar inconvenientes en la amplificación de muestras antiguas (principalmente al compararlo con el minisatélite YNZ22, que en ocasiones presenta un "smear" por degradación con la tendencia progresiva a la desaparición de alelos, especialmente los de mayor tamaño en heterocigotos con alelos de tamaños muy distintos). El marcador HLA DQ $\alpha$  es menos sensible a la degradación de las muestras a causa del pequeño tamaño del fragmento que se amplifica, propiedad que comparte con los STRs o microsatélites, por otro lado los

fragmentos generados degradados no interfieren en las hibridaciones de las amplificaciones correctas. Además la lectura de los distintos alelos y sus subtipos es realmente objetiva.

En cuanto a los polimorfismos de tamaño se refiere, cabe destacar la diferencia que existe entre los minisatélites y los microsatélites. Los últimos poseen la ventaja de tener unidades de repetición de 2 a 6 nucleótidos, lo que favorece la amplificación incluso en algunos casos donde la muestra esta muy degradada. Sin embargo, el tipaje de los microsatélites es más lento, laborioso, caro y puede requerir la utilización de nucleótidos marcados radiactivamente. En ocasiones se puede realizar el tipaje mediante "Silver stain" y actualmente, gracias a equipos como los secuenciadores automáticos, es posible tipar microsatélites marcándolos con fluorescencia y de ese modo se evitan los productos radiactivos.

5.3. Discusiones sobre el método estadístico.

5.3.1 Muestreo.

Los VNTR's, a diferencia de los marcadores convencionales, son altamente polimórficos y ello plantea serios problemas en el momento de decidir el tamaño de la muestra de la población a estudiar.

Debido al elevado número de alelos, de los cuales algunos se presentan de forma muy frecuente y otros muy rara, sería preciso trabajar con un número de individuos muy alto (decenas de miles de individuos). Sin embargo, esta solución no es factible, ni desde el punto de vista práctico ni económico. Puesto que según la bibliografía consultada, autores renombrados como Budowle B.(1991) o Boerwinkle E.(1989), que trabajan con los mismos polimorfismos, presentan muestras de 99 y 125 individuos respectivamente, podemos pensar que una muestra de  $n=425(D1S80)$ ,  $n=308(3'ApoB)$  y  $n=311(YNZ22)$  es suficientemente representativa de la población estudiada, además de la confirmación estadística otorgada matemáticamente por cumplir el equilibrio de Hardy-Weinberg.

5.3.2. *Obtención de las frecuencias.*

Se observa una marcada diferencia entre los alelos que se presentan muy frecuentemente y los que no se presentan o lo hacen con una frecuencia muy baja, no se observa una continuidad lo cual hace pensar que por razones de selección hay alelos muy favorables y otros que se van perdiendo.

5.3.3. *Tratamiento de los datos obtenidos.*

Puesto que la población estudiada no es demasiado heterogénea las frecuencias alélicas se encontraran en equilibrio si el estudio poblacional es suficientemente amplio. Algunos fenotipos favorecen la desviación del equilibrio ya que sus frecuencias son extremadamente bajas y los marcadores muy polimórficos, por este motivo la aplicación del test de la  $\chi^2$  no es posible si no se adoptan algunas medidas estadísticamente aceptables.

En base a las propuestas realizadas por Budowle B. (1991) y Chakraborty R . (1991) se han realizado agrupaciones de los fenotipos observados para evitar frecuencias excesivamente bajas. Siguiendo este método se puede comprobar que la población de Cataluña se encuentra en equilibrio para todos los marcadores estudiados.

#### 5.4. Consideraciones genético-poblacionales.

##### 5.4.1. Heterocigosidad.

El elevado índice de heterocigosidad que se observa en los tres marcadores: D1S80 77.64%, 3'Apo-B 80.84% y YNZ22 81.35%, indica lo altamente polimórficos que son, y por lo tanto su elevado poder de discriminación genético individual.

Estos marcadores presentan un índice de heterocigosidad mucho mayor que otros polimorfismos estudiados en el laboratorio de Genética Forense, como la GC 57.6%, Tf 37.3%, Pi 57.5%, etc.

##### 5.4.2. Comparación de poblaciones.

#### D1S80

Este polimorfismo ha sido estudiado en numerosas poblaciones europeas y en prácticamente todas ellas la característica común con la población catalana es la presencia de dos alelos mayoritarios: el 18 y el 24. Sin embargo, la distribución del resto de alelos es similar a Cataluña en poblaciones como la de Alemania (Schnee-Griese J. y col. 1993), Suiza (Kratzer A. y col. en prensa) y Dinamarca (Thymann M. y col. 1993) y algo menos parecida a la de Rusia (Chystiakov DA. y col. en

prensa), donde no se han observado ni alelos de tamaño inferior al 18 ni superior al 31. En otras poblaciones europeas, como Finlandia (Sajantila A. y col. 1992), Suecia (Langö A. y col. en prensa) y Holanda (Kloosterman AD. y col. 1993), incluso mediterráneas como Italia (Tagliabracci A. y col. en prensa; Novelli G. y col. 1992) las frecuencia alélicas difieren notablemente de las de la población catalana. En el caso de Italia (Novelli G. y col. 1992) los alelos más frecuentes son el 26 y 28 siendo el alelo 18 no muy frecuente respecto al resto.

