

ASPECTOS GENERALES DEL ANÁLISIS DEL ADN ANTROPOLOGÍA FORENSE.

Ana Gremo.

INTRODUCCIÓN.

La posibilidad de estudiar el ADN (Ácido Desoxirribonucleico) con fines de identificación individual, fue descrita por primera vez en el año 1985 por el Prof. Alec Jeffreys en la universidad de Leicester. El Prof. Jeffreys consiguió obtener un patrón de bandas (semejante al código de barras de un producto de un supermercado) el cuál era único y prácticamente irreplicable por persona.

A partir de este momento surgió el término de "huella genética" intentando reflejar esta capacidad de individualización con la de las huellas dactilares. Los diferentes patrones de bandas se obtenían al "cortar" el ADN por sitios específicos y separar los fragmentos obtenidos en función de su tamaño. Cada uno de los fragmentos se correspondía con cada una de las bandas obtenidas (Técnica de RFLP: Polimorfismos basados en la longitud de los fragmentos de restricción) (1).

Fig. 1: Patrones de bandas obtenidos con sondas multilocus (MLP).

El problema que presentó esta técnica en su aplicación con fines forenses, fue que necesitaba que el ADN del que se partía estuviera íntegro y en cantidades suficientes; esto en la práctica real no es así, puesto que las muestras forenses suelen estar parcialmente degradadas y se dispone de pocas cantidades. Sin embargo, sí se obtenían buenos resultados a partir del ADN extraído de sangre o de tejidos frescos. Los problemas más graves se presentaban en la obtención de resultados repetibles entre los diferentes laboratorios, así como la interpretación estadística de los mismos.

Posteriormente, aquel patrón multibandas (MLP: Multi Locus Probe) se sustituyó por un patrón de tan solo dos bandas (SLP: Single Locus Probe) una de exclusiva procedencia paterna y otra de exclusiva procedencia materna. De esta forma se solucionaba, en cierto grado, los problemas de reproducibilidad interlaboratorial (al ser solo dos bandas la lectura era más sencilla) y se avanzó bastante en el campo de la estandarización. Su utilidad en pruebas de

paternidad también era incuestionable (2).

Fig. 2: Patrones de bandas obtenidas con sondas single locus (SLP).

P: Padre; M: Madre; H: Hijo y L: Ladder.

Esta metodología SLP, requería varios análisis de la misma muestra para llegar a un alto grado de individualización, ya que con solo dos bandas por persona, la probabilidad de coincidencia fortuita entre dos muestras tomadas al azar todavía existía; de modo que se realizaban hasta cuatro análisis SLP (en total ocho bandas por persona, obtenidas dos a dos). De esta forma, se podían alcanzar cifras de individualización de 1 entre 200 millones.

Sin embargo esta técnica todavía planteaba algunas cuestiones:

Seguía siendo necesario una considerable cantidad de muestra y con ADN poco degradado. Había problemas en la estandarización y sobre todo en la interpretación estadística de los resultados.

La técnica SLP todavía es utilizada en la actualidad en casos de paternidad y ha sentado las bases de otras muchas que se están desarrollando.

Simultáneamente, surgió una nueva tecnología que permitió dar un paso más hacia delante: La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta técnica hacía posible obtener millones de copias de un fragmento concreto de ADN. Se solucionaba en gran medida el problema de las muestras forenses (3). Así mismo, como la técnica permitía seleccionar el fragmento de ADN que se quería analizar comenzaron a estudiarse cada vez fragmentos más cortos de ADN (VNTR: Variable Number Tandem Repeats (4), STR: Short Tandem Repeats) (5); así, aunque estuviera parcialmente degradado, aumentaba la posibilidad de encontrar fragmentos intactos. Por otro lado, se seleccionaron polimorfismos fácilmente distinguibles por técnicas convencionales de laboratorio, distribuidos en clases alélicas concretas y con una herencia

mendeliana simple (los resultados eran también dos bandas, una paterna y otra materna). En cada análisis se incorporaban controles de todos los alelos conocidos, de esta forma en todos los laboratorios los resultados coincidían y eran perfectamente reproducibles. Así mismo, se realizaron estudios poblacionales y se establecieron las frecuencias alélicas para cada marcador en los distintos grupos étnicos y en distintas subpoblaciones. Hoy en día es posible el análisis de más de 30 STR diferentes, pudiéndose analizar varios de ellos simultáneamente en la misma reacción y llegando a cifras de discriminación muy elevadas (6).

El esfuerzo de la Comunidad científica dentro de este campo fue notable, creándose tanto en Europa como en E.E.U.U. comités encargados de homologar y estandarizar todos los protocolos. (7,8). El grupo Hispano-Portugués de la ISFG (International Society for Forensic Genetics) establece reuniones periódicas con todos sus miembros y realiza ejercicios de control de calidad con el fin de unificar los criterios, participando laboratorios de España de Portugal y de América latina (9).

En estos últimos años los avances han sido muy importantes; el aparataje y la metodología han incrementado y facilitado considerablemente las posibilidades. Se están incorporando cada vez más, secuenciadores automáticos, que descifran el código de nucleótidos de un fragmento determinado, se estudia la variación interna dentro de fragmentos homólogos de ADN en el llamado análisis digital del ADN (MVR-PCR: Minisatélites Variant Repeats con técnicas de PCR) (10) y se abren nuevos campos gracias al estudio del ADN mitocondrial y al polimorfismo del cromosoma Y (11 y 12).

Por tanto, en la actualidad, podemos decir que el estudio del ADN con fines forenses comprende gran cantidad de pruebas con distinta metodología y con diferentes estrategias en función del tipo de muestra y del tipo de análisis que se vaya a realizar (pruebas de paternidad, estudio de manchas, identificación de restos óseos, etc.).

