

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Antropología



**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE ADN EN RESTOS
HUMANOS ANTIGUOS Y MUESTRAS FORENSES
CRÍTICAS: VALORACIÓN DE ESTRATÉGIAS Y
RESULTADOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lourdes Prieto Solla

Bajo la dirección de los doctores

José María Ruiz de la Cuesta Cascajares

Eduardo Arroyo Pardo

María Dolores Marrodán Serrano

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-1714-4

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Facultad de Biología. Departamento de Antropología.
Facultad de Medicina. Departamento de Toxicología y
Legislación Sanitaria.**



**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE ADN EN RESTOS
HUMANOS ANTIGUOS Y MUESTRAS FORENSES CRÍTICAS.
VALORACIÓN DE ESTRATEGIAS Y RESULTADOS.**

**Memoria que presenta, para optar al grado de doctor,
LOURDES PRIETO SOLLA**

El Doctor D. José M^a Ruiz de la Cuesta Cascajares, Jefe del Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Cátedra de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, el Doctor Eduardo Arroyo Pardo, profesor asociado del mismo Departamento y la Doctora D^a Dolores Marrodán Serrano, Profesora Titular del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral: “ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE ADN EN RESTOS HUMANOS ANTIGUOS Y MUESTRAS FORENSES CRÍTICAS. VALORACIÓN DE ESTRATEGIAS Y RESULTADOS” de la Licenciada en Ciencias Biológicas D^a. Lourdes Prieto Solla ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria de la Facultad de Medicina, considerando que cumple todos los requisitos para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Madrid, a 25 de Abril de 2002.

D. José M^a Ruiz de la
Cuesta Cascajares

D. Eduardo Arroyo
Pardo

D^a. Dolores Marrodán
Serrano

INDICE	
I.- JUSTIFICACIÓN	13
II.- PARTE TEÓRICA.....	17
1.- MUESTRAS FORENSES Y SU RECOGIDA CON VISTAS AL ANÁLISIS DE ADN.....	17
1.1.- INTRODUCCIÓN	17
1.2.- MUESTRAS DE SANGRE	18
1.2.2.- Recogida.....	19
1.3.- MUESTRAS DE SEMEN	21
1.3.1.- Composición	21
1.3.2.- Recogida.....	21
1.4.- MUESTRAS DE SALIVA.....	22
1.4.1.- Composición	22
1.4.2.- Recogida.....	22
1.5.- MUESTRAS DE CÉLULAS DE DESCAMACIÓN	24
1.5.1.- Composición	24
1.5.2.- Recogida.....	24
1.6.- MUESTRAS DE PELOS	25
1.6.1.- Composición	25
1.6.2.- Recogida.....	26
1.7.- MUESTRAS DE TEJIDOS	26
1.7.1.- Composición	26
1.7.2.- Recogida.....	26
1.8.- UÑAS	28
1.8.1.- Composición	28
1.8.2.- Recogida.....	28
1.9.- RESTOS ÓSEOS.....	29
1.9.1.- Composición	29
1.9.2.- Recogida.....	30
1.10.- DIENTES.....	30
1.10.1.- Composición	30
1.10.2.- Recogida.....	31
2.- EXTRACCIÓN DE ADN: FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA.....	33
2.1.- INTRODUCCIÓN.....	33
2.2.- EXTRACCIÓN ORGÁNICA.....	33
2.3.- EXTRACCIÓN NO ORGÁNICA.....	34
2.4.- PURIFICACIÓN.....	35
2.5.- RECOMENDACIONES	35
3.- DIFERENTES MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO.....	37
3.1.- FLUORIMETRÍA.....	37
3.2.- ESPECTROFOTOMETRÍA.....	38
3.3.- MINIGEL DE AGAROSA.....	38
3.4.- HIBRIDACIÓN CON Sonda (DOT-BLOT Y SLOT-BLOT)	40
3.5.- CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA.....	41
4.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	43
4.1.- INTRODUCCIÓN.....	43
4.2.- PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	51
5.- DEFINICIÓN DE MUESTRA CRÍTICA EN LOS ANÁLISIS VÍA PCR.....	57
5.1.- INTRODUCCIÓN	57

5.2.- INHIBIDORES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	57
5.3.- DEGRADACIÓN DEL ADN.....	61
5.4.- LESIONES EN EL ADN.....	63
6.- MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN “in vivo”.....	67
6.1.- INTRODUCCIÓN.....	67
6.2.- FIDELIDAD DE LA REPLICACIÓN.....	67
6.3.- SISTEMAS REPARADORES.....	68
6.3.1- Fotorreactivación mediante fotoliasas.....	72
6.3.2- Reparación por escisión.....	73
7.- POLIMORFISMOS DEL ADN.....	79
7.1.- INTRODUCCIÓN.....	79
7.2.- TIPOS DE POLIMORFISMOS.....	80
7.2.1- Polimorfismos de secuencia.....	82
7.2.2- Polimorfismos de repetición.....	84
7.3.- POLIMORFISMOS DEL CROMOSOMA Y.....	87
7.4.- POLIMORFISMOS EN EL ADN MITOCONDRIAL (ADNmt).....	90
7.4.1.- Introducción.....	90
7.4.2.- Composición.....	92
7.4.3.- Polimorfismos.....	92
7.5.- DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS DE LOS MARCADORES MÁS UTILIZADOS EN GENÉTICA FORENSE.....	97
7.5.1.- Polimorfismos de secuencia.....	97
7.5.1.1.- HLA-DQA1.....	97
7.5.1.2.- POLYMARKER:.....	98
7.5.1.3.- AMELOGENINA.....	99
7.5.2.- VNTRs.....	99
7.5.2.1.- D1S80.....	99
7.5.3.- STRs.....	100
7.5.3.1.- HUMTH01.....	100
7.5.3.2.- HUMTPOX.....	100
7.5.3.3.- HUMCSF1PO.....	100
7.5.3.D.- HUMVWA.....	100
7.5.3.E.- HUMF13A1.....	100
7.5.3.F.- HUMFES/FPS.....	101
7.5.3.G.- D3S1358.....	101
7.5.3.H.- HUMFGA.....	101
7.5.3.I.- D8S1179.....	101
7.5.3.J.- D21S11.....	101
7.5.3.K.- D18S51.....	102
7.5.3.L.- D13S317.....	102
7.5.3.M.- D5S818.....	102
7.5.3.N.- D7S820.....	102
8.- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE ADN.....	103
8.1.- INTRODUCCIÓN.....	103
8.2.- ELECTROFORESIS.....	103
8.2.1. Electroforesis convencional.....	103
8.2.2- Electroforesis Capilar (CE).....	106
8.2.3.- Electroforesis Capilar en Microchip.....	108
8.2.4.- Espectrometría de Masas MALDI-TOF.....	108
8.3.- TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	108
8.3.1.- Tipos de Hibridación.....	108

8.3.2.- Chip de Hibridación.	110
8.4.- SECUENCIACIÓN.	111
8.4.1.- Secuenciación automática.....	111
8.4.2.- Minisequenciación fluorescente en fase sólida.....	115
9.- PRÁCTICA FORENSE	117
9.1.- DETERMINACIÓN DE LA NATURALEZA DE LA MUESTRA.....	117
9.2.- DETERMINACIÓN DEL ORGANISMO DE PROCEDENCIA.....	118
9.3.- INDIVIDUALIZACIÓN DE LA MUESTRA.....	120
9.3.1.- EXTRACCIÓN	120
9.3.2.- CUANTIFICACIÓN	124
9.3.3.- AMPLIFICACIÓN Y TIPADO	124
10.- Aplicaciones a la antropología y arqueología.....	129
III.- OBJETIVOS.....	135
IV.- PARTE EXPERIMENTAL	137
1.- OBJETIVO A.: COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN RESTOS ÓSEOS.....	139
1.1.- INTRODUCCIÓN	139
1.2.- MATERIALES Y MÉTODOS	140
1.2.1.- Tipos de muestras analizadas	140
1.2.2.- Preparación de las muestras	140
1.2.3. – Descripción de los métodos de extracción de ADN utilizados .	142
1.2.4.- Detección y cuantificación del ADN.....	145
1.2.5.- Amplificación del ADN en reacciones “multiplex”.....	145
1.2.6.- Análisis del producto amplificado.....	145
1.3.- RESULTADOS	145
1.4.- CONCLUSIONES.....	150
2.- OBJETIVO B.: OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN EN EXTRACTOS DE ADN CRÍTICOS.....	151
2.1.- INTRODUCCIÓN	151
2.2.- DOBLE PCR.....	151
2.2.1.- MATERIALES Y METODOS.....	153
2.2.1.1.- Tipos de muestras analizadas:.....	153
2.2.1.2.- Extracción de ADN.....	154
2.2.1.3.- Protocolo de Amplificación y Tipaje.....	155
2.2.2.- RESULTADOS	155
2.2.3.- DISCUSIÓN.....	160
2.3.- DOBLES PURIFICACIONES.....	163
2.3.1.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	164
2.3.1.1-Tipos de muestras analizadas.....	164
2.3.1.2.- Protocolos de purificación.....	164
2.3.1.3.- Amplificación del ADN en reacciones multiplex.....	165
2.4.1.4.- Análisis del producto amplificado.....	165
2.3.2.- RESULTADOS	165
2.3.3.- CONCLUSIONES	167
2.4.- PREAMPLIFICACIÓN INESPECÍFICA.....	169
2.4.1.- INTRODUCCIÓN.....	169
2.4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	171
2.4.2.1- Tipos de muestras analizadas.....	171
2.4.2.2.- Extracción de ADN.....	171
2.5.2.3.- Digestión y Cuantificación del ADN de las muestras del grupo a.....	171

2.4.2.4.- Cuantificación del ADN de las muestras de los grupos b, c y d.	172
2.4.2.5.- Primera amplificación y tipado del ADN de las muestras.....	172
2.4.2.6.- Preamplificación sin cebadores del ADN degradado y escaso.	173
2.4.2.7.- Segundo análisis PCR para comprobar el efecto de la preamplificación sin cebadores.....	174
2.4.3.- RESULTADOS.....	174
2.4.3.1.- Muestras del Grupo a (ADN digerido a partir de sangre líquida).	174
2.4.3.2.- Muestras del Grupo b (sangre líquida expuesta a condiciones medioambientales).....	177
2.4.3.3.- Muestras del Grupo c (manchas almacenadas durante 12 años).....	181
2.4.3.4.- Muestras del Grupo d (sangre líquida a 4°C durante 1-2 años).	181
2.4.4.- DISCUSIÓN	182
V.- CONCLUSIONES FINALES	187
VI. BIBLIOGRAFÍA	190

**ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE ADN EN RESTOS
HUMANOS ANTIGUOS Y MUESTRAS FORENSES
CRÍTICAS. VALORACIÓN DE ESTRATEGIAS Y
RESULTADOS**

I.- JUSTIFICACIÓN

I.- JUSTIFICACIÓN

Cuando la muerte es debida a una catástrofe o un homicidio, la identificación de las víctimas puede ser de vital importancia para entregar los cadáveres a sus familiares, para esclarecer como transcurrieron los hechos o para establecer el posible culpable.