En cualquier caso, se puede considerar que es un polimorfismo útil para el diagnóstico de grupos raciales, lo cual aumenta su aplicabilidad en el diagnóstico forense criminalístico. En países como EEUU éste es un factor importante debido a la heterogeneidad racial que tienen.

### **3' APO-B**

Este marcador ha sido estudiado en numerosas poblaciones lo que ha permitido la comparación de la población catalana estudiada con ellas. Tanto en Cataluña como en poblaciones europeas como Alemania (Schnee-Griese J. y col. 1991), Francia (Boerwinkle E. y col. 1989), Grecia (De Benedictis G. y col. en prensa), Albania (De Benedictis G. y col. en prensa) Italia "Sur

y Centro" (d'Aloja E. y col. 1992) y Austria (Ludwig EH. y col. 1989) los alelos más frecuentes, con diferencia, son el 35 y 37 que representan aproximadamente el 60% de los alelos observados, siendo el 31, 47 y 49 otros alelos también muy comunes presentes en todas estas poblaciones. A pesar de la uniformidad de estas poblaciones europeas existen alelos presentes en algunas de ellas de los que carecen el resto, como es el caso de Grecia en la que se observa el alelo 23, Albania el 21 y Austria el 26, mientras que todas las poblaciones europeas estudiadas carecen del alelo 55 encontrado en la población catalana.

En el caso de Suecia (Renges HH. y col. 1992), Rusia (Chistyakov DA. y col. en prensa) y China (Evans AE. y col. 1993), aunque los alelos mayoritarios son también el 35 y 37, el resto se encuentran en unas frecuencias algo distintas siendo las diferencias más acusadas en el caso de la población de Rusia.

Otras poblaciones como la de Japón (Higashimori K. y col. 1992) o India (Renges HH. y col. 1992) carecen de algunos alelos pero presentan otros de menor número de repeticiones como el alelo 27 en Japón o el 15 y 17 en la India.

Se han estudiado algunos grupos étnicos (Deka R. y col. 1992) en los que se observan marcadas diferencias poblacionales. En el caso de los indios Dogrib del

Canadá sólo se observan 5 alelos (35, 37, 43, 45 y 47) y la población de las tierras altas de Papúa en New Guinea 4 (33, 35, 37 y 45). Aunque en todos ellos los alelos mayoritarios son el 35 y 37 que juntos constituyen entre el 63% y el 79% del total y el resto de alelos son muy poco frecuentes. De todos modos el número de individuos estudiados en estas poblaciones es muy pequeño, y probablemente no muy representativo de las mismas.

#### YNZ22

La comparación de las frecuencias alélicas obtenidas en la población catalana con las de otras poblaciones indica que en poblaciones como la de Alemania (Rand S. y col. 1992) o Italia (Tagliabracci A. y col. en prensa) presentan una distribución alélica muy similar a la de Cataluña, siendo los alelos 2 y 4, que juntos constituyen casi el 50% del total, los más frecuentes.

Por otro lado, la población de USA (Rand S. y col. 1992) difiere ligeramente de las europeas estudiadas, en este caso los alelos 2 y 3 son igualmente frecuentes. En el caso de Rusia (Chistyakov DA. y col. en prensa) la diferencia es aún más acusada y los alelos más frecuentes son el 3 y 4.

---

Estudios en grupos étnicos como los Kachari (Noreste de la India), New Guinea (tierras altas de Papúa) y los indios Dogrib (Canadá), estudiados por Deka R. y col. 1992, muestran diferencias muy marcadas, no sólo con la población catalana sino también entre ellos. Así pues la población de los Dogrib únicamente presenta un total de 4 alelos: 4, 5, 6 y 7, siendo el 4 y 5 los mayoritarios y con un índice de heterocigosidad relativamente bajo (54%). En el caso de New Guinea el alelo más frecuente es el 1 y para la población Kachari el 1, 2 y 4.

### 5.5 Aspectos médico-legales

#### *5.5.1. Investigación de la paternidad.*

Tanto para la afirmación de la paternidad como en el caso de exclusión, los marcadores estudiados son de gran utilidad debido a lo polimórficos que son y a la elevada probabilidad de exclusión a priori de cada uno de ellos, así como al valor medio del valor  $W$  de probabilidad de paternidad de todos los casos posibles para cada marcador.

Es preciso mencionar que en el caso del minisatélite YNZ22 hay que ser cauteloso con las exclusiones de segundo orden, en las que el presunto padre y el hijo presentan fenotipos distintos pero homocigotos los dos, y de pocas unidades de repetición. Podría tratarse de

dos heterocigotos cuya banda compartida no es otra que un alelo de gran tamaño (descrito por Deka R. 1992) que no es posible amplificar por PCR. Este es un suceso poco probable, pero que en el caso de ocurrir no sólo no se trataría de una exclusión, sino que dispararía enormemente el valor de W.

Por otro lado los casos de paternidad estudiados han podido ser corroborados con marcadores tradicionalmente utilizados. Siendo las afirmaciones con valores de W superiores a 99.73% y las exclusiones corroboradas por incompatibilidades alélicas.

#### 5.5.2. Criminalística

El tipaje de los minisatélites estudiados puede realizarse incluso en muestras de cierta antigüedad y que han estado sometidas a distintas condiciones ambientales. Ello hace posible su aplicación en el campo de la criminalística donde las muestras recogidas en el lugar de los hechos puede encontrarse en distintas formas y condiciones.