En los siguientes capítulos, nos centraremos exclusivamente en el análisis del ADN sobre restos óseos ya que son unas muestras con unas características muy concretas; sin embargo, hemos querido comentar las amplias posibilidades que este tipo de análisis ofrece así como subrayar la variedad de técnicas y metodología y reflejando la velocidad con que estos cambios se están produciendo en este área.

ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DE ADN.

La molécula de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) se compone de dos cadenas de polinucleótidos arrolladas en espiral alrededor de un eje común.

Un nucleótido estaría constituido por una molécula de ácido ortofosfórico, una pentosa (concretamente una desoxirribosa) y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas pueden ser:

Púricas: Adenina (A) y Guanina (G)

Pirimidínicas: Timina (T) y Citosina (C)

Las dos cadenas de polinucleótidos están enfrentadas de manera que las bases quedan hacia el interior y la cadena de azúcar y fosfato hacia el exterior. La estructura de doble hélice se mantendría por medio de enlaces de hidrógeno que se forman entre las bases nitrogenadas. De esta forma, una Adenina tendría siempre enfrente una Timina y una Citosina tendría siempre enfrente una Guanina (y respectivamente). Por eso, la secuencia de nucleótidos de una cadena, determina siempre la secuencia de la otra; esta propiedad se denomina complementariedad de las hebras y es de suma importancia a la hora de aplicarla a las tecnologías que más adelante comentaremos (13).

La doble hélice de ADN tiene un diámetro de 20 Å y la distancia entre cada base es de 3,4 Å. Es una molécula muy larga y muy fina, por ejemplo, si ampliáramos proporcionalmente el ADN de una bacteria, este tendría un diámetro de 1 milímetro de ancho y una longitud de 400 metros.

La molécula de ADN se ha revelado como un elemento particularmente estable y resistente en el tiempo (14).

Fig.3: Estructura de la doble hélice del ADN.

CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DEL ADN HUMANO.

El genoma humano está constituido por unos 3.000 millones de pares de bases aproximadamente. Del total del genoma humano, se considera que tan solo el 1-2 % codifica para proteínas. El resto tendría varias funciones entre

ellas la reguladora de la transcripción, la de mantenimiento de la integridad estructural del cromosoma o la de migración de los cromosomas durante la división celular, etc. También hay una gran parte del genoma humano a la cual todavía no se la ha asignado una función precisa (15).

El análisis detallado del genoma humano, ha revelado numerosas categorías de secuencias de "ADN no funcional", muchas de las cuales son diversas formas de ADN repetitivo (16).

Una categoría importante de ADN repetitivo, esta constituida por el ADN repetido en tandem. Este ADN repetido en tandem esta constituido por bloques de ADN con una secuencia común de nucleótidos que se repiten uno a continuación de los otros un determinado número de veces:

(AGTA)=Fragmento que se repite (unidad de repetición)

(AGTA)(AGTA)=2 veces

(AGTA)(AGTA)(AGTA)=3 veces

(AGTA)(AGTA)(AGTA)(AGTA)=4 veces

(AGTA)(AGTA)(AGTA)(AGTA)(AGTA)....(AGTA)=N veces

Algunas categorías de este ADN repetido en tandem, presentan una tasa de recombinación y mutación muy alta y por tanto es extremadamente variable de unos individuos a otros (17).

La mayoría de los estudios del ADN con fines forenses se realizan sobre el ADN repetido en tandem puesto que es el que más polimorfismo presenta entre individuos (incluso entre individuos genéticamente relacionados). Hay que tener en cuenta que al no ser un ADN esencial para la vida, acumula gran cantidad de mutaciones, mientras que las mutaciones en fragmentos de copia única o en genes funcionales son, en su mayoría, inviables o afectan a muy pocos nucleótidos.

POLIMORFISMO DEL ADN.

Si entendemos como polimorfismo, la variabilidad que existe dentro de un fragmento de ADN, a cada una de las posibilidades se la llama alelo.

En un principio podemos hablar de dos tipos de polimorfismos en el ADN:

Polimorfismos de secuencia: Cuando para un fragmento equivalente de ADN, la secuencia de nucleótidos no es idéntica:

Frag. Homólogo nº 1: CCTACGA

Frag. Homólogo nº 2: CCTGCGA

Polimorfismos de longitud: Cuando para un

fragmento equivalente de ADN, el número de nucleótidos no es idéntico:

Frag. Homólogo nº1: CGTACGTA

Frag. Homólogo nº2: CGTACGTACGTA

POLIMORFISMOS DE SECUENCIA.

Como ya se ha comentado anteriormente, las diferencias están basadas en la secuencia de nucleótidos. Para ello es preciso determinar una a una y en su orden correspondiente la secuencia de bases (C, A, T, G) que forman un fragmento determinado de ADN.

Según sea el tipo de sustitución, se distinguen en : (15)

Sustituciones de una única base:

Transiciones: Se sustituye una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina.

Transversiones: Se sustituye una pirimidina por una purina o una purina por una pirimidina.

Sustituciones de varias bases:

Inserciones: Se incorporan nuevas bases dentro de la secuencia original.

Delecciones: Se pierden bases dentro de la secuencia original.

POLIMORFISMOS DE LONGITUD.