La identificación positiva de restos humanos ha sido siempre una de las mayores preocupaciones de las Ciencias Forenses. La huella dactilar y los datos dentales o esqueléticos han sido hasta hace poco buenas herramientas para este propósito. Sin embargo, la aplicación de la Biología Molecular en los laboratorios forenses abrió nuevas perspectivas para la identificación directa; en un principio la técnica más utilizada fue la “huella genética”, pero tenía el gran inconveniente de que se necesitaban grandes cantidades de ADN¹ en buen estado para poder aplicarla. Hoy en día es posible resolver casos donde la cantidad de muestra disponible es mínima. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)² se ha convertido en un método indispensable en los Laboratorios forenses, ya que gracias a esta técnica es posible el estudio de muestras que contienen mínimas cantidades de ADN o que lo presentan parcialmente degradado (Innis y Gelfand, 1990; King, 1991). De esta manera se pueden analizar muestras en las que antes era imposible pensar que se obtuviera un resultado positivo. Así, hoy en día, incluso está descrita la identificación de sospechosos de estrangulación a través del estudio del ADN de las células epiteliales que ha dejado en el cuello de su víctima, con un éxito de más del 70% (Wiegand y Kleiber, 1997).

Siempre que es posible, la identificación de víctimas se realiza mediante comparación con datos ante-mortem, como fichas dentales o radiografías (Farinelli Fierro, 1993; Sopher, 1993; López Palafox, 1996; Brkic y cols., 1997). Cuando no existe este tipo de información ante-mortem o los restos se encuentran demasiado fragmentados, la identificación positiva es imposible a través de estos métodos. Hoy en día está ampliamente extendida la identificación genética de las víctimas a través de la comparación con posibles familiares de las mismas (Hagelberg y cols., 1991a; Sajantila y cols., 1991; Mannucci y cols., 1993; Gill y cols., 1994; Clayton y cols., 1995; Sweet y cols., 1995; Yamamoto, 1996; Prieto y cols. 1997; Prieto y cols., 2001), así como a través de la comparación con muestras procedentes de objetos personales (peine, cepillos de dientes, maquinillas de afeitar...) pertenecientes a las propias víctimas (Sasaki y cols., 1997).

Sin embargo, la identificación genética puede complicarse cuando existen largos períodos de tiempo entre la muerte y la aparición del cadáver o cuando la muerte ocurrió en unas condiciones críticas (explosiones por ejemplo). La destrucción o descomposición de los tejidos blandos deja sólo huesos y dientes disponibles para el análisis. Todavía se nos presentan casos en los cuales somos incapaces de dar una respuesta clara y contundente. Tal

¹ Molécula en forma de doble hélice que transmite información genética y que está formada por subunidades denominadas desoxirribonucleótidos monofosfato, cada uno de ellos consistente en: una base nitrogenada (adenina, timina, guanina o citosina), una molécula de fosfato y un azúcar (desoxirribosa).

² Proceso de copia o multiplicación (amplificación) de una secuencia de ADN.

es el caso del estudio de ciertas muestras que han estado sometidas a condiciones ambientales muy desfavorables para la conservación del ADN, por ejemplo un cadáver que ha permanecido durante meses en un ambiente húmedo como una depuradora y se ha esqueletizado bajo estas condiciones de abundante presencia de agua. En estos casos el ADN ha desaparecido o el escaso ADN que pueda permanecer en las muestras se encuentra totalmente degradado. No debemos olvidarnos además de la posible presencia de inhibidores de la ADN Polimerasa en las muestras quedando impedido el estudio por técnicas PCR.

Por todo ello hemos de recurrir a análisis alternativos, como el estudio de ADN mitocondrial del cual posiblemente se conserve un número de copias más elevado por encontrarse presente en mayor cantidad en las células que el ADN nuclear; en algunos casos puede resultarnos imprescindible la identificación individual y todos sabemos que el ADN mitocondrial no identifica individuos sino líneas familiares.

En los últimos años se han publicado un gran número de trabajos que muestran la posibilidad de aislar ADN a partir de restos orgánicos arqueológicos. Estas muestras tan antiguas pueden aportarnos valiosa información respecto a diversos aspectos como la filogenia de especies extinguidas (Thomas y cols., 1989; Krajewski y cols., 1992; Christidis y cols., 1996; Krings y cols. 1997, 1999 y 2000), o el grado de evolución de especies no extinguidas (Leonard y cols., 2000; Pääbo, 2000; Ingman y cols., 2000; Vila y cols., 2001). Las estructuras celulares y subcelulares generalmente no se encuentran bien conservadas en los restos arqueológicos, aunque algunas veces es posible recuperar ADN genómico. La aptitud que una muestra antigua tiene para ser susceptible de análisis genético depende del tiempo transcurrido y en mayor medida de las condiciones ambientales a las que ha estado sometida. Casos excepcionales como las bajas temperaturas, la desecación rápida o las altas concentraciones salinas hacen que muestras más antiguas puedan ser estudiadas con éxito relativo. Unas muestras tan críticas como éstas también son interesantes para nosotros, por lo que pretendemos desarrollar algunos de los análisis que proponemos también en este tipo de restos.

Este trabajo en definitiva pretende analizar distintas alternativas para el estudio de ADN nuclear en muestras críticas. Es habitual trabajar al máximo en el Laboratorio con estas muestras y no obtener ningún resultado concluyente, lo cual muchas veces resulta desalentador.

II.- PARTE TEÓRICA

II.- PARTE TEÓRICA

1.- MUESTRAS FORENSES Y SU RECOGIDA CON VISTAS AL ANÁLISIS DE ADN.

1.1.- INTRODUCCIÓN

En la investigación pericial de un indicio biológico destacan tres grandes etapas: (i) la **búsqueda** en la escena del crimen, (ii) la **recogida y envío** al laboratorio y (iii) la **investigación analítica**. Las normas para la búsqueda, recogida y envío de muestras al laboratorio deben cumplirse con rigor ya que, en muchos casos, de ello dependerá el éxito de la posterior analítica.

Dicha búsqueda en el escenario del crimen ha de ser meticulosa y cuidadosa como la de cualquier indicio, biológico o no. Si bien cada caso es único y es la experiencia la que regula el mecanismo de actuación, se ha de procurar dañar lo menos posible las pruebas y por ello manipularlas sólo lo estrictamente necesario, para lo cual se precintará la zona y se tomarán fotografías y esquemas de la colocación de los diferentes indicios que puedan ayudarnos a la reconstrucción de los hechos.

Se mirará especialmente en lugares donde puedan quedar restos, incluso aunque se hubieran intentado eliminar limpiando la escena. Este es el caso de las zonas de unión de los baldosines de suelo y paredes, la unión entre la hoja y el mango en un machete, el interior de las uñas de la víctima o agresor, la ropa íntima si se sospecha delito contra la libertad sexual, etc.

El uso de sobres de papel en lugar de bolsas de plástico es importante en el caso de indicios biológicos pues el plástico o los recipientes herméticamente cerrados crean condiciones de anaerobiosis que favorecen la putrefacción de las muestras y el crecimiento de hongos en condiciones de humedad.

De todas las muestras recogidas en la Inspección Ocular deberá realizarse el correspondiente **Acta**, en el que consten perfectamente descritos los efectos remitidos, en qué lugar estaban, en qué condiciones y a qué Laboratorio se mandan para su estudio. Asimismo se expondrá de forma clara y concisa el **tipo de análisis** que se desea sobre cada efecto enviado. Debe existir un documento anejo (**cadena de custodia**) al envío de muestras, que acredite la observación de las mismas en todo momento (durante la toma de muestras, su transporte, la analítica en el Laboratorio, y su devolución al correspondiente Organismo que solicitó el estudio).

Hoy en día es de gran importancia la buena praxis en la recogida y envío de muestras biológicas pues si esta etapa no cumple los requerimientos legales y científicos, la prueba no será admitida en el Juicio Oral. Si la evidencia no está perfectamente documentada su origen será cuestionado, si no está bien recogida puede perder las propiedades biológicas a estudiar, si no está perfectamente empaquetada puede ser susceptible de contaminación y si no se toman precauciones para evitar putrefacción y descomposición es posible que la muestra no se pueda analizar.

Una vez en el Laboratorio, el perito debe realizar también una descripción y numeración de los efectos recibidos, indicando de qué tipo de efecto se trata

(cuchillo, navaja, machete, prendas, zapatos, llavero, filtro de cigarrillo, etc.), su color, su forma, su marca, etiqueta y talla si procede, tipo de envoltorio que lo contenía y su estado de conservación. Es conveniente realizar un reportaje fotográfico de los efectos recibidos antes de proceder a su análisis.

Posteriormente se deben acotar, numerar y describir las zonas de los efectos recibidos que se van a analizar. Por ejemplo, si el efecto recibido es una navaja que presenta una mancha de posible sangre en la hoja y otra en el mango, es interesante analizarlas por separado y ello debe quedar reflejado en nuestro informe pericial, pues pudieran tratarse de dos sangres diferentes si el hecho delictivo es una reyerta.

Podemos realizar una clasificación de las muestras en cuanto a su identidad en dos grandes grupos:

Muestras dubitadas: son los restos biológicos que queremos identificar, pues desconocemos a quién pueden pertenecer.

Muestras indubitadas: son las muestras biológicas de referencia que conocemos a quién pertenecen y sirven para realizar el cotejo con las muestras dubitadas y así poder establecer una identidad.

En general, cualquier tipo de muestra biológica es analizable en el laboratorio. La mayor parte del material genético de los organismos superiores se halla dentro de las células que lo forman, concretamente en un compartimento llamado núcleo, aislado del resto de la célula y protegido por la membrana nuclear. En organismos más simples como las bacterias, el ADN carece de esta protección y está expuesto libremente en el citoplasma de las mismas.

Cada parte de nuestro cuerpo, cada tejido, cada órgano, está formado por diferentes tipos de células especializadas en funciones concretas; así las células musculares tienen totalmente ocupado su citoplasma por miofibrillas musculares de proteínas contráctiles (actina y miosina) que permiten al tejido muscular realizar su función.

Veremos brevemente cuales son los tipos celulares que nos encontramos en las muestras que llegan al Laboratorio de Biología Forense con el fin de entender por qué se logra extraer ADN de dichas muestras. Los vestigios biológicos que más comúnmente reciben los laboratorios forenses con fines identificativos son: sangre, esperma, saliva, restos orgánicos, pelos, tejidos, uñas, restos óseos y dientes.

1.2.- MUESTRAS DE SANGRE

1.2.1.- Composición.

Los componentes celulares mayoritarios en el tejido sanguíneo son los eritrocitos (también llamados glóbulos rojos o hematíes) y los leucocitos (glóbulos blancos). Los primeros son células maduras especializadas en el transporte de oxígeno por medio de la hemoglobina. Su citoplasma está ocupado totalmente por esta proteína de transporte y por ello son células que han perdido el núcleo y los orgánulos celulares. No presentan núcleo y por tanto no contienen ADN nuclear. Sin embargo, la sangre resulta ser una

adecuada fuente de ADN por encontrarse en ella, aunque en menor número, otras células nucleadas, los leucocitos. De este tipo celular es de dónde lograremos extraer el ADN de las muestras de sangre. La cantidad estimada de ADN en sangre completa es de 30-60 $\mu\text{gr}/\text{mL}$ (Kobilinsky, 1992).