Sin embargo, tanto el marcador D1S80 como el 3'ApoB al tener las unidades de repetición más pequeñas son más difícilmente degradables y por tanto su amplificación en muestras antiguas es más reproducible. En el caso de YN222 los resultados de la amplificación no son siempre

idóneos. Con los métodos descritos se han podido tipar manchas con antigüedades de hasta 4 o 5 años, comprobándose que con la antigüedad se incrementa la degradación que se observa en forma de "smear" o barrido en la línea de electroforesis. En el caso de las muestras heterocigotas se pierde en primer lugar la banda de mayor tamaño confundándose con homocigotos.

Hay que tener en cuenta que otros polimorfismos de PCR, estudiados hasta el momento en el laboratorio de Medicina Legal, como el de secuencia HLA-DQ $\alpha$  por sondas ASO y los STRs (SE33 y TC11) son mucho más útiles puesto que son menos sensibles a la degradación de la muestra.

## 6. CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR es hoy por hoy una de las mejores herramientas de trabajo en el campo de la biología molecular por su sencillez, rapidez y efectividad.

Su aplicación a la Medicina Legal ha hecho posible prescindir de otras técnicas de identificación más laboriosas y con menor poder de discriminación.

2. El tipaje de los minisatélites estudiados resulta más cómodo, económico y, lo que es más importante, con mayor poder de separación si se realiza con geles submarinos de agarosa de concentraciones entre el 2-3% según el polimorfismo que se observa.

3. D1S80: En el sistema D1S80 existe un alelo de 900-1000 pb. que no ha sido descrito anteriormente, y que no es suficientemente grande para ser considerado como la conocida banda "ghost" descrita en algunos protocolos y trabajos.

4. 3' Apo-B: Se han observado alelos intermedios, con un número par de unidades de repetición, en el polimorfismo 3'Apo B de la población estudiada.

5.YNZ22: El polimorfismo YNZ22 es el más problemático principalmente en muestras antiguas por el hecho de tener unidades de repetición relativamente grandes, lo que las hace más fácilmente degradables y los alelos grandes pueden perderse debido a la amplificación preferencial de los alelos de menor tamaño. Sin embargo, su lectura fenotípica es muy clara y objetiva.

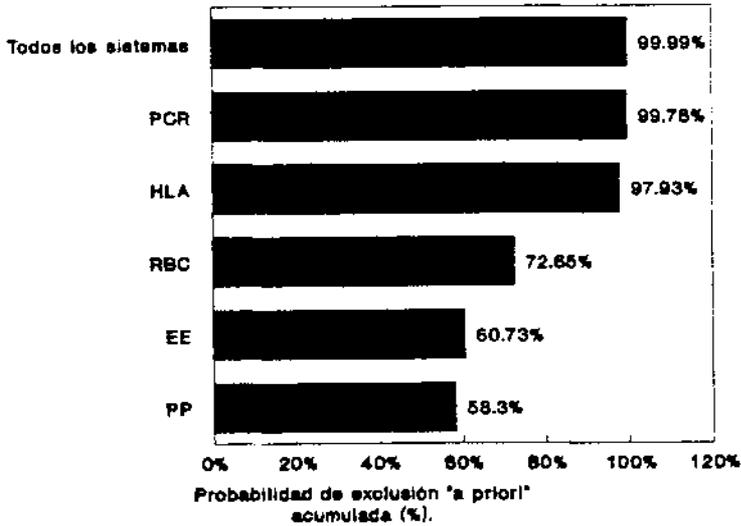
6.Comparación entre sí: La mayor probabilidad de exclusión a priori, y por tanto la mayor efectividad en una exclusión de paternidad, se obtiene con el minisatélite YNZ22 de modo que el orden de mayor a menor será: YNZ22, D1S80 y 3'APO-B.

La eficiencia bioestadística tiene una relación inversa en cuanto a la utilidad de un sistema en lo que se refiere a la afirmación de la paternidad de modo que el marcador más eficaz será: D1S80 seguido de YNZ22 y 3'APO-B.

El minisatélite YNZ22 es el que presenta un menor índice de heterocigosidad, respecto al los otros dos, y por lo tanto el menos polimórfico.

7. **Valores acumulados:** Los valores de la probabilidad de exclusión "a priori" acumulada de 95.879% y la eficiencia bioestadística acumulada de 8.23078 son un indicativo de la gran utilidad de estos marcadores en investigación biológica de la paternidad.

Si se compara con otros tipos de polimorfismos utilizados en el laboratorio de genética forense, se puede observar que los marcadores realizados por la técnica PCR tienen una probabilidad de exclusión "a priori" acumulada muy alta:



8. La probabilidad de discriminación total es de 0.999845, y ello hace que sean de gran utilidad en la identificación genética individual muy importante en el campo de la criminalística.

9. Como herramientas de trabajo en el campo de la criminalística son marcadores en los que se ha comprobado su eficiencia en muestras con antigüedades de hasta 4 o 5 años mantenidas en muy diversas condiciones ambientales. Entre los estudiados se puede decir que el menos eficaz es el polimorfismo YNZ22.

10. En genética poblacional se observa que los polimorfismos 3' APO-B y YNZ22 son buenos marcadores de poblaciones ya que difieren notablemente entre distintos grupos étnicos estudiados y se mantienen bastante uniformes en poblaciones no muy alejadas entre ellas como son las europeas. Aún así, no pueden considerarse como marcadores de diagnóstico de grupos raciales.