Es la longitud de los fragmentos repetidos en tandem lo que determina la diferencia entre unos individuos y otros:

AGCTAGCT
AGCTAGCTAGCT
AGCTAGCTAGCTAGCT
AGCTAGCTAGCTAGCTAGCT
AGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCT
AGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCTAGCT

Según el número de nucleótidos que forman las unidades de repetición de estos fragmentos se distinguen:

MINISATÉLITES o VNTR (Variable Number Tandem Repeats): El número de nucleótidos que forman la unidad de repetición estaría comprendido entre 9 y 64 pares de bases (p.b.). El número de repeticiones puede ser distinto entre los cromosomas homólogos y entre diferentes individuos (4).

MICROSATÉLITES o STR (Short Tandem Repeats): La unidad de repetición estaría compuesta por una secuencia entre 2 y 7 pares de

bases (p.b.). Así mismo, el número de repeticiones puede ser diferente entre los dos cromosomas homólogos de un mismo individuo (5).

En la actualidad, los más utilizados con fines forenses son los STR y dentro de ellos los STR tetraméricos (4 nucleótidos), las ventajas que ofrecen son:

- El tamaño no suele ser mayor de 350 p.b.; Al ser mas cortos se conservan mejor en ADN degradado y muestras envejecidas.

- Pueden analizarse varios simultáneamente; esto aumenta la rapidez a la hora de establecer resultados.

- Tienen un tratamiento estadístico más fácil (a cada banda se le asigna una frecuencia alélica)

- Tienen una herencia mendeliana simple (dos bandas por cada individuo).

- Los patrones son fáciles de obtener (18, 19, 20).

Hoy en día, se emplean de forma rutinaria como mínimo 12 STR distintos con aplicaciones forenses. Las posibilidades de discriminación son muy elevadas, aproximadamente del orden de 1 entre 1000 millones (21).

Loci	unidad de repetición	tamaño de los alelos
HUMTH01	(AATG)	179 - 203 p.b.
HUMFESFPS	(AAAT)	222 - 250 p.b.
HUM13A1	(AAAG)	281 - 331 p.b.
HUMVWA	(AGAT)	131 - 171 p.b.
HUMTPOX	(AATG)	224 - 252 p.b.
HUMCSF1P0	(AGAT)	295 - 327 p.b.

Tabla 1: Características de algunos de los STR autosómicos habitualmente empleados con fines forenses.

POLIMORFISMOS DE SUSTITUCIÓN DE UN SÓLO NUCLEÓTIDO.

Ultimamente esta cobrando interés el estudio de polimorfismos de sustitución de un nucleótido (SNP: Single Nucleotide Polymorphism).

Parece ser que existen cientos de loci con este tipo de polimorfismo en el genoma humano (aproximadamente, 1 SNP por cada 1000 nucleótidos). Se trataría de fragmentos homólogos de ADN cuya secuencia difiere en tan solo un nucleótido. Son polimorfismos bialélicos, es decir solo presentan dos alelos y por tanto su poder individualizador no es muy alto.

Se estima, que es necesario el estudio de al menos 50 de estos loci para llegar a una identificación individual; aunque, gracias a las

nuevas tecnologías, es posible analizar bastantes de ellos en una misma reacción. En este aspecto, cabe destacar el gran futuro de los "biochips" (ver mas adelante) que permitirán el fenotipado de cientos de loci simultáneamente.

La principal ventaja que ofrece este tipo de polimorfismos, reside en que solo precisan el análisis (y por tanto la recuperación) de fragmentos muy cortos de ADN; esto es particularmente útil en el estudio de muestras con ADN envejecido y deteriorado.

Todavía estas técnicas están en sus fases iniciales pero ofrecen buenas expectativas (22).

De esta forma se analizarían locus como el de la enzima Fosfoglucomutasa (PGM) y algunos STR del cromosoma Y.

TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Es un método inventado por Kari Mullis en 1986. En síntesis, esta técnica permite imitar la replicación natural de la molécula de ADN, un proceso que ocurre cada vez que la célula se divide para formar otras dos. Durante la replicación del ADN, cada molécula se separa en sus dos hebras; en este momento en un proceso catalizado por la enzima ADN-polimerasa, la célula fabrica dos nuevas hebras, copias de las ya existentes. El resultado es un doble número de moléculas de ADN; suficiente material genético para dos células.

Fig.4: Proceso de replicación de la molécula de ADN, catalizado por la enzima ADN-polimerasa.)

Este proceso se puede realizar en el laboratorio y además repetir cíclicamente; conseguimos la separación de las dos hebras gracias a la elevación rápida y brusca de la temperatura y mediante una DNA-polimerasa termoestable (taq-polimerasa) se copian dos nuevas hebras utilizando como molde las hebras ya existentes. Los productos del primer ciclo sirven como sustrato para el siguiente ciclo. Todo esto da como resultado un doble número de moléculas de ADN en cada ciclo (23).

Una vez que el ADN es amplificado, el producto puede ser analizado por distintos métodos de laboratorio con el fin de detectar los diferentes polimorfismos (longitud o secuencia). Al disponer de millones de copias es posible acceder a diversas alternativas técnicas.

Fig.5: Esquema de actuación de la PCR.

El problema más grave que tiene la PCR es el de la contaminación. Cantidades muy pequeñas de ADN contaminante (humano) tanto en la muestra como en el laboratorio (ADN procedente de otros análisis) son susceptibles de ser amplificadas y esto podría llevar a resultados erróneos (24).

APLICACIÓN PRÁCTICA SOBRE RESTOS ÓSEOS.

Toma y envío de muestras.

Es evidente que los resultados van a depender en gran medida del tamaño y del estado de conservación de la muestra.

En el caso de la antropología forense, la fuente de obtención del ADN tiene unas particularidades muy concretas, ya que vamos a carecer de los tejidos habituales. De hecho, prácticamente solo dispondremos de dos fuentes de obtención de material biológico: restos óseos y pulpa dental.