1.2.2.- Recogida

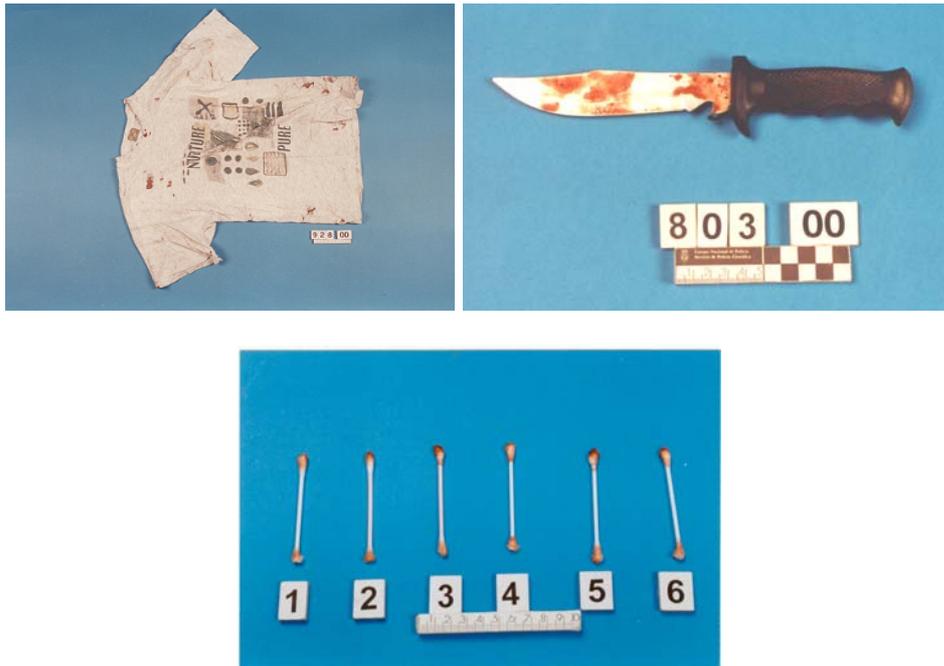
La sangre se puede encontrar en diferentes estados: líquida o en forma de mancha. El aspecto de las manchas de sangre varía con la antigüedad y el soporte sobre el que se encuentran. Como norma general, cuanto más antigua es una mancha de sangre más oscuro es su color, pero siempre son las condiciones ambientales (microclima), las que determinan el aspecto de la mancha. Las condiciones de envío de las muestras de sangre varían según el estado en que se encuentre:

* Sangre líquida:

Se han de enviar 5 c/c. de sangre en un tubo perfectamente etiquetado que contenga anticoagulante (EDTA) y preferiblemente refrigerada (4–8 °C). En la etiqueta debe constar al menos la fecha, la localidad, el nombre completo del sujeto al que se le extrajo la sangre y el número de caso o de diligencias. Además es aconsejable disponer de contenedores aptos para introducir los tubos y evitar así su rotura. Como precaución se puede acompañar de una gasa o tela manchada con la sangre en cuestión y un trozo de la misma tela o gasa sin manchar a modo de blanco. La sangre en forma de mancha se conserva mejor que en su estado líquido cuando no hay posibilidad de refrigerarla. Con una única gota de sangre sobre la gasa sería suficiente pero varias gotas permitirán repetir el experimento en caso de que algo falle durante el proceso de análisis. A partir de 10 μL de sangre completa, que en buen estado contiene unas 7000-8000 células blancas por μL ., se pueden aislar aproximadamente 500 ηgr de ADN, aunque siempre depende de la eficacia de la extracción.

* Mancha de sangre sobre superficies absorbentes:

Si tuviéramos una prenda de vestir manchada, aunque sólo fuera una pequeña parte (el cuello o el puño de una camisa) se enviará la prenda completa al Laboratorio (Fotografía nº 1); pero si la prenda u objeto fuera suficientemente grande (un sofá, un colchón), se recortará la zona manchada dejando un margen de uno o dos centímetros sin mancha que servirá como control negativo en el Laboratorio. En los tejidos claros las manchas presentan un color rojo oscuro que con el tiempo tiende a ennegrecerse más. En los tejidos oscuros las manchas se visualizan mal y las encontraremos sólo por el tacto acartonado que confieren a la tela. Es aconsejable mandar la prenda bien seca y en bolsa de papel, ya que si se envía húmeda y en bolsa de plástico el proceso de putrefacción se acelera. La muestra se puede dejar secar a temperatura ambiente y evitando su exposición al sol. A veces resulta más difícil obtener resultados en la analítica de manchas con abundante sangre, en las cuales el secado ha sido lento e incompleto, que en pequeñas manchas de sangre donde el secado se ha producido rápida y totalmente, y no ha dado tiempo a que actúen los procesos de descomposición.



Fotografía nº 1: Manchas de sangre: izquierda arriba: Prenda con diversas manchas de sangre; derecha arriba: machete con diversas manchas de sangre en mango y hoja; abajo: Torundas de algodón impregnados en suero y utilizados para recoger muestras de sangre.

*** Mancha de sangre sobre superficies no absorbentes:**

Cuando la mancha se encuentra sobre una superficie no absorbente forma costras con aspecto de escamas brillantes o agujas (Fotografía nº 1); en manchas recientes las escamas son rojas aunque el color depende más bien del grosor de la costra (a menor espesor el rojo es más acusado); con la antigüedad las costras se van haciendo más oscuras. Si el objeto manchado fuera pequeño se enviará directamente, pero si no fuera posible (pared, suelo, mesa) se dejará secar la mancha si aún estuviera húmeda y se procederá al raspado y recogida de las costras en un sobre de papel. Se adjuntará una descripción de dónde fue hallada con esquemas o fotografías si fueran necesarias.

Antiguamente se realizaba una técnica denominada transplante de Taylor para recoger estas muestras. Este se efectúa poniendo un papel de filtro sobre la mancha y aplicando una gota de suero salino isotónico (9gr. de ClNa en 1 litro de agua) sobre la mancha; se espera a que se seque y se repite el proceso hasta que toda la mancha pase al papel. El proceso es tedioso y largo, por lo que es más práctico recoger la mancha con una torunda (bastoncillo de limpieza de oídos) de algodón ligeramente humedecida con suero salino isotónico (Fotografía nº 1). Debe usarse una torunda por mancha y si la mancha es muy grande se puede usar más de una. Dichas torundas deben dejarse secar a temperatura ambiente y se remiten en sobres de manera individual indicando perfectamente dónde fueron recogidas.

1.3.- MUESTRAS DE SEMEN

1.3.1.- Composición

El esperma total recién emitido es un líquido filante, cremoso, de color opalino que tiende a amarillo verdoso cuando pasa el tiempo y de olor típico. Consta de dos elementos distintos: (i) las células que proceden de los tubos seminíferos del testículo y (ii) el plasma seminal que procede del epidídimo, próstata, vesículas seminales y glándulas de Cowper. En este tipo de fluido el componente celular más abundante es el espermatozoide y el plasma seminal sirve como soporte, vehículo y medio nutricio y de estabilización al espermatozoide. El eyaculado normal es de 2 a 6 mL, conteniendo unos 100 millones de células por mililitro.

El espermatozoide es una célula que posee un flagelo para poder moverse a través del aparato genital interno femenino y alcanzar el óvulo. Por tanto, la función del espermatozoide es producir la fecundación del óvulo para perpetuar la especie. Para formar un nuevo ser, es necesario que se transmita toda la información genética que poseen los seres progenitores. Los espermatozoides contienen un gran núcleo cargado del ADN poseedor de dicha información, por lo que son un tipo celular idóneo para el estudio de polimorfismos genéticos. La cantidad de ADN estimada en semen es de 480 $\mu\text{gr/mL}$ (Baechtel, 1989), como vemos mucho mayor que la cantidad de ADN en sangre. A diferencia del resto de las células de nuestro organismo, cada espermatozoide (y en su caso los óvulos) presenta una sola copia de ADN (haploidismo), mientras que el resto de células son diploides pues presentan dos copias (la heredada del padre y la heredada de la madre).

1.3.2.- Recogida

La importancia de las manchas de esperma en el campo de la Biología Forense resulta evidente por ser pruebas indiciarias fundamentales en los delitos contra la libertad sexual. Son después de las manchas de sangre el indicio biológico que con más frecuencia se envía para su estudio a los laboratorios de analítica forense.

La búsqueda sobre la víctima y el agresor son fundamentales en este caso, debiendo tomarse muestras en el canal vaginal, recto y faringe de la víctima (según el tipo de agresión) así como realizar una inspección de las ropas de víctima y agresor, especialmente de la ropa interior. Las muestras de esperma que llegan al Laboratorio de Biología Forense son de varios tipos:

* **Torundas / hisopos de toma de muestras vaginales y lavados vaginales**: Estos tipos de muestras suelen ser recogidas de la víctima bien en un centro sanitario o bien por parte del forense una vez denunciada la agresión. Las torundas o hisopos deben guardarse en fundas que no contengan ningún medio conservante y se remitirán al Laboratorio por el medio más rápido. El lavado vaginal debe realizarse con 10 c/c. de suero fisiológico y tiene como finalidad asegurar al máximo la recogida de los posibles restos de semen. Ambos tipos de muestras estarán perfectamente etiquetadas y se enviarán refrigeradas.

* **Manchas de semen:** Las manchas de esperma producidas durante una agresión sexual suelen localizarse en las prendas que la víctima portaba en el momento de la agresión (ropa interior, medias, pañuelo con el que posiblemente se limpiara la persona agredida, etc.). Como en el caso de las manchas de sangre, estos efectos deben enviarse completos, perfectamente etiquetados, secos y en bolsas de papel independientes. Se procurará manipular lo menos posible la muestra para evitar estropearla.

Si la tela sobre la cual se asienta la mancha es blanca y absorbente, ésta es difícil de distinguir y hay que buscarla por transparencia y al tacto. A veces es necesaria la búsqueda con luz ultravioleta o con luz láser con las que se ve una fluorescencia característica. Si la tela es blanca no absorbente, las manchas toman aspecto de mapas, con bordes bien limitados y consistencia de almidón. Si la tela no es blanca resulta mucho más fácil encontrar las manchas a simple vista. Las manchas de esperma sobre la piel aparecen como pinceladas de barniz o laca; se detectan buscando sobre ángulos de reflexión de la luz. Sobre un objeto sólido o superficie pulida se forman costras brillantes que habrá que permitir que se sequen para rasparlas con una espátula y enviar las costras al laboratorio.

Es deseable acompañar las muestras con un breve cuestionario donde figuren datos como el tipo de agresión (vaginal, anal, oral, eyaculación externa), el número de agresores, si éstos usaron preservativos, si la víctima se lavó después de la agresión, si tenía la menstruación o si ha tenido algún coito consentido en las últimas 72 horas. Además es conveniente enviar también **muestra biológica indubitada de la víctima** con su consentimiento y del agresor, si existe sospechoso, para cotejar los resultados de la analítica. Lo normal es que las manchas de semen se encuentren mezcladas con flujo vaginal, aunque también a veces se encuentran contaminadas por orina, heces u otras sustancias diversas debido a las prácticas que con relativa frecuencia se asocian a este tipo de delitos.

1.4.- MUESTRAS DE SALIVA

1.4.1.- Composición

La secreción salival del hombre varía entre 1 y 1,5 litros diarios. Tiene una función lubricante y facilitadora de la masticación y la deglución; asimismo posee una función enzimática desdoblado los glúcidos (amilasa). Durante la noche casi deja de segregarse. La saliva en sí, no es un fluido que contenga componente celular y por ello carece por sí misma de ADN; pero se encuentra en un medio lleno de células epiteliales (epitelio bucal). Estas células se desprenden continuamente y llegan a formar parte de la saliva. Así, un chicle puede contener células del epitelio bucal que son nucleadas y por tanto contienen ADN; en un filtro de cigarrillo nos podemos encontrar células adheridas a él que se han desprendido del epitelio labial.

1.4.2.- Recogida

Las muestras de saliva suelen presentarse en su mayoría en forma de manchas. Se asientan normalmente sobre filtros de cigarrillo, chicles, cepillos de dientes, sobres y sellos. Para su recogida es fundamental la manipulación con

pinzas evitando en todo momento el contacto directo con las manos. Otras veces, la saliva asienta sobre vasos y latas de bebida; en este caso se ha de recoger la muestra pasando por la zona donde presumiblemente se apoyaron los labios un hisopo impregnado en suero salino, como si de una muestra de sangre se tratase. También es frecuente el análisis en pasamontañas, medias o mascarillas utilizadas en atracos y robos con la finalidad de ocultar el rostro, recortándose, en estos casos, la zona que aproximadamente coincide con la boca para proceder a su estudio (Fotografía nº 2).