7. BIBLIOGRAFIA

ALDHOUS P. (1992)

Challenge to British forensic database.

Nature 35: 51-91

ALTMAN DG. (1992)

Practical statistics for medical research.

1<sup>st</sup> Ed. Chapman & Hall. London, Glasgow, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.

ARMOUR JA. WONG Z. WILSON V. ROYLE NJ. JEFFREYS AJ.  
(1989)

Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeat elements.

Nuc. Ac. Res. 17(13): 4925-4935

ARMOUR JA. CROISIER M. JEFFREYS AJ. (1992)

Human minisatellite alleles detectable only after PCR amplification.

Genomics 12: 116-124

AUXBEL FM. BRENT R. KINGSTON RE. MOORE DD. SEIDMAN JG.  
SMITH JA. STRUHL K. (eds.) (1987)

Current Protocols in Molecular Biology

Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New  
York.

BARROS F. LAREU MV. CARRACEDO A. (1992)

Detection of polymorphisms of human DNA after polymerase  
chain reaction by miniaturized SDS-PAGE.

Forensic Sci. Int. 55: 27-36

BATANIAN JR. LEDBETTER SA. WOLFF RK. NAKAMURA Y. WHITE  
R. DOBYNS WB. y col. (1990)

Rapid diagnosis of Miller-Dieker syndrome and isolated  
lissencephaly sequence by the polymerase chain reaction.

Hum. Gen. 85: 555-559

BECKMANN JS. WEBER JL. (1992)

Survey of human and rat microsatellites.

Genomics 12: 627-631

BENEDICTIS G. ROSE G. FALCONE E. SEMINO O. DE LUCA M.  
SPADAFORA P. y col. (en prensa)

Population genetics of VNTR markers (TPO and 3'APO B  
loci) in the Mediterranean area (Albania, Greece and  
Italy).

Advances in Forensic Haemogenetics 5. Springer-Verlag.  
(in press)

BLACKHART BD. LUDWIG EM. PIEROTTI VR. CAIATI L. ONASCH  
MA. WALLIS SC. y col. (1986)

Structure of the human apolipoprotein B gene.

J.Biol.Chem. 261(33): 15364-15367

BOEHNKE M. (1991)

Allele frequency estimation from data on relatives.

Am.J.Hum.Gen. 48: 22-25

BOERWINKLE E. XIONG W. FOUREST E. CHAN L. (1989)

Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by  
the polymerase chain reaction: application to the  
apolipoprotein B-3' hypervariable region.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 212-216

BONNET EPF. (1980)

Medicina Legal.

2ª Ed. López Libreros Editores, Buenos Aires.

BRINKMANN B. RAND S. BAJANOWSKI T. (1992)

Forensic identification of urine samples.

Int.J.Leg.Med. 105: 59-61

BUDOWLE B. CHAKRABORTY R. GIUSTI AM. EISENBERG AJ. ALLEN  
RC. (1991)

Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by  
high-resolution PAGE.

Am.J.Hum.Genet. 48: 137-144

CAEIRO JL. CANABAL O. (1988)

Aspectos genético-poblacionales.

En: HUGUET E., CARRACEDO A., GENE M. Introducción a la investigación biológica de la paternidad.

1ª Ed. PPU, Barcelona. pp. 52-65

CAMBIEN F. EVANS AE. CAMBOU JP. ARVEILER D. LUC G.  
MOREEL JFR. y col. (1992)

Body mass is associated with myocardial infarction in individuals carrying the 48 repeats allele of the Apo B3' hypervariable region.

Am.J.Hum.Genet. 51:A-146

CARRACEDO A. HUGUET E. BARROS F. (1988)

Parámetros estadísticos en la investigación biológica de la paternidad. Exclusión y prueba positiva de paternidad.

En: HUGUET E., CARRACEDO A., GENE M. Introducción a la investigación biológica de la paternidad.

1ª Ed. PPU, Barcelona. 171-188

CAVALLI-SFORZA LL. BODMER WF. (1971)

The genetics of human populations.

1ª Ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

CHAKRABORTY R. FORNAGE M. GUEGUEN R. BOERWINKLE E.  
(1991)

Population genetics of hypervariable loci: Analysis of  
PCR based VNTR polymorphism within a population.

En: BURKE T. DOLF G. JEFFREYS AJ. WOLFF R.(eds.). DNA  
Fingerprinting: Approaches and Applications.

Birkhäuser Verlag. Basel, Boston, Berlin. 127-143

CHISTYAKOV DA. EFREMOV IA. GAVRILOV DK. NOSIKOV VV. (en  
prensa)

Study of allele polymorphism of 5 hypervariable regions  
in a russian population and its application to paternity  
tests.

Advances in Forensic Haemogenetics 5.  
Springer-Verlag.(in press)

D'ALOJA E. DOBOSZ M. PESCARMONA M. MOSCETTI A. PASCALI  
VL. (1992)

Gene frequencies of APOB alleles in a sample of random  
Italian individuals (Central and Southern Italy).

Advances in Forensic Haemogenetics 4. Springer-Verlag,  
Berlin, Heidelberg.

DECORTE R. MARYNEN P. CASSIMAN JJ. (1993)

High-speed automated detection of PCR-amplified VNTR  
alleles: application to the apolipoprotein B 3'  
hypervariable region.