Por otro lado, las muestras presentarán siempre un alto grado de contaminación, tanto bacteriana como de tipo humano debido a traslados, investigación, manipulación, etc. Debemos ser conscientes que muy pequeñas cantidades de ADN contaminante pueden llevar a resultados erróneos ya que la técnica de PCR es capaz de obtener numerosas copias de tan solo unas pocas moléculas de ADN (14, 25).

El problema del ADN envejecido y deteriorado es también muy importante; Es obvio que las condiciones adversas medioambientales (fundamentalmente humedad y radiación U.V.) degradan el ADN incidiendo directamente sobre los resultados. Otro problema que merece una especial atención es la utilización del formaldehído (frecuentemente utilizado como conservante) ya que interacciona con el ADN formando compuestos que dificultan enormemente la posterior extracción de este de la muestra e inhibiendo la reacción de la taq-polimerasa.

En el caso de restos óseos, las mejores muestras serán las de tejido óseo compacto (al menos un hueso largo completo y preferiblemente fémur). En el caso de las piezas dentales, la muestra de elección serán los molares sin deteriorar y al menos cuatro (después de haber

realizado el estudio odontológico). Lo más conveniente es remitir las muestras al laboratorio sin manipularlas ni limpiarlas. Las muestras deberán ser envasadas y etiquetadas por separado y respetando la cadena de custodia. También es importante recordar que la identificación será más precisa si se dispone de muestras indubitadas del sujeto o en su defecto muestras sanguíneas de familiares directos. Lo más conveniente es contactar con el laboratorio para cada caso concreto.

El Instituto Nacional de Toxicología ha elaborado unas normas para la preparación y remisión de muestras biológicas publicadas en el B.O.E. nº 308 del 23 de diciembre de 1996 (38.203 - 38.221) que pueden servir de consulta o referencia.

EXTRACCIÓN DEL ADN DE LA MUESTRA.

El procedimiento para hueso será.

- Preparación de la muestra; extracción de partes blandas, si las hubiera.
- Lavado y lijado de la cara externa e interna del hueso con el fin de eliminar al máximo los contaminantes.
- Extracción de un fragmento y posterior pulverización a (-173 °C) para hacer más fácil el tratamiento de descalcificación.
- Tratamiento de descalcificación.
- Extracción del ADN.
- Diálisis y concentración mediante unidades de microfiltración, ya que es importante que no queden en la muestra restos de sustancias que actúen como inhibidores de la reacción PCR.

El procedimiento para pulpa será.

- Lavado de la pieza dental
- Fractura de la misma hasta acceder a la cavidad pulpar
- Extirpación del contenido pulpar
- Extracción del ADN
- Diálisis y concentración.

Una vez extraído el ADN, es preciso cuantificar y cualificar dicho ADN, es decir verificar que porcentaje del ADN extraído es humano. Lo habitual en restos óseos es obtener suficiente cantidad de ADN total pero poco humano. Es importante conocer la cantidad de ADN humano del que partimos para optimizar la reacción PCR y para seleccionar aquellos marcadores que más rindan en el caso de haber obtenido poca cantidad de muestra.

Siempre se realizarán dos extracciones

distintas de la misma muestra y en las áreas de trabajo destinadas a tal fin.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN OBTENIDO.

Para trabajar con PCR se necesita:

- ADN molde: es decir el que nos interesa analizar.
- Taq-polimerasa: enzima que verifica la reacción.
- Nucleótidos (A, T, G, C): para que se vaya elongando la cadena.
- Cebadores o "primers": son pequeños fragmentos de ADN (unos 20 nucleótidos) que son complementarios al inicio de la región del genoma que interesa amplificar. Estos cebadores sirven de inicio a la nueva cadena y delimitan la zona de actuación de la enzima, así solo se copia el fragmento que se va a analizar.

Con todo esto, la taq-polimerasa añadirá nucleótidos al extremo 3' de la hebra a un ritmo aproximado de 1000 bases por minuto. El resultado es la acumulación exponencial de fragmentos específicos de ADN.

Como ya se ha comentado, el problema más grave que tiene esta técnica es que cantidades pequeñísimas de ADN contaminante, tanto en la muestra como en el laboratorio serían también amplificadas. Por eso, se separan las zonas de trabajo (extracción y análisis) (26).

ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.

Una vez verificada la reacción PCR, se procede a la identificación de los fragmentos amplificados. Los diferentes métodos analíticos dependerán de los distintos tipos de polimorfismos que se vayan a estudiar.

ELECTROFORÉISIS.

Se utiliza para identificar polimorfismos de longitud (STR). Es una técnica físico-química que permite separar e identificar fragmentos de ADN en función de su tamaño. Al someterlo a la acción de un campo eléctrico, el ADN va a migrar hacia el polo positivo (ánodo) puesto que tiene cargas negativas debidas a los grupos fosfato. Los fragmentos más pequeños migrarán más rápidamente que los más grandes, el resultado será una banda por cada fragmento. Si se pone al lado de la muestra, un ADN control con todos los tamaños conocidos (es decir, una banda para

cada unidad de repetición y que recibe el nombre de ladder) simplemente por extrapolación se puede conocer el número de repeticiones de la banda problema.

Por cada ADN se obtienen dos bandas (una heredada del padre y otra de la madre). Por eso también es posible identificar restos óseos a través de familiares directos.

Fig. 6: Patrones de bandas obtenidos mediante electroforesis convencional tras una PCR simultanea de tres STR: Loci HUM 13A, HUM FESFPS, HUM TH0, L=Ladder alélico.)