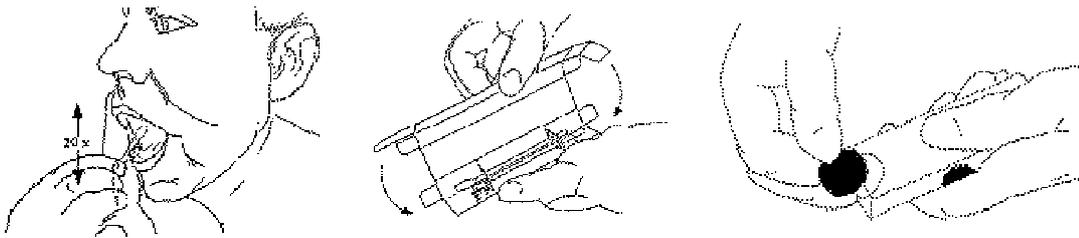
En muestras como sobres y sellos es frecuente que sea necesario otro tipo de estudio y que dichas muestras tengan que ser analizadas en varios departamentos (análisis lofoscópico para el estudio de huellas o análisis documentoscópico para el estudio de las zonas escritas del sobre). Por ello es imprescindible en este tipo de muestras señalar claramente el tipo de estudios que se requiere.

En caso de varias muestras se deberán enviar **separadas**; por ejemplo, los filtros que hay en un cenicero se deben mandar uno a uno, en sobres separados, y prescindiendo de los restos de ceniza que puedan quedar en el cenicero.



Fotografía nº 2: Manchas de saliva.

Hoy en día es cada vez más frecuente el uso de saliva recogida en un hisopo como muestra biológica indubitada (de referencia) pues, en contraposición con la extracción de sangre, resulta un método no invasivo, no doloroso y además se evita el peligro de vertido o rotura de los tubos de sangre líquida tradicionales. Para su recogida se ha de frotar el hisopo limpio de algodón contra la cara interna de las mejillas con el fin de arrastrar el mayor número de células del epitelio bucal.



Fotografía nº 3: Esquema de recogida de muestra indubitada.

Posteriormente se deja secar el hisopo a temperatura ambiente sin que incida directamente la luz solar sobre él y una vez seco puede introducirse en una caja de cartón o sobre de papel, evitando siempre los contenedores de plástico (Fotografía nº 3). Este tipo de muestras no necesita refrigeración, lo cual es un motivo más para preferir su uso en lugar de las muestras de sangre. Como en los casos anteriores los hisopos de saliva deben ir acompañados de etiquetas identificativas.

1.5.- MUESTRAS DE CÉLULAS DE DESCAMACIÓN

1.5.1.- Composición

Se trata de muestras forenses producidas por el rozamiento de distintas partes de cuerpo con prendas u objetos, por lo que en la mayoría de las ocasiones están formadas por células de descamación del tejido epitelial. En ocasiones puede ser interesante en la práctica forense saber quién ha utilizado una prenda o quién empuñó un cuchillo. El simple roce de la piel con el cuello de una camisa por ejemplo hace que se desprendan células epiteliales nucleadas que quedan adheridas a la prenda en cuestión permitiendo así su identificación.

1.5.2.- Recogida

Normalmente se enviará completa la prenda u objeto susceptible de análisis. Una vez en el laboratorio será el perito el que decida de qué zona tomar la muestra (cuello, puños, axilas, el interior de la parte delantera en el caso de una gorra, etc.). Se trata de muestras muy críticas, pues se parte de unas pocas células para el análisis y la cantidad de ADN que se puede extraer a partir de una prenda sin manchas aparentes es mínima; la reacción de PCR se desarrolla a partir de un bajo número de copias de ADN (low copy number, LCN) y los resultados han de interpretarse con especial cuidado (Gill y cols., 2000; Whitaker y cols., 2001). Por ello se trata de un tipo de muestras que se han de manipular de manera excepcional a la hora de su recogida por lo que recomendamos siempre el uso de guantes y mascarilla para evitar contaminaciones.

1.6.- MUESTRAS DE PELOS

1.6.1.- Composición

El pelo es una formación queratinizante derivada de la epidermis. Está formado por un extremo libre y por una raíz que termina en un ensanchamiento (bulbo) implantado en la dermis. La estructura íntima del pelo está formada por tres capas concéntricas:

- La **cutícula** es una envoltura formada por un número variable de capas de células dependiendo del grosor del pelo.
- La **corteza** está formada por células corticales que contienen microfibrillas de queratina y gránulos de melanina. Esta capa constituye la mayor parte del pelo y contribuye principalmente a establecer las propiedades mecánicas de éste.
- La **médula** representa la parte central y puede ser continua, discontinua o inexistente. Está formada por una trama de queratina esponjosa en la que se sustentan laminillas de material amorfo que llenan los espacios vacíos.

Los pelos son estructuras que muestran diferente composición según la zona que estudiemos. Se trata de un tejido vivo que se va queratinizando a medida que crece. La parte más alejada del cuero cabelludo está formada por células que tienen ocupado su citoplasma totalmente por una proteína estructural llamada queratina que da su forma al pelo. Por tanto, en esta zona distal, las células carecen de núcleo y de ADN. Sin embargo, en la zona proximal (bulbo o raíz), el pelo presenta células nucleadas totalmente activas que contienen ADN. Es imprescindible que los pelos encontrados en la escena del crimen presenten bulbo si lo que queremos es realizar un estudio de ADN nuclear.

Pero no todos los pelos con bulbo son susceptibles de análisis de ADN nuclear, por lo que es necesario realizar una selección previa a la analítica molecular, simplemente visualizándolos al microscopio. Dentro del conjunto de pelos que tengan bulbo existen algunos que son mejores que otros para los estudios de ADN. Los pelos que aún se encuentran en fase de crecimiento presentan bulbo activo rico en células y por ello son idóneos para los estudios de ADN. Los pelos caducos no presentan tal actividad y por ello no se obtienen resultados positivos en la analítica.

Se pueden diferenciar tres fases en la vida de un pelo: anagénica (fase de crecimiento y elevada actividad celular), catagénica (fase de madurez con moderada actividad celular) y telogénica (fase terminal sin actividad celular). Lógicamente, los pelos idóneos para el análisis de ADN son los anagénicos, seguidos de los catagénicos. Como norma general, los telogénicos se desechan si se pretende realizar un estudio de ADN nuclear, pero no si el estudio es de ADN mitocondrial.

El pelo **anagénico** que puede aparecer en la escena de un crimen normalmente ha sido arrancado. Es fácil identificarlos con el microscopio pues presentan bulbo en forma de cuchara, o de botón o de abanico; muchas veces el bulbo está retorcido y la zona del tallo próxima a él presenta una cubierta epitelial (manguito).

El pelo **telogénico** puede haber sido arrancado, pero lo normal es que se caiga espontáneamente. Presenta bulbo en forma de palillo de tambor y no suele aparecer la cubierta epitelial.

Finalmente, el pelo **catagénico** presenta un estadio intermedio entre el primero y el segundo. Es difícil discriminar qué pelos en estado catagénico darán resultados positivos en la extracción de ADN y cuáles no lo harán; por ello, recomendamos que se intente la analítica de ADN en todos ellos.

1.6.2.- Recogida

En la escena del crimen puede haber pelos del criminal o de la víctima, pero también de curiosos que contaminaron el lugar de los hechos. Por ello hay que ser rigurosos a la hora de elegir qué pelos se enviarán al Laboratorio, pues no todos los pelos presentes en el lugar de los hechos tienen la misma importancia. Por ejemplo, si el delito ha ocurrido en un local público es innecesario recoger todos los pelos que puedan estar presentes en el lugar; se ha de realizar una selección y centrarse sobre todo en pelos que la víctima pueda tener en las manos por ejemplo.

Los inconvenientes de este tipo de muestra son su poco peso y en ocasiones su escaso tamaño, lo cual dificulta su transporte y localización. Por ello, la manipulación del material se realizará con el máximo cuidado, preferiblemente se usarán guantes y se evitarán las pinzas, pues pueden ocasionar la fragmentación del pelo. Dichas muestras pueden enviarse en bolsas de plástico herméticamente cerradas, en frascos de cristal o en los típicos frascos de toma de muestra de orina, como siempre etiquetados.

Deben tomarse muestras de pelo control en la víctima, preferiblemente arrancándolos para que conserven su bulbo o raíz; pero si los estudios a realizar son análisis de polimorfismos de ADN nuclear no es necesario que la muestra control de la víctima sea también un grupo de pelos, sino que puede ser sangre o saliva.

1.7.- MUESTRAS DE TEJIDOS

1.7.1.- Composición

No es nuestra función realizar una descripción histológica de todos los tejidos y órganos que conforman nuestro organismo. Como norma general, cualquier tejido que contenga células nucleadas es una fuente adecuada para estudio de ADN. Sin embargo sí conviene tener en cuenta que existen unos tejidos mejores que otros. Por ejemplo, el bazo es uno de los sitios donde se activan los linfocitos y por ello posee gran cantidad de células nucleadas; sin embargo tiene el inconveniente de que se conserva tras la muerte menos que otros tejidos como el tejido muscular esquelético.

1.7.2.- Recogida

Este tipo de evidencias llega al Laboratorio de manera menos frecuente que las anteriores. Se trata de muestras relacionadas sobre todo con la identificación de cadáveres. Hay ocasiones en las que no aparece un cadáver hasta que no han transcurrido varios días desde la muerte y ya no disponemos

de sangre líquida de la cavidad cardiaca en perfecto estado, pues ya han dado comienzo los procesos de putrefacción.

Sin embargo, pueden conservarse aún algunos órganos como el bazo y el hígado. En este caso se puede recurrir a dichos órganos para la identificación genética. Es suficiente el envío de 10-15 gr de dichos órganos teniendo en cuenta que la muestra se debe tomar de las zonas que no han sido afectadas por agentes externos o por el calor en el caso de cadáveres calcinados. Las muestras se enviarán en frascos limpios, secos, perfectamente etiquetados y a ser posible, en condiciones de refrigeración (4-8°C). Estos tipos de muestras destinadas al estudio biológico nunca deben ser fijadas con formol (Fotografía nº 4).

También se puede recurrir a la toma de muestras del músculo esquelético de las zonas que se encuentren más preservadas de la putrefacción. Este tipo de tejido está formado por células musculares multinucleadas. Los núcleos son ovoideos y se disponen en la parte periférica de la célula, pues la mayor parte del espacio celular está ocupado por miofibrillas contráctiles de actina y miosina. Será suficiente con 10-20 gr de músculo, pero preferiblemente se tomarán muestras de dos regiones distintas. Las condiciones de envío son las mismas que las ya vistas para bazo o hígado.



Fotografía nº 4: Tejido muscular: izquierda: músculo esquelético enviado en formol; centro y derecha: músculo esquelético de un cadáver calcinado.

Para la identificación de cadáveres se puede utilizar como muestra de referencia tejido en preparaciones histológicas normalmente almacenadas en los hospitales si la víctima fue sometida a algún estudio médico antes de su muerte.

Frente a huesos y dientes, el tejido blando tiene el inconveniente de conservar, junto al ADN celular, la estructura proteica de la célula en mejor o peor estado. Las muestras de ADN así obtenidas deben depurarse lo más posible de proteínas, por interferir éstas en los análisis ulteriores. La calidad del ADN extraído de tejidos blandos mal conservados es menor que la del ADN extraído de hueso y diente pues contiene más contaminantes o impurezas inhibitorias y requiere una mayor purificación (Lassen y cols., 1994).