J.Chromat.Electroph.Sep.Tech. 37 (1): 1-4

DEKA R. DE CROO S. MEI YU L. FERRELL RE. (1992)

Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations.

Hum.Gen. 90: 86-90

DEKA R. CHAKRABORTY R. DE CROO S. ROTHHAMMER F. BARTON S.A. FERRELL RE. (1992)

Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipoprotein B gene in five human populations.

Am.J.Hum.Genet. 51: 1325-1333

DIKES DD. (1985)

Detection of red cell enzyme and serum protein polymorphisms in bloodstains.

En: ROLIH SD. JUDD WJ.(eds.) Serological methods in forensic science.

American Association of Blood Banks. Arlington, Virginia.

DOBYNS WB. CURRY CJR. HOYME HE. TURLINGTON L. LEDBETTER DH. (1991)

Clinical and molecular diagnosis of Miller-Dieker syndrome.

Am.J.Hum.Gen. 48: 584-594

DOBZHANSKY T. (1978)

Diversidad genética e igualdad humana.

1ªEd. Labor, Barcelona.

EDWARDS A. CIVITELLO A. HAMMOND HA. CASKEY CT. (1991)

DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats.

Am.J.Hum.Gen. 49: 746-756

EDWARDS A. HAMMOND HA. JIN L. CASKEY CT. CHAKRABORTY R.

(1992)

Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups.

Genomics 12: 241-253

EVANS AE. ZHANG W. MOREEL JFR. BARD JM. RICARD S.

POIRIER O. y col. (1993)

Polymorphisms of the apolipoprotein B and E genes and their relationship to plasma lipid variables in healthy chinese men.

Hum.Genet. 92: 191-197

FERRELL R.E. (1992)

Characteristics of polymorphism at a VNTR locus 3' to the apolipoprotein B gene in five human populations.

Am.J.Hum.Genet. 51: 1325-1333

FRIEDL W. LUDWIG EH. PAULWEBER B. SANDHOFER F. MCCARTHY BJ. (1990)

Hypervariability in a minisatellite 3' of the apolipoprotein B gene in patients with coronary heart disease compared with normal controls.

J.Lipid Res. 31: 659-665

GASPARINI P. TRABETTI E. SAVOIA A. MARIGO M. PIGNATTI PF. (1990)

Frecuency distribution of the alleles of several variable number of tandem repeat DNA polymorphisms in the italian population.

Hum.Hered. 40: 61-68

GECZ J. (1991)

PCR amplification of large VNTR alleles of D17S5 (YNZ22) locus.

Nuc.Ac.Res. 19(20): 5806

GELFAND DH. WHITE TJ. (1990)

Thermostable DNA polymerases.

En: INNIS MA., GELFAND DH., SNINSKY JJ., WHITE TJ. PCR Protocols. A guide to methods and applications.

1<sup>a</sup> Ed. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 129-142

GENE M. HUGUET E. MEDALLO J. CORBELLA J. MEZQUITA J.  
(1991)

Aplicación de la sonda YNH24 en investigación biológica  
de la paternidad.

Abstr. XV Congreso de la Academia Internacional de  
Medicina Legal y de Medicina Social. 53

GENE M. HUGUET E. MEZQUITA J. (1991)

Polimorfismo del DNA en la investigación de la  
paternidad. Estado actual.

Med.Clin. 97(3):110-114

GENE M. HUGUET E. CORBELLA J. (1993)

Recents aportacions de la biologia molecular a la  
identificació humana.

R.Acad.Med.Catalunya 7(3): 157-160

GENE M. MORENO P. HUGUET E. CORBELLA J. MEZQUITA J.  
(1993)

D1S80 polymorphism, including a new variant, in a  
population sample from Barcelona (Spain) using  
Polymerase Chain Reaction.

Am.J.Hum.Biol. 5: 691-695

GIORGETTI R. TAGLIABRACCI A. AGOSTINI A. CINGOLANI M.  
FERRARA SD. (1991)

Suitability of PCR methods for forensic investigation.

Int.J.Leg.Med. 104: 243-246

GREMO A. (1988)

Estudios de polimorfismos genéticos de la población madrileña y su aplicación en la investigación biológica de la paternidad. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

HEGELE RA. HUANG LS. HERBERT PN. BLUM CB. BURING JE.  
HENNEKENS CH. y col. (1986)

Apolipoprotein B gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction.

New Engl.J.Med. 315(24): 1509-1515

HELMINEN P. SAJANTILA A. JOHNSON V. LUKKA M. EHNHOLM C.  
PELTONEN L. (1992)

Amplification of three hypervariable DNA regions by polymerase chain reaction for paternity determinations: comparison with conventional methods and DNA fingerprinting.

Mol.Cel.Probes 6: 21-26

HIGASHIMORI K. HIGAKI J. MIKI T. KAMITANI A. MIKAMI H.  
KUMAHARA Y. y col. (1992)

Analysis of the apolipoprotein B3' hypervariable region in patients with essential hypertension.

Clin.Environ.Pharm.Physiol. 19 (Suppl.20): 21-23

HIGUCHI R. VON BEROLDINGEN CH. SENSABAUGH GF. ERLICH HA.  
(1998)

DNA typing from single hairs.

Nature 332(7): 543-546

HIGUCHI R. BLAKE ET. (1989)

Applications of the polymerase chain reaction in  
forensic science.