También se han desarrollado métodos que permiten analizar varios STR simultáneamente, tanto en la misma reacción de PCR como en el mismo gel de electroforesis; están basados en el marcaje de los cebadores o "primers" con fluorocromos de diferentes colores, las bandas posteriormente obtenidas serán a su vez fácilmente identificables (20, 27).

En el caso de que interese detectar un polimorfismo de secuencia, se utilizan dos métodos:

HIBRIDACIÓN CON SONDAS ESPECÍFICAS.

El sistema de hibridación con "sondas" específicas fue el primero en utilizarse para la identificación de fragmentos de ADN con fines forenses y de individualización (Técnicas de RFLP, MLP y SLP).

Una "sonda" es un fragmento de ADN de cadena simple sintetizado en el laboratorio, de secuencia conocida y que esta marcado con radioactividad, quimioluminiscencia o con reactivos enzimáticos de color.

El ADN problema se separa en sus dos hebras y estas se hibridan, es decir, se permite que vuelvan a formar la doble hélice, con "sondas" de las cuales se conoce su secuencia perfectamente. Como la unión sonda-ADN es absolutamente específica (debido a la complementariedad de las bases) solo se unirá para formar de nuevo la doble cadena a su fragmento complementario. Al estar la sonda marcada, una reacción colorimétrica indicará que se ha producido la hibridación con ese fragmento

determinado.

Se han desarrollado "Kits" comerciales que detectan cada uno de los alelos de un polimorfismo mediante sondas fijadas a una membrana de nylon (una sonda por cada alelo) este sistema recibe el nombre de "dot-blot" (28)

También basándose en esta idea, en la actualidad se están estudiando las posibilidades de utilización de placas de nylon o vidrio que lleven incorporados un gran número de "sondas" (del orden de cientos) y que se denominan biochips. En este caso el ADN problema, llevaría un marcaje fluorescente (incorporado durante el proceso de amplificación de la PCR). Al hibridar con su sonda específica, el ADN de cadena simple quedaría fijado en un punto concreto de la miniplaca; la lectura de las zonas marcadas con fluorescencia se realizaría de forma automatizada. De esta forma se podrían detectar varios polimorfismos simultáneamente. Esta parece ser que es la tecnología del futuro, siendo particularmente investigada el campo de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) (29).

SECUENCIACIÓN.

Pese a que la secuenciación es un proceso largo y económicamente caro, para ser utilizado de rutina, se incorpora cada vez con mas asiduidad a los laboratorios de genética forense, siendo de máxima utilidad en el estudio de la región control del ADN mitocondrial (ver mas adelante)

Consiste en identificar uno por uno y en su orden correspondiente cada uno de los nucleótidos que componen un fragmento de ADN. Esta, se realiza en secuenciadores automáticos que utilizan marcajes fluorescentes de diferente color para cada nucleótido (30).

Fig. 7: Secuenciación automática de un fragmento de ADN.

Habitualmente, se secuencian fragmentos de 200 a 400 pares de bases con fines forenses; sin embargo, en la actualidad, se están incorporando técnicas de secuenciación de fragmentos muy cortos de ADN (unos 50 pares de bases) para el estudio de los polimorfismos SNP (ya que la variación estaría en tan solo un nucleótido). Este proceso recibe el nombre de "minisequenciación" y presenta la ventaja de que pueden ser tipados fragmentos de ADN muy degradados mediante la

elección de "primers" que amplifiquen una pequeña región que contenga el sitio polimórfico (31).

ADN MITOCONDRIAL.

Pese al alto grado de individualización que se consigue analizando el ADN genómico y pese al alto rendimiento que ofrece la técnica de PCR, lo cierto es que en la práctica forense no siempre es posible el estudio de determinados vestigios. Las muestras envejecidas y deterioradas, restos óseos, y pelos sin raíz no siempre permiten extraer suficiente cantidad de ADN nuclear para un análisis. En estos casos, la única posibilidad es el estudio del ADN mitocondrial (ADN mt.) (32)

Las mitocondrias se encuentran en el citoplasma celular y su función es proporcionar energía a la célula. Estas, poseen en su interior su propio ADN que regula el funcionamiento de estos orgánulos celulares. La secuencia del ADN mt. es la misma para todas las células de un mismo individuo. Se estima que pueden existir entre 1.000 y 10.000 mitocondrias por cada célula (dependiendo del tipo celular y del momento funcional) por tanto, por cada copia de ADN genómico existirán miles de copias de ADN mt. , esto incrementa las probabilidades de encontrar ADN mt. como muestra cuando el material de partida sea de escaso tamaño o este muy deteriorado. Además, al haber un mayor número de copias, es improbable que el grado de deterioro sea el mismo en todas ellas. Todas estas circunstancias llevan a utilizar el ADN mt. como fuente de obtención de material biológico en los casos en los que no es posible acceder a otro tipo de estudios. (33,34)

CARACTERÍSTICAS DEL ADN MITOCONDRIAL.

El ADN mitocondrial es una molécula con una estructura circular de doble hélice, constituido por 16.569 pares de bases. Fue secuenciado en su totalidad, en 1981 por Anderson y sus colaboradores considerándose a dicha secuencia como "secuencia de referencia" para posteriores análisis (35).

El ADN mt. codifica para 37 genes y tiene aproximadamente un 10 % de ADN "no codificante". En esta zona de ADN "no codificante", existe una región denominada "Región Control" o (d-loop) compuesta por 1.112 pares de bases y que presenta un alto grado de variabilidad entre unos individuos y otros. Esta es la zona es donde se centran los estudios del ADN

mt. con fines forenses (11).