Una de las fuentes de contaminación más frecuentes son los ADNs de origen bacteriano que proliferan en estos tejidos. Además, la incapacidad de extraer ADN a partir de tejidos blandos cuando el período post-mortem es muy largo se debe a que el ADN de dichos tejidos puede degradarse de tal manera que no será lo suficientemente largo ni si quiera para un análisis PCR (Sajantila y

cols., 1991). Se ha demostrado que el ADN es bastante más estable en el hueso compacto (Hochmeister y cols., 1991) y por ello es preferible recurrir a este tipo de muestras en la identificación de cadáveres, a pesar de que la extracción convencional de ADN en hueso es bastante más laboriosa que en tejido blando.

1.8.- UÑAS

1.8.1.- Composición

Al igual que los pelos, las uñas están constituidas por células que contienen una proteína fibrosa muy resistente denominada queratina. El crecimiento de las uñas se debe a la división de células en la base y en la cara interna del cuerpo de la uña. Estas células emigran hacia el exterior al tiempo que experimentan un proceso de diferenciación específico denominado queratinización consistente en un aumento gradual de su contenido en microfibrillas de queratina, y la reabsorción del núcleo y de los orgánulos celulares. Por ello es lógico pensar que las uñas no contendrán una carga importante de ADN, sin embargo, en la práctica, dan mejores resultados de lo esperado. Existen protocolos de extracción de ADN específicos para este tipo de muestras (Pötsch y cols., 1994), pero la extracción convencional mediante Fenol/Cloroformo/Isoamilalcohol ofrece también buenos resultados.

1.8.2.- Recogida

Las uñas pueden interesarnos fundamentalmente por dos motivos: como muestra biológica indubitada para la identificación cadavérica (analizando la propia uña) o como lugar de búsqueda de restos biológicos si en un hecho delictivo medió lucha (Fotografía nº 5). En este último caso se tomará muestra de la uña raspando en su zona distal y se prescindirá del análisis de la propia uña; los restos biológicos que en este espacio pueden aparecer normalmente son mínimos por lo que las cantidades de ADN que obtendremos también lo serán y por ello estas muestras han de considerarse críticas. En el caso de la identificación cadavérica la uña se limpiará y se procesarán recortes de la misma.



Fotografía nº 5: Uñas: izquierda: uñas de víctima con restos de sangre del presunto autor; derecha: uña sometida a una solución de amoníaco para intentar la regeneración del pulpejo para identificación mediante necrorreseña que finalmente se identificó mediante polimorfismos de ADN.

1.9.- RESTOS ÓSEOS

1.9.1.- Composición

Cuando un cadáver se encuentra en avanzado estado de putrefacción o ya en su fase de esqueletización, no se ha perdido por completo la materia orgánica. El tejido óseo está compuesto por (Ham, 1975):

1.- **Substancia intercelular**, con dos componentes fundamentalmente distintos, uno es inorgánico (sales de calcio precipitadas, fundamentalmente bajo la forma de cristales de hidroxapatita) y el otro orgánico (fundamentalmente colágeno, mucopolisacáridos sulfatados y algunas glucoproteínas). Los estudios del hueso calcificado han demostrado que, por peso seco, el 76-77% de la sustancia ósea es inorgánica y el resto orgánica.

2.- **Células óseas**: osteocitos y osteoblastos, rodeadas por la sustancia intercelular. Así, la parte celular del tejido óseo queda encerrada en lagunas pero con capacidad para nutrirse a través de pequeños conductos denominados canaliculos. Tanto osteocitos como osteoblastos son células nucleadas y su número oscila entre 20.000 y 26.000 por mm³ en el hueso compacto (Frost, 1960). Al tratarse de células nucleadas contienen ADN que perdura dentro de la célula. Esta conservación se explica por la menor concentración de agua y enzimas que hay en este tipo de tejidos y por la protección de la que gozan, en razón de su situación rodeada por una dura barrera mineral, frente a la agresión física y bioquímica de microorganismos.

De entre todos los huesos hay unos que interesan más que otros: aquellos en los que durante la vida del individuo ha habido una mayor actividad celular, son más ricos en ADN. Este es el caso de los huesos en los que se desarrolla la hematopoyesis o generación de células sanguíneas, ricos en médula ósea. En el adulto existen dos tipos de médula ósea: la roja y la amarilla:

La **médula roja** debe su color al gran número de glóbulos rojos que contiene, en diversas etapas de su desarrollo. Así pues, la médula roja es la que produce activamente glóbulos sanguíneos.

La **médula amarilla** debe su color a la gran cantidad de grasa que contiene. Aunque la médula amarilla conserva en potencia la capacidad de producir glóbulos rojos, el hecho de no tener color rojo indica que no trabaja activamente en ello; el hecho de tener color amarillo señala que está dedicada a la tarea menos laboriosa de almacenar grasa.

En el feto, la médula de la mayor parte de los huesos es roja; pero durante el período de crecimiento, en la vida extrauterina, la médula de la mayor parte de huesos se torna amarilla, de manera que en el adulto sólo se halla médula roja, entre otros, en el esternón y las costillas. A diferencia de los glóbulos rojos maduros (eritrocitos), los inmaduros (eritroblastos) son células nucleadas y por ello fuentes de ADN. En todos los demás lugares, la médula es amarilla.

En conclusión, huesos con abundante médula como un fémur, una tibia, un húmero, un esternón o una costilla (Fotografía nº 6) son preferibles a una falange. Sin embargo no hemos de olvidar que la degradación del ADN en la médula ósea es mucho más rápida que en la matriz ósea (Perry y cols., 1988). Por este motivo es recomendable realizar la extracción de ADN de cadáveres

antiguos o muy estropeados a partir del tejido óseo compacto por encontrarse en este lugar más protegido el ADN. En nuestra experiencia, en los cadáveres que aún conservan partes blandas pero éstas se encuentran en avanzado estado de putrefacción se pueden utilizar huesos como esternón o costilla (Fotografía nº 6, izquierda y centro) y en los cadáveres ya práctica o totalmente esqueletizados es recomendable el uso de huesos largos (Fotografía nº 6, derecha) para la identificación genética.



Fotografía nº 6: Cadáveres identificados a partir de ADN presente en restos óseos: izquierda: del esternón: centro: de una costilla: derecha: de un fémur.

1.9.2.- Recogida

Como en el caso anterior, estos tipos de muestras suelen estar relacionadas con la identificación de cadáveres. En la toma de muestras se procurarán manipularlas lo menos posible, llevar siempre guantes y empaquetarlas lo más próximo a la esterilidad. Hay que tener presente que, ya que la contaminación del medio está en la superficie del hueso, en el Laboratorio manejaremos probablemente la parte interior. Por eso es importante no cortar el hueso para su transporte y así mantener protegida la zona interior.

1.10.- DIENTES

1.10.1.- Composición

De la misma manera que los huesos, los dientes ofrecen una estupenda fuente de ADN. Revisando brevemente la histología del diente (Alvarez García, 1995) nos será más fácil entender por qué los dientes son muestras que se utilizan habitualmente en biología forense. La **corona** anatómica del diente está recubierta por un tejido inerte, duro y acelular denominado **esmalte**. Este es el tejido más altamente mineralizado que existe en el organismo: un 96% de contenido inorgánico (hidroxiapatita como en el caso de los huesos) y un 4% de material orgánico y agua.

Las **raíces dentarias** están cubiertas por el **cemento** que es un tejido conectivo duro mineralizado también por cristales de hidroxiapatita (50%) y también formado por colágeno y sustancia fundamental. Existen células asociadas al cemento llamadas cementoblastos y cementocitos. De forma similar a los osteoblastos, los cementoblastos se encargan de formar el propio

cemento y van quedando atrapados en lagunas dentro de su propia matriz, denominándose entonces cementocitos.

Por debajo del esmalte en la corona y del cemento en las raíces, nos encontramos la **dentina**, otro tejido conectivo compuesto por un 70% de material inorgánico (principalmente cristales de hidroxiapatita), un 20% de material orgánico (colágeno tipo I) y un 10% de agua. Dicha composición le confiere una dureza mayor que el hueso y menor que el esmalte. El componente celular está formado por odontoblastos cuya estimulación hace que depositen dentina.

Inmediatamente después nos encontramos con la **cámara o cavidad pulpar**, en contacto con el exterior por el forámen apical situado en la porción radicular. Por este orificio los nervios y los vasos penetran en el diente de forma que permiten que el diente sea un tejido activo. Dentro de la cavidad pulpar se sitúa la **pulpa** que es un tejido conectivo blando rico en células (odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas, macrófagos y algunos linfocitos), vasos y nervios (Fotografía nº 7).

La mayor cantidad de células nucleadas (y por tanto de ADN) en el diente, se encuentra situada precisamente en la zona más interna de los dientes (pulpa), rodeadas por una dura matriz inorgánica que le proporciona una eficaz protección a todos los agentes externos químicos, físicos y biológicos. Es evidente que a pesar de que un cadáver se encuentre sometido a elevadas temperaturas, la pulpa dental nunca alcanzará dichas temperaturas si el tiempo es corto, ya que los dientes se encuentran en una cavidad húmeda, la boca, y además la pulpa está protegida por la matriz inorgánica. Si bien puede haber contaminantes en la superficie del diente, una vez limpia, se ha de proceder a la apertura de la pieza y a la observación del estado del tejido pulpar; si presenta signos aún de vitalidad se puede realizar una extracción de ADN sólo con ese tejido, pero si la cavidad pulpar está ya vacía o el tejido pulpar está en malas condiciones, se puede realizar una trituración a baja temperatura (-173 °C) de las partes duras del diente, pues pueden aportar ADN suficiente como para realizar un análisis en condiciones.

Cuando el individuo a estudiar es un niño de corta edad es posible realizar el análisis genético a partir de los gérmenes dentales que todavía se encuentran inmersos en la tabla ósea. Estas piezas están especialmente protegidas de las posibles contaminaciones por no haber aflorado aún al exterior.

1.10.2.- Recogida

En el caso de los dientes ocurre lo mismo que en los huesos, son preferibles unos dientes que otros. A la hora de elegir qué tipo de dientes se analizarán, es aconsejable siempre el análisis en molares (enviar al menos cuatro) que no estén externamente dañados ni restaurados. En este tipo de piezas dentales es donde más cantidad de pulpa hay y por tanto más ADN para la identificación genética. Si el diente está cariado o partido no existe verdadera protección de la zona interior y esto ocasionará problemas de contaminación en el Laboratorio. En el caso de no disponer de molares no cariados ni restaurados el orden de preferencia será el siguiente: premolares no dañados, caninos no dañados y finalmente incisivos no dañados. Para su envío deberán ser introducidos en papel o cartón limpios.



Fotografía nº 7: Pulpas dentales: izquierda: en buen estado; derecha: en mal estado.

2.- EXTRACCIÓN DE ADN: FUNDAMENTOS DE LA METODOLOGÍA.

2.1.- INTRODUCCIÓN.

Para estudiar la molécula de ADN con fines identificativos, es necesario previamente aislar dicha molécula en su forma nativa, libre de proteínas y otros componentes celulares. Consideramos que la extracción de ADN es un paso fundamental en el análisis genético de muestras forenses, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de los ácidos nucleicos. Durante este proceso existen gran cantidad de sustancias que interfieren provenientes tanto de los propios reactivos de la extracción como de los soportes en los que se encuentran situados las manchas biológicas de interés criminalístico. Es conveniente obtener una buena cantidad de ADN cuando la muestra lo permite y que éste se encuentre lo más limpio y puro posible, libre de contaminantes como proteínas básicas, ARN, carbohidratos, etc., que pueden bloquear la acción del tratamiento al que someteremos a dicho ADN. Por ejemplo, las proteínas básicas pueden inhibir la entrada de ADN en el gel de electroforesis.