En: BALLANTYNE J., SENSABAUGH G., WITKOWSKI J. DNA  
technology and forensic science.

1ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring  
Harbor. pp.265-282

HORN GT. RICHARDS B. KLINGER W. (1989)

Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by  
the polymerase chain reaction.

Nuc.Ac.Res. 17(5): 2140

HUGUET E. GENE M. (1991)

La investigación biológica de la paternidad.

Med.Integral. 17(10): 547-552

HUGUET E. GENE M. CORBELLA J. (1987)

Utilidad de los marcadores genéticos en la  
identificación cadavérica.

En Orfila 1. I Jornadas anuales de la sociedad española  
de Medicina Legal y Forense. PPU. Alicante. 119-125

HUMMEL K. (1971)

Biostatistical opinion of parentage.

Gustav Fisher Verlag. Stuttgart.

HUMMEL K. GERCHOW J. (1981)

Biomathematical evidence of paternity.

Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

INNIS M. GELFAND DH. (1990)

Optimization of PCRs.

En: INNIS MA., GELFAND DH., SNINSKY JJ. and WHITE TJ. PCR  
Protocols. A guide to methods and applications.

1<sup>a</sup> Ed. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley,  
Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 3-12

JEFFEYS AJ. WILSON V. THEIN SL. (1985)

Hypervariable minisatellite regions in human DNA.

Nature 314(7): 67-73

JEFFREYS AJ. NEUMANN R. WILSON V. (1990)

Repeat unit sequence variation in minisatellites: a  
novel source of DNA polymorphism for studying variation  
and mutation by single molecule analysis.

Cell 60(9): 473-485

JEFFREYS AJ. WILSON V. NEUMANN R. KEYTE J. (1988)

Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells.

Nuc.Ac.Res. 16: 10953-10971

JEFFREYS AJ. ROYLE NJ. WILSON V. WONG Z. (1988)

Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem repetitive hypervariable loci in human DNA.

Nature 332(17): 278-281

JEFFREYS AJ. WONG Z. WILSON V. PATEL I. NEWMANN R. ROYLE  
N. y col. (1989)

Applications of multilocus and single locus minisatellite DNA probes in forensic medicine.

En: BALLANTYNE J., SENSABAUGH G., WITKOWSKI J. DNA technology and forensic science.

1ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 283-296

KASAI K. NAKAMURA Y. WHITE R. (1990)

Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science.

J.Forensic Sci. 1196-1200

KAWASAKI ES.(1990)

Sample preparation from blood, cells, and others fluids.  
En: INNIS MA.,GELFAND DH.,SNINSKY JJ.,WHITE TJ. PCR  
Protocols. A guide to methods and applications. 1ª  
Ed.Academic Press,Inc. San Diego, New York, Berkeley,  
Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 146-152

KLOOSTERMAN AD. BUDOWLE B. DASELAAR P. (1993)

PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR  
locus. Amplification conditions, population genetics and  
application in forensic analysis.

Int.J.Leg.Med. 105: 257-264

KNOTT TJ. WALLIS SC. PEASE RJ. POWELL LM. SCOTT J.  
(1986)

A hypervariable region 3' to the human apolipoprotein B  
gene.

Nuc.Ac.Res. 14(22):9215-9216

KRATZER A. GRÄNACHER A. JAMNICKI M. BÄR W. (en prensa)

Swiss population data for 3 STR-systems  
(SE33,HUMTH01,D21S11), HLA DQa and D1S80.

Advances in Forensic Haemogenetics 5. Springer-Verlag  
(in press)

KWOK S. HIGUCHI R. (1989)

Avoiding false positives with PCR

Nature 339(18):237-238

KWOK S. (1990)

Procedures to minimize PCR-product carry-over.

En: INNIS MA., GELFAND DH., SNINSKY JJ., WHITE TJ. PCR Protocols. A guide to methods and applications.

1ª Ed. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.

142-145

LANDER ES. (1989)

Population genetic considerations in the forensic use of DNA typing.

En: BALLANTYNE J., SENSABAUGH G., WITKOWSKI J. DNA technology and forensic science.

1ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 143-158

LANGÖ A. EKDAL AM. NYBERG L. LINDBLOMB. (en prensa)

Simultaneous analysis of STR and VNTR polymorphisms.

Advances in Forensic Haemogenetics 5. Springer-Verlag (in press)

LUDWIG E.H. FRIEDL W. MCCARTHY B.J. (1989)

High-resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene.

Am.J.Hum.Genet. 45: 458-464

LUTZ R. EPPLEN JT. (1992)

Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeats sequences in casework.

For.Sci.Int. 53: 163-171

MACKAY J. STEEL CM. ELDER PA. FORREST APM. EVANS HJ. (1988)

Allele loss on short arm of chromosome 17 in breast cancers.

The Lancet 17: 1384-1385

MANDICH P. BELLONE E. MASSARI A. AJMAR F. (1991)

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of hypervariable genomic sequences.

Bol.Soc.It.Biol.Sper. 67(10/11): 907-913

MARX JL. (1988)

DNA fingerprinting takes the witness stand.

Science 240: 1616-1618

MATSUMURA K. KALLIONIEMI A. KALLIONIEMI O. CHEN L. SMITH HS. PINKEL D. (1992)

Deletion of chromosome 17p loci in breast cancer cells detected by fluorescence in situ hybridization.