El ADN mitocondrial se hereda independientemente del ADN nuclear. Su herencia es exclusivamente materna (es el óvulo el que aporta las mitocondrias al cigoto). Esto significa que se transmite de madre a hijos de generación en generación intacto; todos los individuos procedentes de la misma línea materna presentarán el mismo ADN mitocondrial. Cualquier variación se deberá exclusivamente a mutaciones y no a recombinaciones con ADN de origen paterno, sin embargo su variabilidad es muy grande ya que el ADN mt. acumula entre 5 y 10 veces más mutaciones que el ADN nuclear puesto que esta menos protegido que este y además tiene mucha más dificultad para reparar los cambios. Lógicamente el ADN mt. no puede ser utilizado en pruebas de paternidad ni para la individualización de muestras de sujetos con el mismo linaje materno.

El estudio del ADN mt. con fines forenses se realiza secuenciando dos zonas hipervariables denominadas zona hipervariable 1 (HV-1) y zona hipervariable 2 (HV-2) localizadas dentro de zona *d-loop* o "Región control", cada una de 400 pares de bases aproximadamente.

El procedimiento analítico es semejante al realizado con el ADN nuclear y consiste en la extracción del ADN; amplificación de las zonas hipervariables 1 y 2 y posterior secuenciación de las mismas (se secuencian las dos hebras del ADN para mayor seguridad). Los resultados se comparan con la secuencia de referencia de Anderson, indicando en que posiciones existen discrepancias. Al disponer de una secuencia de referencia se unifican los criterios y se establece una validación estadística. Los resultados se expresan de la siguiente manera:

1. Origen de la muestra.
2. Material utilizado.
3. Número de pares de bases secuenciados.
4. Posiciones de las regiones hipervariables (HV-1 y HV-2) que no tienen el mismo nucleótido que la secuencia de referencia de Anderson, así como si hay inserciones o deleciones de nucleótidos (36).

La probabilidad de que dos personas escogidas al azar tengan exactamente las mismas secuencias de ADN mt, estaría comprendida entre 1/100 y 1/1000 (en la actualidad se están realizando estudios estadísticos y su validación) [37] ya que es muy importante destacar que se están encontrando tasas elevadas de mosaicismo y heteroplasmia en el ADN mt.; esto significa que dos muestras del ADN-mt. de la misma persona pueden diferir en la secuencia de nucleótidos (38, 39). Este

problema todavía debe ser estudiado y debe ser tenido en cuenta en la interpretación de los resultados

En la actualidad se están incorporando nuevas estrategias para analizar el polimorfismo de ADN mt. como paso previo a la secuenciación (que es un proceso lento y costoso). En un primer paso se realizaría un análisis básico, en el que se detectaría de una forma menos específica las diferencias que podrían existir. Esta técnica denominada SSCA (Single Strand Conformation Analysis) y detecta mediante electroforesis las diferentes mutaciones, puesto que los fragmentos de ADN de cadena sencilla (una sola de las hebras) presentan movilidad electroforética distinta en función de la composición de bases nitrogenadas. Si los patrones de bandas son diferentes no es preciso llegar a la secuenciación; solo aquellas muestras que presentaran patrones de bandas similares serían analizadas mediante secuenciación de las bases (40, 41).

También se está comenzando a estudiar polimorfismos del tipo STR dentro del ADN mitocondrial. El más estudiado, esta basado en la repetición de una unidad dimerica, es decir de dos nucleótidos (AC) situado a partir de la base 514 de la región *d-loop* y tendría 4 alelos [42].

De nuevo recordar que se deben valorar las ventajas y desventajas del análisis del ADN mt., siendo conscientes de que en algunos casos es la única herramienta para realizar estudios biológicos sobre determinado tipo de muestras aunque el tratamiento estadístico todavía es muy complicado.

POLIMORFISMO DEL CROMOSOMA Y

En la actualidad, esta cobrando gran importancia el estudio de las regiones polimórficas en el cromosoma Y. Esto es debido a que concurren una serie de circunstancias muy especiales en este tipo de análisis que están resultando de gran utilidad en el campo de la genética forense.

El cromosoma Y está presente de forma haploide (una sola copia) en el genoma del varón, y pese a que una fracción de dicho cromosoma recombina con el cromosoma X, denominada pseudoautosómica, existe una región que no recombina con ningún fragmento de ADN (puesto que no dispone de genoma homólogo). Esto determina que todas las secuencias localizadas en dicho fragmento se hereden de generación en generación como un único marcador o haplotipo

y significa que se trasmite de padres a hijos varones como un solo bloque, heredándose exclusivamente a través de la línea paterna (43). Las únicas variaciones existentes serán debidas a mutaciones (que a diferencia del ADN mitocondrial se producirán con una tasa mucho menor puesto que el ADN nuclear presenta una mayor protección y capacidad de reparación). Esto resulta de extrema utilidad a la hora de tener que realizar estudios en los que la presencia del cromosoma Y sea relevante (por ejemplo aquellas violaciones en las que se encuentra mezclada la muestra del agresor y de la víctima; estudios de paternidad entre presunto padre e hijo varón, etc.). También son muy importantes en el campo de la genética de poblaciones y de genética evolutiva. En el caso particular de la antropología forense, la identificación se realiza a través de familiares por vía paterna (aunque no se disponga de muestras del padre biológico).

El estudio del polimorfismo del cromosoma Y se basa en la existencia de secuencias repetidas en tandem en dicho cromosoma; es pues un polimorfismo de longitud donde el fragmento que se repite esta constituido por 2, 3 ó 4 nucleótidos, es por tanto, lo que denominamos un STR (Short Tandem Repeat) o microsatélite (44).