Existen numerosos procedimientos de extracción publicados en estudios que manejan muestras del origen más vario: restos óseos antiguos, manchas de sangre, vellosidades coriales, pelo, etc. (Higuchi y cols., 1988; Hagelberg y cols., 1991b; Hochmeister y cols., 1991; Hochmeister y cols., 1995; Lee y cols., 1991; Pfitzinger y cols., 1993). No vamos a entrar aquí a describir cada uno de los procedimientos de extracción de ADN publicados, bien para muestras de rutina bien para muestras especiales, ya que excede de los propósitos de este trabajo. Sin embargo, si merece la pena hacer un breve comentario. Los tipos de extracción para muestras forenses en buen estado más habitualmente utilizadas por los laboratorios son la extracción orgánica (Fenol/Cloroformo y sus variantes) y la no orgánica (con resinas quelantes). El criterio de elección de uno u otro método de extracción no depende sólo del rendimiento en cuanto a cantidad de ADN, sino de su éxito en la reacción de PCR (Corney y cols., 1994).

2.2.- EXTRACCIÓN ORGÁNICA.

La extracción de ácidos nucleicos sobre muestras biológicas recientes o en condiciones óptimas (como por ejemplo la sangre líquida) sigue un protocolo estándar (Sambrook y cols., 1989), que resulta bastante alterado cuando la muestra está muy deteriorada. El procedimiento más usual se conoce como "fenol-cloroformo" y tiene fundamentalmente tres etapas:

a) la **digestión** de las proteínas de la muestra con una enzima proteolítica acompañada de un detergente iónico (como SDS) para solubilizar componentes celulares y cloruro sódico. La enzima que habitualmente se usa es la proteinasa K, pues se inactiva fácilmente por calor para evitar que interfiera en la reacción de amplificación. La digestión es un paso fundamental del proceso, pues es necesaria la lisis de las proteínas para la extracción de ADN. En este punto pueden interferir ciertas sustancias que inhiben esta lisis y no permiten el

acceso a la molécula genética. Otro problema de este paso es que el SDS es un fuerte inhibidor de la enzima Taq polimerasa que se utiliza durante la PCR, por lo que será necesario realizar un paso de purificación para retirarlo (Higuchi, 1989). El lisado resultante, además de ADN contiene muchas otras moléculas que deben ser eliminadas en los tratamientos siguientes.

b) la **fenolización** que no es más que el ulterior lavado con una dilución habitualmente de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (24:24:1). Dicha dilución en su fase fenólica, retiene las proteínas, mientras que en su fase acuosa retiene ácidos nucleicos. Con cada lavado, se retiran proteínas provenientes de la lisis con proteinasa K, ya que estas disminuyen la pureza del ADN.

c) la **precipitación** del ADN con etanol en presencia de sales (por ejemplo Acetato Sódico) y a bajas temperaturas. Mediante centrifugación, el ADN precipitado formará un sedimento en el fondo del tubo; retiraremos todo el sobrenadante y dejaremos secar el sedimento para que se evapore el etanol y finalmente lo resuspenderemos en el volumen que deseemos de agua o del tampón que nos sea más útil con la finalidad de tenerlo en disolución listo para su estudio.

Con este método se logra retirar las proteínas y otros componentes celulares separándolos de los ácidos nucleicos. El ADN así obtenido es de doble hebra.

2.3.- EXTRACCIÓN NO ORGÁNICA.

La extracción **no orgánica** se realiza con agentes quelantes como la resina Chelex®. Dicha resina está formada por copolímeros de estireno-divinilbenceno que contienen iones iminodiacetato que actúan como grupos quelantes. El procedimiento básico consiste en la maceración y posterior hervido de la muestra en una solución de Chelex al 5% para finalmente añadir el sobrenadante directamente a la reacción de PCR.

Los agentes quelantes son capaces de capturar iones libres en una dilución, lo cual es una ventaja pues dichos iones inhiben la actividad de las enzimas que interviene en la síntesis artificial de nuevo ADN mediante la técnica de PCR. Además impiden la rotura o degradación del ADN pues quelan los iones metálicos que catalizan la rotura de la hebra de ADN sometida a elevadas temperaturas en condiciones de baja fuerza iónica (Singer-Sam y Tanguay, 1989; Walsh y cols., 1991) , de manera que después podamos estudiar la molécula en condiciones óptimas. Este tipo de extracción produce ADN de hebra sencilla, por lo que se puede usar para análisis del tipo PCR pero no para otros análisis como RFLPs.

Las ventajas que presenta el último método descrito con respecto a los métodos orgánicos son: la rapidez de la técnica, su simplicidad, no conlleva el uso de reactivos tóxicos y, cuando se trata de un gran número de muestras, su bajo precio también puede ser un factor a tener en cuenta. Además, este tipo de resinas se puede usar como hemos visto durante la extracción de ADN (Walsh y cols., 1991), o como un paso de purificación después de la extracción orgánica (Ellengren, 1991).

2.4.- PURIFICACIÓN

El tratamiento de muestras forenses como pequeñas manchas de sangre, saliva o esperma, resulta algo más complicado en cuanto a la extracción de ADN porque, en última instancia, se obtienen cantidades de dicha molécula muy reducidas. Uno de los principales problemas que nos encontramos en las muestras forenses críticas es la presencia de sustancias distintas a los ácidos nucleicos que se co-extraen durante el procesamiento de las muestras. A menudo es difícil separar la muestra de su soporte sin que algunos componentes de éste último pasen al extracto. Estas sustancias pueden interferir en los análisis posteriores por ejemplo inhibiendo la reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR). Por ello es conveniente realizar una purificación de los extractos de ADN una vez obtenidos.

Con los filtros especiales del tipo Centricon y Microcon (Amicon, USA) se logra esta purificación obteniéndose una dilución final más pura. Además se logra concentrar el ADN extraído, hecho muy interesante en muestras tan críticas como las nuestras. Estos filtros poseen una membrana hidrofílica con muy baja capacidad de adsorción, lo cual permite el paso a través de ella de gran parte del solvente de nuestro extracto y de todos los solutos de bajo peso molecular, reteniendo los solutos más pesados (ADN). Con ello se consigue concentrar la solución de ADN hasta 80 veces, con una pérdida mínima de éste.

2.5.- RECOMENDACIONES

Como en otros tipos de análisis, las muestras deben ser manipuladas cuidadosamente para evitar la contaminación entre ellas o con ADN extraño a ellas. En el laboratorio forense deben de realizarse rutinariamente las siguientes recomendaciones durante el proceso de extracción:

- Procesar las muestras dubitadas (evidencias) separadas en el tiempo de las muestras de referencia o indubitadas para evitar contaminaciones entre ambos tipos de muestras.
- Procesar un tubo con todos los reactivos usados durante la extracción menos el ADN a modo de control negativo para detectar las posibles contaminaciones de los reactivos de extracción.
- No procesar un número elevado de muestras a la vez para evitar equivocaciones durante el proceso.
- Autoclavar y alicuotar los reactivos para evitar que sean abiertos demasiadas veces pues pierden su condición de estériles.

3.- DIFERENTES MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO

La determinación adecuada de la concentración de ADN en una muestra es muy importante a la hora de desarrollar muchos procedimientos en el campo de la Biología Molecular. Centrándonos en el proceso de amplificación del ADN, tanto el exceso como el defecto de la cantidad de ADN en la mezcla de reacción pueden influir hasta el punto de no obtener ningún resultado en el análisis. Por ello, es una cuestión primordial el conocimiento de la cantidad de ADN obtenida durante la extracción con el fin de realizar la dilución apropiada para asegurar el éxito de la amplificación. Además del conocimiento de la cantidad de ADN es también muy importante saber el estado en el cual se encuentra (degradado o no) y si todo el ADN extraído es de origen humano o no, pues ambos parámetros influyen en las reacciones de PCR como veremos más adelante. Para ello, existen una serie de técnicas que combinadas nos pueden ayudar a la resolución de estas preguntas y que a continuación describimos brevemente.

3.1.- FLUORIMETRÍA

La medida de la cantidad de ADN mediante fluorimetría se basa en la capacidad de unión del ADN a ciertos tintes fluorescentes como H 33258 (bis-benzimidizole). A mayor cantidad de ADN, mayor número de moléculas del tinte se unirá y por lo tanto mayor fluorescencia detectaremos. La fluorescencia de dicho tinte depende de la cantidad de pares A-T presentes en la molécula de ADN, por lo que es un método que detecta fundamentalmente ADN de doble hebra (Brunk y cols., 1979; Labarca y Paigen, 1980).

La determinación de la cantidad exacta de ADN se realiza mediante la comparación de la muestra problema con muestras de cantidad de ADN conocida (patrones). Es imprescindible que los patrones estén formado por ADN de las mismas características que la muestra a medir, es decir, deben de tener la misma proporción de pares A-T (la mayoría del ADN de animales y plantas presenta un 60% de pares A-T y un 40% de pares G-C) y la misma conformación. Para medir la fluorescencia se utilizan aparatos específicos llamados fluorímetros que constan de una lámpara de mercurio y un detector para medir fluorescencia relativa a 460 nm.

Este método presenta la ventaja de que la presencia de ARN en la muestra no interfiere en el resultado de la cuantificación de ADN, ya que el ARN no compite con el ADN en la unión con el tinte. Pero presenta la desventaja de que mide cantidad de ADN sin discriminar si se trata de ADN humano o no humano y sin darnos información alguna sobre el estado de conservación del mismo. Además no es compatible con la extracción de ADN con resinas quelantes, ya que no permite la cuantificación de ADN de hebra sencilla.

3.2.- ESPECTROFOTOMETRÍA

Este método se basa en la medida de la cantidad de luz ultravioleta que absorben las bases nitrogenadas. Por ello, está sujeto a interferencias debidas a materiales que habitualmente están presentes en las muestras biológicas. Niveles significantes de ARN, nucleótidos sueltos o proteínas en solución son algunas de estas sustancias que contribuyen a la absorbancia a 260 nm, resultando así una sobre-estimación de la concentración de ADN en la lectura.

En esta cuantificación se utiliza un espectrofotómetro y se han de realizar lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra de tal manera que resultados de 1 OD (unidad de densidad óptica) corresponderían aproximadamente a 50 µgr/mL de ADN de doble hebra, 40 µgr/mL de ADN de hebra simple y ARN, y aproximadamente 20 µgr/mL de oligonucleótidos de hebra sencilla. El radio entre las lecturas a 260 y 280 nm (OD_{260} / OD_{280}) dan una estimación de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de ADN y ARN tienen valores de 1.8 y 2 respectivamente para este radio. Si existe contaminación con proteínas o fenol, el radio OD_{260} / OD_{280} dará valores significativamente más bajos que los anteriores y no se podrá realizar una cuantificación adecuada de la muestra (Sambrook y cols., 1989). Además el método tiene la desventaja de ser muy poco sensible pues no detecta concentraciones de ADN inferiores a los 250 ng/mL por lo que no suele ser un protocolo elegido en el análisis forense.