Cancer Res. 52(15): 3474-3477

MAYR WR. (1993)

Recommendations of the DNA commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of the PCR-based polymorphisms.

Vox Sang 64: 124-126

MERCIER B. GAUCHER C. FEUGEAS O. MAZURIER C. (1990)

Direct PCR from whole blood without DNA extraction.

Nuc.Ac.Res. 18(19): 5908

MOOS M. GALLWITZ D. (1983)

Structure of two human  $\beta$ -actin-related processed genes one of which is located next to a simple repetitive sequence.

The EMBO J. 2(5): 757-761

MULLIS KB. (1990)

Reacción en cadena de la polimerasa.

Investigación y Ciencia 30-37

NAKAMURA Y. BALLARD I. LEPPERT M. O'CONNELL P. LATHROP

GM. LALOUEL JM. y col. (1988)

Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pYNZ22) on chromosome 17p(D17S30).

Nucleic Acids Research 12: 5707

NAKAMURA Y. LEPPERT M. O'CONNELL P. WOLFF R. HOLM T.  
CULVER M. y col. (1987)

Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for  
human gene mapping.

Science 235: 1616-1622

NAKAMURA Y. CARLSON M. KRAPCHO K. WHITE R. (1988)

Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence  
(pMCT118) on chromosome 1p (D1S80).

Nuc.Ac.Res. 16(19): 9364

NEUFELD PJ. COLMAN N. (1990)

La ciencia al servicio de la justicia.

Investigación y Ciencia 166: 6-14

NOVELLI G. SPINELLA A. GENNARELLI M. MINGARELLI R.  
DALLAPICCOLA B. (1992)

Analysis of Apo B, HLA\_DQ alpha, and D1S80 polymorphisms  
in the italian population using the polymerase chain  
reaction.

Am.J.Hum.Biol. 4: 381-386

OELBERG SJ. WHITE R. (1989)

Tandemly Repeated DNA and its applications in Forensic Biology.

En: BALLANTYNE J., SENSABAUGH G., WITKOWSKI J. DNA technology and forensic science.

1<sup>a</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 257-264

OLIVA R. LAWRENCE SK. WU Y. SMITH CL. (1991)

Chromosomes, molecular studies.

Encyclopedia of human biology. 2: 475-487

ORREGO C. (1990)

Organizing a laboratory for PCR work.

En: INNIS MA., GELFAND DH., SNINSKY JJ., WHITE TJ. PCR Protocols. A guide to methods and applications.

1<sup>a</sup> Ed. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. pp. 447-454

PACEK P. SAJANTILA A. SYVÄNEN AC. (1993)

Determination of allele frequencies at loci with length polymorphism by quantitative analysis of DNA amplified from pooled samples.

PCR Meth. Appli. May 2(4): 313-317

POLYMEROPOULOS MH. RATH DS. XIAO H. MERRIL CR. (1992)  
Tetranucleotide repeat polymorphism at the human  
beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2)  
Nucleic Acids Res. 20 (6): 1432

RACE RR. SANGER R. (1975)  
Los grupos sanguíneos humanos.  
2ª Ed. La Prensa Mexicana. México.

RAND S. PUERS C. SKOWASCH K. WIEGAND P. BUDOWLE B.  
BRINKMANN B. (1992)  
Population genetics and forensic efficiency data of 4  
AMPFLP's.  
Int.J.Leg.Med. 104: 329-333

RENGES HH. PEACOCK R. DUNNING AM. TALMUD P. HUMPHRIES  
SE. (1992)  
Genetic relationship between the 3'-VNTR and diallelic  
apolipoprotein B gene polymorphisms: Haplotype analysis  
in individuals of European and South Asian origin.  
Ann.Hum.Genet. 56: 11-33

REYNOLDS R. SENSABAUGH G. (1991)  
Analysis of genetic markers in forensic DNA samples  
using the Polymerase Chain Reaction.  
Anal. Chem. 63: 2-15

RYCHLIK W. SPENCER WJ. RHOADS RE. (1990)

Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.

Nucleic Acids Research 18(21): 6409-6411

SAIKI RK. GELFAND DH. STOFFEL S. SCHARF R. HIGUCHI R. HORN GT. (1988)

Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science 239: 487-491

SAIKI RK. GYLLENSTEN UB. ERLICH HA. (1990)

The Polymerase Chain Reaction. En: DAVIES KE. Genome Analysis. A practical approach. 1ª Ed. IRL Press. Oxford, New York, Tokyo. pp. 141-152

SAIKI RK. (1990)

Amplification of genomic DNA.

En: INNIS MA., GELFAND DH., SNINSKY JJ., WHITE TJ. PCR Protocols. A guide to methods and applications.

1ª Ed. Academic Press, Inc. San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 13-20

SAJANTILA A. BUDOWLE B. STRYM M. JOHNSON V. LUKKA M.  
PELTONEN L. y col. (1992)

PCR amplification of alleles at the D1S80 locus:  
Comparison of a Finnish and a North American Caucasian  
population sample, and forensic casework evaluation.  
Am.J.Hum.Genet. 50: 816-825

SAMBROOK J. FRITSCH EF. MANIATIS T. (1989)

Molecular cloning. A laboratory manual.  
2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring  
Harbor.