En la actualidad hay descritos unos 23 microsatelites para el cromosoma Y de los cuales se suelen emplear 8 de forma rutinaria. Como todos se heredan en bloque de generación en generación constituyen un haplotipo o "grupo de ligamiento" y por tanto para calcular la probabilidad de coincidencia entre una muestra y la población, no se puede utilizar la frecuencia de cada STR por separado sino la de cada haplotipo (12). El uso de estas frecuencias haplotípicas supone un mayor potencial estadístico y por tanto su poder discriminativo es elevado. Aunque los estudios deberán complementarse con el análisis de los marcadores autosómicos porque, como es obvio, todos los individuos procedentes de la misma línea paterna, presentaran los mismos haplotipos para el cromosoma Y.

locus	tamaño de los alelos	Nº de unidades de repetición	alelos
DYS19	(174-210p.b.)	10 - 19	10
DYS389I	(239-263p.b.)	7 - 13	7
DYS389II	(353-385p.b.)	23 - 31	9
DYS390	(191-227p.b.)	18 - 27	10
DYS391	(274-294p.b.)	8 - 13	6
DYS393	(107-131p.b.)	9 - 15	6
DYS385	(360-412p.b.)	9 - 22	16

Tabla 2: Características de algunos de los STRs del cromosoma Y habitualmente empleados con fines forenses.

Dentro de las últimas líneas de investigación

en este campo, se están incorporando los denominados polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) [45] y el análisis digital (MVR-PCR) (46).

RESULTADOS, ESTANDARIZACIÓN Y CONTROLES DE CALIDAD.

Tras un análisis de los polimorfismos del ADN, en el informe vendrán detallados los marcadores que se han estudiado, los resultados que se han obtenido y que frecuencia tienen estos en la población (de origen de la muestra). En el caso de que se solicite una identificación (de restos óseos, por ejemplo) se establecerá la comparación de dichos restos con las muestras indubitadas o con los familiares directos.

Es evidente que los resultados van a depender de:

- El número de polimorfismos analizados.
 - Las frecuencias alélicas de cada uno de ellos en la población
 - Las circunstancias particulares de cada caso.
- Por ejemplo identificación de restos de dos hermanos o parientes consanguíneos. Hoy en día la información obtenida nos proporciona valores estadísticos muy elevados y por tanto se alcanzan resultados muy precisos.

Como hemos podido ir viendo en estas líneas, se han desarrollado gran cantidad de técnicas analíticas, nueva aparatología y toda una gama de productos comerciales aplicables a estos análisis. La reproductibilidad de los resultados, la unificación de criterios y el establecimiento de una base común de datos entre todos los laboratorios que trabajan en el campo de la genética forense han conducido a la necesidad de estandarizar todos estos procedimientos. Por otro lado, la posibilidad de realizar contrapericias, que es algo muy importante en este área hace necesario el establecimiento de controles de calidad. Los controles de calidad son muy importantes porque garantizan que los laboratorios tengan un nivel adecuado, permiten comparar los resultados y se puedan integrar las frecuencias poblacionales.

Con este fin surgieron tanto en Europa (EDNAP: European DNA Profiling Group) (7), como en E: E: U: U: (TGWDAM: Technical Working Group for DNA Analysis and Methods) (8), comités con representantes de distintos países y diferentes laboratorios que ajustándose a criterios básicos definen qué tipo de marcadores, protocolos y procedimientos técnicos deben de utilizarse. De esta forma los resultados pueden estandarizarse y las distintas metodologías son comprobadas y validadas por

la comunidad científica (47, 48).

En la península Ibérica se están produciendo esfuerzos muy importantes tanto en la recopilación de frecuencias a escala nacional, como en los controles de calidad. El grupo Hispano-portugués de la ISFG (International Society for Forensic Genetics) (GEP-ISFG) coordina toda esta labor. También desde el año 1990 se realizan ejercicios de control de calidad entre los distintos laboratorios miembros (9).

Así mismo debe destacarse en este sentido las siguientes normas europeas:

-Resolución N°R (92) 1 del Consejo de Europa sobre el uso de análisis del ADN en el marco del sistema de Justicia Penal.

-Resolución del consejo de la unión europea relativa al intercambio de resultados de análisis del ADN.

A continuación, se facilitan las direcciones de las páginas web de la ISFG, de la EDNAP y la STADNAP donde pueden consultarse todo este tipo de recomendaciones.

ISFG

(International Society Forensic Genetics)

<http://www.usc.es/~isfh>

EDNAP

(European DNA Profiling Group)

<http://www.unimainz.de/FB/Medicin/Rechtsmedizin/ednap/ednap.htm>

STADNAP

Standarditation of DNA Profiling

<http://www.stadnap.unimainz.de/>

BIBLIOGRAFÍA

1 Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "fingerprint" of human DNA. *Nature* 1985; 314: 67-73.

2 Nakamura Y, Gillilan S, O'Connell P, Leppert M, Lathrop GM, Lalouel JM y cols. Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence pYNH24 on chromosome 2 (D2S44). *Nucleic Acids Research* 1987; 15: 10.073.

3 Saiki R K, Scharf S, Faloona T, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA y cols. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.

4 Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M y cols. Variable number of tandem repeat markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235:1616-1622.

5 Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 746-756.

6 DNA Recommendations.1992 report concerning recommendations of DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of

PCR-based polymorphisms. *Int J Leg Med* 1992; 105: 63-64.