3.3.- MINIGEL DE AGAROSA

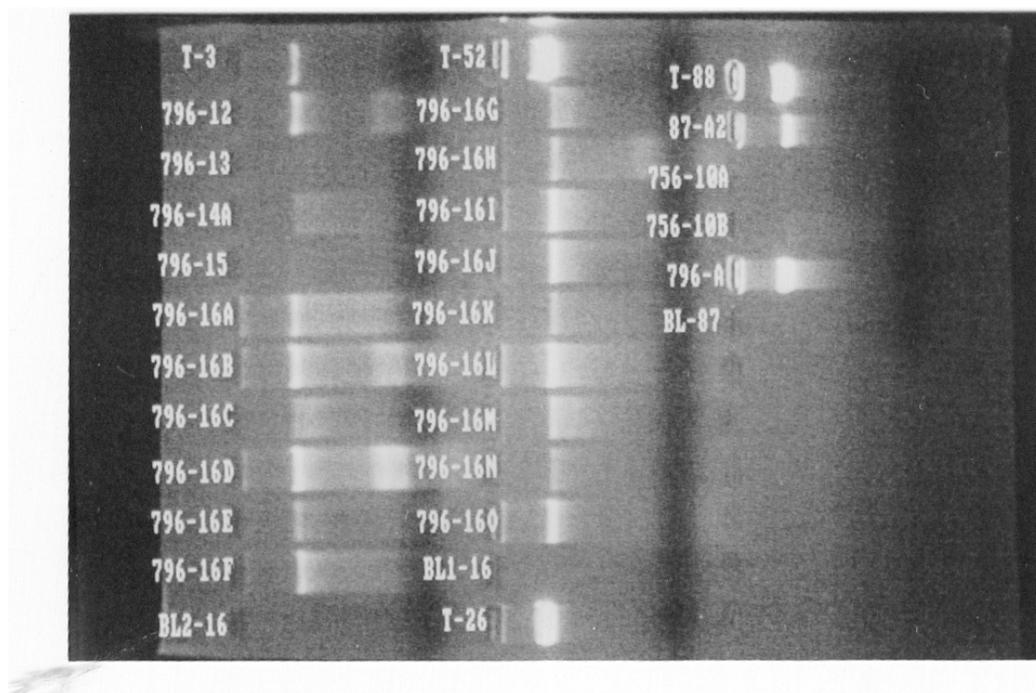
Cuando las muestras pueden estar contaminadas con otras sustancias que absorben la radiación ultravioleta impidiendo una cuantificación con el método anterior, se puede estimar la cantidad de ADN midiendo la fluorescencia inducida por ultravioleta que se produce cuando se intercalan moléculas de Bromuro de Etidio entre el ADN. Como la cantidad de fluorescencia es proporcional a la masa total de ADN, la cantidad de ADN en la muestra puede estimarse comparándola con la fluorescencia emitida por patrones estándar de cantidad de ADN conocida.

El método se suele llevar a cabo sometiendo a las muestras de ADN extraído a un campo eléctrico para que las moléculas se muevan, a través de una matriz de agarosa que contiene bromuro de etidio, en función de su tamaño (la técnica de electroforesis la veremos con detenimiento en el apartado 8 de este trabajo). A la vez que las muestras problema, se procesan muestras de ADN de cantidad conocida (patrones) y por simple comparación de unas con las otras podremos estimar a grosso modo la cantidad de ADN de cada muestra problema. Se trata de un sistema de cuantificación poco sensible pues es realmente difícil observar en el minigel cantidades de ADN menores que 5 ng totales. Pero tiene la gran ventaja de que con este método se puede visualizar el grado de degradación de nuestras muestras problema; si el ADN está en buen estado aparecerá en el gel como una banda nítida que no ha recorrido mucha distancia desde el punto de aplicación de la muestra por tratarse de ADN de alto peso molecular, es decir, de gran tamaño. Si, por el contrario, nuestro ADN está fragmentado, aparecerá en el gel una especie de

“cola de degradación” (*smear*) a lo largo de la calle en la cual hemos aplicado la muestra debido a que existen fragmentos de diferentes tamaños que recorren diferentes distancias desde el punto de aplicación (Fotografía nº 8). En este tipo de muestras degradadas, la cuantificación se hace aún más difícil por no poder realizarse una comparación adecuada con los patrones que son de alto peso molecular y aparecen como bandas nítidas.

Otro problema del método es que no es específico de ADN humano, es decir, detecta cualquier ADN independientemente de su procedencia. Si el ADN extraído es de origen animal, por ejemplo de un perro, lo visualizaremos igual que una muestra de origen humano, si bien existen otros métodos que se pueden realizar antes de la extracción de ADN para saber el origen las muestras problema (por ejemplo, el test de Ouchterlony).

En bastantes ocasiones, las muestras forenses, aunque sean de origen humano, vienen acompañadas de hongos, moho o bacterias si ya han comenzado los procesos de putrefacción. El ADN de las bacterias es de menor tamaño que el ADN humano, por lo que en teoría serían distinguibles ambos ADNs con una electroforesis en agarosa. Sin embargo, en la práctica esto no es así, ya que normalmente el ADN humano de estas muestras contaminadas está degradado y por tanto pueden existir fragmentos de igual tamaño que el ADN contaminante bacteriano, lo cual hace que sean indistinguibles.



Fotografía nº 8: Minigel de agarosa para cuantificación de ADN.

La electroforesis submarina suele utilizarse en combinación con otros métodos de cuantificación como la hibridación con sondas por dos motivos fundamentalmente; por una lado porque la hibridación es un método más

exacto en cuanto a la determinación de cantidad de ADN y además cuantifica ADN humano únicamente (de primates superiores en realidad); por otro lado las muestras que tienen gran cantidad de ADN no pueden cuantificarse directamente con la hibridación con sondas ya que normalmente por encima de los 10 ng este método no tiene sensibilidad; por ello es necesario realizar una dilución antes de cuantificar por medio de la hibridación y para saber qué dilución tenemos que realizar de forma aproximada es imprescindible cuantificar antes con otro método como la electroforesis submarina en geles de agarosa. Usando la combinación de ambos métodos podremos saber la cantidad de ADN humano de nuestras muestras y el estado de degradación en el cual se encuentra.

3.4.- HIBRIDACIÓN CON SONDA (DOT-BLOT Y SLOT-BLOT)

La técnica consiste en desnaturalizar nuestras muestras de ADN (o ARN) y ponerlas en contacto con una sonda específica y marcada para que se produzca hibridación por complementariedad de bases nitrogenadas. Junto con las muestras problema se procesan muestras control que contienen ADN (o ARN) de cantidad conocida. En capítulos posteriores veremos con más detenimiento las distintas técnicas de hibridación, pues en este apartado sólo describiremos el procedimiento más utilizado para cuantificar ADN humano en los laboratorios forenses. Este método se basa en la hibridación de las muestras a cuantificar con una sonda del locus humano alfa satélite D17Z11 (Waye y cols., 1989). El ADN problema se inmoviliza en una membrana de nylon bien en forma de punto (dot-blot) o bien en forma de guión (slot-blot), se pone en contacto con la sonda y ambos ADNs se unirán si son complementarios. La sonda puede estar marcada de varias maneras, entre ellas destacaremos las sondas unidas a la enzima conjugada peroxidasa/estreptavidina (HRP-SA) que permite desarrollar una detección colorimétrica o quimioluminescente (ver Fig. nº 1). En ambos casos la cantidad de ADN se determina por comparación de la intensidad de la señal de la muestra con estándares de ADN humano previamente calibrados. Existen para ello kits comerciales que suministran prácticamente todos reactivos necesarios para desarrollar el proceso (Ej.: QuantiBlot Human DNA Quantitation Kit; Perkin-Elmer, U.S.A.).

La hibridación con sonda presenta algunas ventajas con respecto a los otros métodos descritos:

1.- Sólo cuantifica ADN humano (más concretamente de cualquier primate) pues la sonda es una secuencia específica de dichos primates y cualquier ADN de origen diferente no se unirá a ella, de tal forma que nos evitaremos el problema que se nos planteaba con otros métodos de cuantificación (espectrofotometría o minigeles de agarosa) cuando las muestras presentan un contenido significativo de ADN microbiano o no humano.

2.- Se trata de un procedimiento altamente sensible, pudiendo detectarse cantidades del orden de 20 pgr (con detección quimioluminescente y exposiciones largas).

3.- Con este método se puede cuantificar ADN de cadena sencilla y muestras de ADN no purificadas. De esta forma, los extractos de ADN obtenidos mediante Chelex pueden cuantificarse.

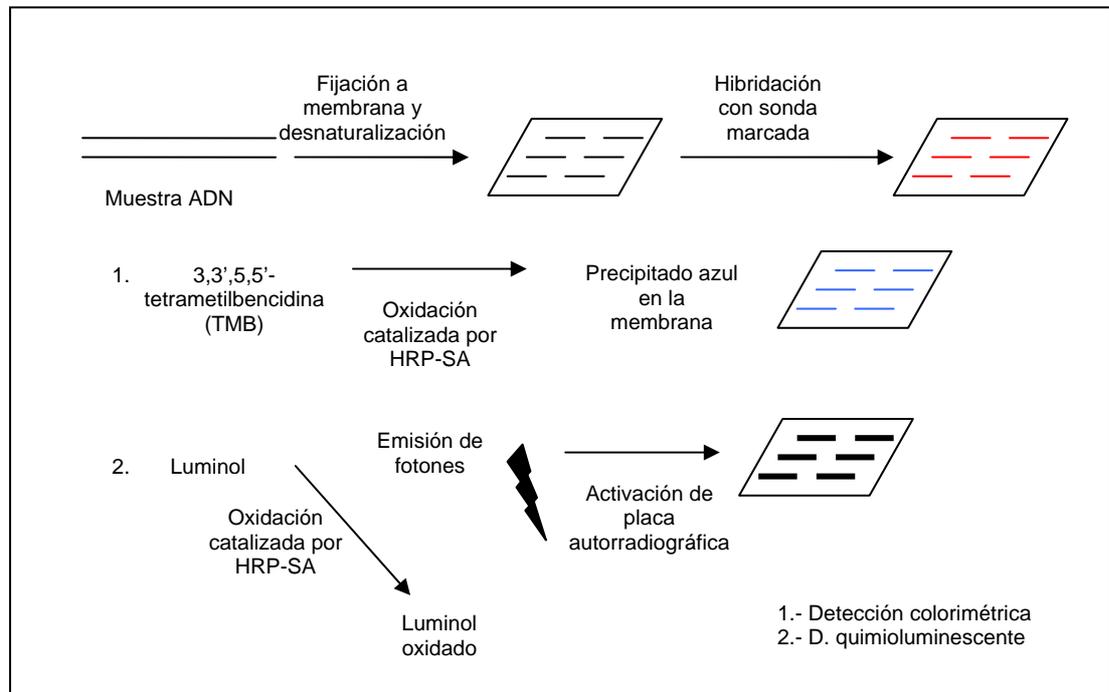


Fig. nº 1.- Cuantificación mediante hibridación con sonda en dot-blot: 1.- Detección colorimétrica: la oxidación del TMB catalizada por la enzima conjugada HRP-SA forma un precipitado azul directamente sobre la membrana de nylon; y 2.- Detección quimioluminescente: la oxidación de un reactivo basado en el luminol y catalizada mediante la enzima HRP-SA, emite fotones capaces de ser detectados por una placa autorradiográfica estándar.

Como hemos visto anteriormente, es usual que esta técnica se utilice en combinación con la cuantificación en minigel de agarosa por dos motivos fundamentalmente:

1.- el “QuantiBlot” detecta rangos de cantidad de ADN de 10 a 0.15 η gr y por ello las muestras que contengan mayor cantidad de ADN deberán ser diluidas con anterioridad; una forma de averiguar a grosso modo la dilución apropiada es realizar un minigel de agarosa antes de utilizar el kit.

2.- el “QuantiBlot” no es informativo en cuanto al estado de degradación del ADN y la cantidad de ADN real puede cuantificarse de manera subestimada cuando la muestra está muy degradada. La señal obtenida con el kit para muestras de ADN degradado en fragmentos de tamaño de 500 a 2000 pares de bases tiene aproximadamente la mitad de intensidad esperada por su concentración (Perkin-Elmer, User’s manual SGM Plus, 1999).