SARKAR G. KAPELNER S. SOMMER SS. (1990)

Formamide can dramatically improve the specificity of  
PCR.  
Nucleic Acids Research 18 (24): 7465

SCHNEE-GRIESE J. TEIFEL-GREDING J. (1991)

DNA length polymorphism of the Apo B 3' region:  
frequency distribution of the alleles in the german  
population.  
Forensic Sci.Int. 51: 173-178

SCHNEE-GRIESE J. BLÄB G. HERRMANN S. SCHNEIDER HR.  
FÖRSTER R. BÄBLER G. y col. (1993)

Frequency distribution of D1S80 alleles in the german  
population.  
For.Sci.Int. 59: 131-136

SCHWARTZ CE. JOHNSON JP. HOLYCROSS B. MANDEVILLE TM.  
SEARS TS. GRAUL EA. y col. (1988)

Detection of submicroscopic deletions in band 17p13 in  
patients with the Miller-Dieker syndrome.

Am.J.Hum.Gen. 43: 597-604

SCHWARTZ CE. SAUER SM. BROWN AM. DIVELBISS JE. PATIL SR.  
(1990)

Localization of the Miller-Dieker critical region is  
proximal to locus D17S34 (p144D6) in 17p13.3.

Genomics 7: 621-624

SEALEY PG. SOUTHERN EM. (1987)

Electrophoresis of DNA.

En: RICKWOOD D., HAMES BD. Gel electrophoresis of nucleic  
acids. A practical approach.

4ª Ed. IRL Press, Oxford, Washington DC. pp. 39-75

SHARIEF N. CRAZE J. SUMMERS D. BUTLE L. WOOD CBS. (1991)

Miller-Dieker syndrome with ring chromosome 17.

Arch.of Disease in Childhood 66: 710-712

SINGH S. SIMON M. MEYBOHM I. JANTKE I. JONAT W. MAASS H  
y col. (1993)

Human breast cancer frequent p53 allele loss and protein  
overexpresion.

Hum.Genet. 90: 635-640

SPARKES RS. HODGE SE. (1990)

Paternity testing

En: EMERY AEH.,RIMOIN DL. Principles and practice of medical genetics. V-2.

2ª Ed.Churchill Livingstone. Edinburgh, London, Melbourne, New York. 2011-2015

STERN C. (1979)

Genetica Humana.

1ª Ed.Alhambra, Barcelona

TAGLIABRACCI A. BUSCEMI L. CUCURACHI N. GIORGETTI R.

FERRARA SD. (en prensa)

Suitability and efficiency of PCR systems in forensics.

Advances in Forensic Haemogenetics. Springer-Verlag (in press)

TAUTZ D. (1989)

Hipervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers.

Nucleic Acids Research 17(16): 6463-6471

THYMAN M. NELLEMAN LJ. MASUMBA G. IRGENS-MOLLER L.  
MORLING N. (1993)

Analysis of the locus D1S80 by amplified fragment length polymorphism technique (AMP-FLP). Frequency distribution in Danes. Intra and inter laboratory reproducibility of the technique.

For.Sci.Int. 60: 47-56

TOGUCHIDA J. ISHIZAKI K. NAKAMURA Y. SASAKI MS. IKENAGA M. KATO M. y col. (1989)

Assignment of common allele loss in osteosarcoma to the subregion 17p13.

Cancer Res. 49 (22): 6247-6251

VALLS A. (1985)

Introducción a la antropología. Fundamentos de la evolución y de la variabilidad biológica del hombre. 2ª Ed. Labor Universitaria, Barcelona

VAN TUINEN P. DOBYNS WB. RICH DC. SUMMERS KM. ROBINSON TJ. NAKAMURA Y. y col. (1988)

Molecular detection of microscopic and submicroscopic deletions associated with Miller-Dieker syndrome.

Am.J.Hum.Gen. 43: 587-596

VILLANUEVA CAÑADAS E. (1991)

Los indicios en Medicina Legal.

En: GISBERT CALABUIG JA. Medicina Legal y Toxicología.  
4ª Ed. Salvat S.A. Barcelona. 971-997

VOGELSTEIN B. FEARON ER. KERN SE. HAMILTON SR.  
PREISINGER AC. NAKAMURA Y. WHITE R. (1989)

Allelotype of colorectal carcinomas.

Science 244: 207-211

WALSH PS. METZGER DA. HIGUCHI R. (1991)

Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for  
PCR-based typing from forensic material.

BioTechniques 10: 506-513

WALSH PS. ERLICH HA. HIGUCHI R. (1992)

Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms  
and solutions.

PCR Meth.Appli. May 1(4): 241-250

WEBER JL. MAY PE. (1989)

Abundant class of human DNA polymorphism which can be  
typed using the polymerase chain reaction.

Am.J.Hum.Gen. 44: 388-396

WEIR BS. (1992)

Population genetics in the forensic DNA debate.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89: 11654-11659

WENHAM PR. NEWTON CR. HOULSTON RS. PRICE WH. (1991)  
Rapid diagnosis of familial defective Apolipoprotein  
B-100 by amplification refractory mutation system.  
Clin.Chem. 37 (11): 1983-1987

WESTWOOD SA. WERRET DJ. (1990)  
An evaluation of the polymerase chain reaction method  
for forensic applications.  
Foren.Sci.Int. 45: 201-215

WOLFF RK. NAKAMURA Y. WHITE R. (1988)  
Molecular characterization of a spontaneously generated  
new allele at a VNTR locus: no exchange of flanking DNA  
sequence.  
Genomics 3: 347-351