7 Gill P, Kimpton C, D'Aloja E, Andersen JF, Bär W, Brinkmann B y cols. Report of the European DNA profiling group (DNAP)-towards standardisation of short tandem repeats (STR) loci. *Forensic Sci Int* 1994; 65: 51-59.

8 Technical Working Group on DNA analysis methods. Guidelines for a quality assurance program for DNA analysis. *Crime laboratory Digest* 1995; 22: 21-43.

9 Gomez J, Rodriguez-Calvo MS, Albarran C, Amorim A, Andradas J, Cabrero C y cols. A review of the collaborative exercises of the Spanish and Portuguese ISFH working group. *Int J Leg Med* 1997; 110: 273-277.

10 Jeffreys AJ, MacLeod A, Tamaki K, Neil DL, Monckton DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 1991; 354: 204-209.

11 Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, Vigilant L, Erlich HA. Population variation of human mt-DNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet* 1991; 48:370-382.

12 Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G y cols. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 1997; 110: 125-133.

13 Watson JD, Crick HC. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-738.

14 Hagelberg E, Sykes B. Ancient bone DNA amplified. *Nature* 1989; 342: 485.

15 Puertas MJ. Genética. Fundamentos y perspectivas. Ed. McGraw-Hill. Intreamericana de España. Madrid 1991.

16 Klug WS, Cummings MR. Conceptos de Genética (5ªed). Ed. Prentice Hall Iberica. Madrid 1999.

17 Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985; 314:67-73.

18 Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 746-756.

19 Edwards A, Hammond HA, Jin I, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992; 12: 241-253.

20 Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Mullican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR methods and Applicat.* 1993; 3: 13-22.

21 Urquhart A, Kimpton CP, Downes T, Gill P. Variation in short tandem repeat sequences-a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Leg Med* 1994; 107: 13-20.

22 Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Bero A, Young P, Sapolsky R y cols. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 1998; 280: 1077-1082.

23 Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *SciAm* 1990; 263: 56-65.

24 Varios autores. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Erlich HA (Ed) Stockon

Press 1989 U.S.A.

25 Pääbo S. Ancient DNA; extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1989; 86: 1939-1943.

26 Varios autores. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) Academic Press 1990 U.S.A.

27 Sullivan KM, Pope S, Gill P, Robertson JM. Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products. *PCR Methods* 1992; 2: 34-40.

28 Saiki RK, Walsh PS, Levenson Ch, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc of Natl Academy of Sci U.S.A.* 1989; 86: 6230-6234.

29 Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* 1999; 21: 33-37.

30 Hopgood R, Sullivan K, Gill P. Strategies for automated sequencing of human mitochondrial DNA directly from PCR products. *Biotechniques* 1992; 13: 82-92.71

31 Marley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JC, Hewitt CA, Tully G. Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 1999; 112: 241-248.

32 Vigilant I, Pennington R, Harpending H, Kocher TD. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9350-9354.

33 Boghenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and Human Hella cells. *J Biol Chem* 1974; 249: 7991-7995.

34 Robin DE, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* 1988; 136: 507-513.

35 Anderson S, Bankier AT, Barrel BG, De Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J y cols. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 287-312.

36 Wilson MR, Di Zinow JA, Polansky D, Replogle J, Budowle B. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Leg Med* 1995; 108: 68-74.

37 Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis validation and use for forensic casework. *Forensic Sci Rev* 1999; 11: 21-50.

38 Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Allison-Grenier R, Wilson MR y cols. A high observed substitution rate in human mitochondrial DNA control region. *Nature Genet* 1998; 18: 109-110.

39 Jazin E, Soodyall H, Jalleneck P, Lindholm E, Stoneking M, Gyllenstein U. Mitochondrial mutation rate re-visited: hot spots and polymorphisms. *Nature Genet* 1998; 109-110.

40 Alonso A, Martin P, Albarran C, Garcia O, Sancho M. Rapid detection of sequence polymorphisms in the human mitochondrial DNA control region by polymerase chain reaction and single-strand conformation analysis in mutation detection enhancement gels. *Electrophoresis* 1996; 17: 1299-1301.

41 Barros F, Lareu MV, Salas A, Carracedo A. Rapid and enhanced detection of mitochondrial DNA variation using single-strand conformation analysis of superposed restriction

enzyme fragments for polymerase chain reaction-amplified products. *Electrophoresis* 1997; 18: 52-54.

42 Bodenteich A, Mitchell LG, Polimeropoulos MH, Merrill CR. Dinucleotide repeat in the human mitochondrial D-loop. *Human Mol Genet* 1992; 1: 140.

43 Jobling MA, Pandya A, Tayler-Smith C. The Y chromosome in forensic and paternity testing. *Int J Legal Med* 1997; 110: 118-124.

44 Roewer L, Armemann J, Spurr NK, Grzeschik KH, Epplen JT. Simple repeat sequences on the human Y Chromosome are equally polymorphic as their autosomal counter parts. *Hum Genet* 1992; 89: 389-394

45 Caeiro B, Ordoñez F, Carril L, Carril JC. PCR-RFLP Y-polymorphisms and their application to a Northern African population. *En Progress in Forensic Genetics 8*. GF Sensabaugh, PJ Lincoln, B Olaisen (eds.) Elsevier. The Netherlands 2000.

46 Jobling MA, Bonzekri N, Taylor PG. Hypervariable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite MSY1 (D1F155S1). *Hum Mol Genet* 1998; 7: 643

47 Carracedo A, Rodriguez-Calvo MS, Pestoni C, Lareu MV, Bellas S, Salas A y cols. Standardization of forensic DNA analysis in Europe. *Forensic Sci Int* 1997; 86: 87-102.

48 Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P y cols. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat system. *Int J Legal Med* 1997; 110: 175-176.