3.5.- CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA.

Cuantificación enzimática: Consiste en el uso de una serie de enzimas para producir una cantidad de ATP que depende de la cantidad de ADN

presente en la muestra seguida de la generación de una señal luminosa (a través de la luciferasa) dependiente de la concentración de ATP. La cadena de reacciones transcurre como sigue (ver Fig. nº 2):

a) Pirofosforilación: es la reacción inversa a la polimerización del ADN y está catalizada por la enzima ADN polimerasa T4. La reacción consiste en la adición de pirofosfato a las bases del extremo 3' terminal de la molécula de ADN para liberar desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs).

b) Transfosforilación: esta reacción está catalizada por la enzima Nucleósido Difosfato Quinasa (NDPK) y en ella, el fosfato terminal de los dNTPs liberados en la anterior reacción es transferido al ADP para formar ATP.

c) Revelado: La cantidad de ATP liberado en el proceso anterior se mide usando una reacción denominada Luciferasa/Luciferina y que es altamente sensible y cuantificativa. Esta reacción produce una señal luminosa que es proporcional en intensidad a la cantidad de ATP presente en la solución.

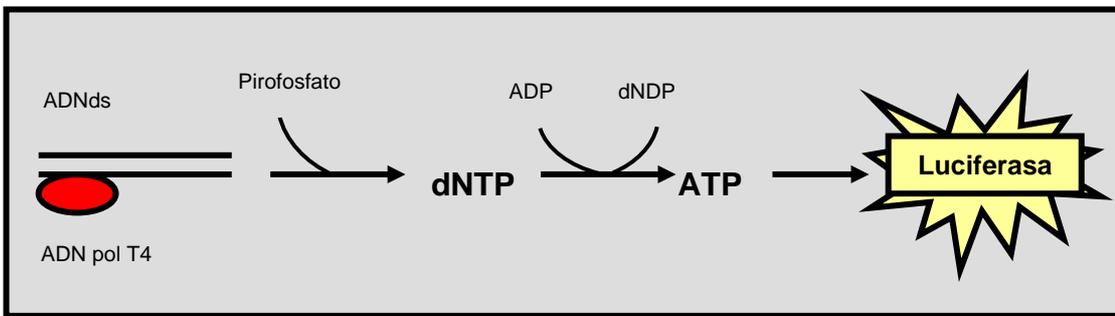


Fig nº 2.- Cuantificación enzimática: pirofosforilación, transfosforilación y detección.

Esta reacción sólo sirve para cuantificar ADN lineal de doble hebra, ya que el ADN circular, el ADN monocatenario o el ARN no son sustratos adecuados. Su sensibilidad es elevada, ya que se detectan cantidades de ADN del orden de picogramos, sin embargo presenta el inconveniente de perder especificidad cuando se cuantifican fragmentos de ADN mayores de 6000 pares de bases. Actualmente existen en el mercado kits comerciales con todos los componentes necesarios para desencadenar las reacciones enzimáticas (DNAQuant™ DNA Quantitation System for Sensitive Detection of dsDNA. Promega Corporation USA).

4.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

4.1.- INTRODUCCIÓN.

En la mayoría de los casos, la estrategia a seguir en el estudio de ADN procedente de restos forenses consiste en extraer el material genético y posteriormente someterlo a una amplificación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN de cualquier origen (procedente de virus, bacterias, plantas, animales o humanos) y se basa en la amplificación exponencial de una secuencia de ADN conocida (Mullis y cols., 1986; Mullis y Faloona, 1987). Se trata de una reacción especialmente valiosa por su alta especificidad, su fácil automatización, y por su capacidad de amplificar (copiar) pequeñísimas cantidades de muestra. Por todo esto ha tenido un gran impacto en campos como la medicina clínica, el diagnóstico de enfermedades genéticas, la biología evolutiva y por supuesto, la biología forense.

Además, esta técnica ha permitido introducir el estudio de los marcadores de ADN, los cuales presentan un contenido polimórfico sin precedentes en relación con los polimorfismos de marcadores proteicos que se solían utilizar en los estudios de identificación. Se pueden estudiar un gran número de marcadores hipervariables incluso en una única reacción.

Las bases teóricas de la PCR no son complicadas. El fragmento de ADN a amplificar está delimitado por dos fragmentos cortos de ADN o cebadores ("primers") que se sintetizan químicamente. Estos cebadores son complementarios con las secuencias de bases que flanquean el fragmento a estudiar. Los cebadores inician en el tubo de ensayo una amplificación que se continúa en ciclos sucesivos. En cada ciclo se duplica el número de copias de la secuencia deseada, respecto al ciclo anterior.

Cada ciclo comienza con la separación de las dos cadenas de ADN molde. Posteriormente los dos cebadores se sitúan en sus respectivas secuencias diana complementarias, una de cada cadena. Una enzima, la ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) que no se altera a elevadas temperaturas, agrega entonces bases en los extremos de los cebadores, alargando las dobles hélices que el cebador había iniciado (Saiki y cols., 1985). Como cada cadena produce una nueva hélice doble, se duplica en cada ciclo la secuencia de ADN deseada. El primer ciclo de síntesis produce nuevas cadenas hijas de longitud indeterminada, las cuales, a su vez, son capaces de hibridar con los "primers". En el segundo ciclo de síntesis, estas cadenas hijas sirven como nuevos moldes y, en este caso, los fragmentos resultantes ya no tendrán una longitud indefinida, sino que su tamaño estará delimitado por los "primers" de la reacción. Las nuevas cadenas hijas formadas servirán de molde para sucesivos ciclos de síntesis.

La evolución de la técnica ha permitido hacer la reacción cada vez más sencilla y eficaz. Los primeros procedimientos de PCR se realizaban manualmente con calor húmedo en baños con la temperatura prefijada; hoy en día se realiza de forma automática en un termociclador. Se trata de un aparato compacto que consta de un bloque térmico cuya temperatura va variando según el plan de datos introducido por el usuario y en cuyo interior se depositan las muestras. El aparato está provisto de un termostato que produce oscilaciones

constantes y cíclicas de la temperatura rápidamente. Esta automatización ha permitido mejorar mucho el rendimiento y la reproducibilidad de los experimentos. Cada ciclo transcurre con los siguientes cambios (ver Fig. nº 3 y Fig. nº 4):

1º.- **Fase de desnaturalización** a 90°C-95°C: se produce la separación (desnaturalización) de las hebras de nuestro ADN molde también llamado "*template*". La temperatura a la cual se alcanza dicha desnaturalización depende de la composición de bases de la doble hélice, siendo necesarias temperaturas más elevadas cuanto mayor número de pares de bases del tipo G-C contenga la molécula (Ruano y cols., 1992). Esto se debe al hecho de que la Guanina y la Citosina se unen mediante tres puentes de hidrógeno mientras que la Adenina y la Timina lo hacen mediante dos por lo que resulta lógico pensar que costará más separar pares G-C que pares A-T y por ello serán necesarias mayores temperaturas en el primer caso.

2º.- **Fase de apareamiento o hibridación** ("*annealing*") de 40 a 60°C: se colocan los cebadores o "primers" en las zonas complementarias de la hebra molde. Sin este apareamiento inicial de los cebadores no puede comenzar a trabajar la polimerasa. La temperatura a la que transcurre el "*annealing*" es específica de la secuencia y longitud del cebador y se determina experimentalmente, aunque existen algunos métodos que pueden ayudarnos a la elección de la temperatura de annealing antes de realizar el experimento. La elección de la temperatura en este paso es un parámetro crítico pues si es demasiado alta no se producirá anillamiento y no habrá amplificación y si es demasiado baja se incrementará el anillamiento inespecífico y aparecerán productos no deseados (si el extremo 3' de un primer se anilla en cualquier lugar del molde, aunque el resto del "*primer*" no se anille específicamente, el oligo será elongado).

3º.- **Fase de elongación** o extensión a 70-75°C: con los cebadores apareados, la polimerasa comienza a sintetizar la hebra complementaria mediante la adición al extremo 3'OH de desoxinucleótidos libres disponibles en la mezcla de reacción (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), de tal forma que el crecimiento de la nueva hebra se realiza en sentido 5' → 3'. El orden o secuencia de los nucleótidos de la hebra "hija" viene determinada por el orden de la hebra "madre", basándose en las reglas de complementariedad (Adeninas siempre apareadas con Timinas y Citosinas con Guaninas). La temperatura más comúnmente usada son 72°C pues se encuentra cerca de la temperatura óptima de actuación de la Taq polimerasa (75°C), pero la elongación suele comenzar ya durante el anillamiento, pues a 55°C la Taq es parcialmente activa.

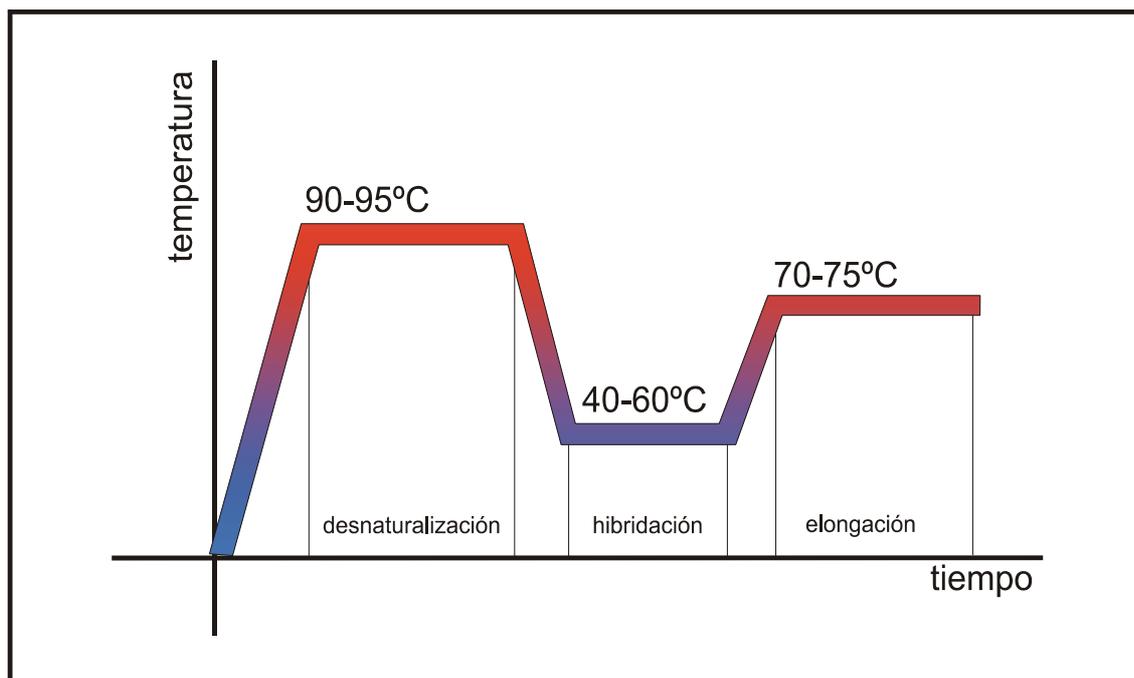


Figura nº 3: Gráfico que representa las variaciones de temperatura de cada ciclo PCR.

Cada una de estas fases requiere un tiempo mínimo para ser efectiva. Este tiempo mínimo se determina de manera empírica y es conveniente no alargarlo para evitar el riesgo de envejecimiento de la enzima. Suele oscilar entre 30 segundos y varios minutos según la fase en la cual nos encontremos.

1º.- **Fase de desnaturalización:** un tiempo de 30-60 segundos a 94°C suele ser suficiente para obtener buenos productos de PCR. Si prolongamos el tiempo de desnaturalización, aumentaremos el tiempo al cual la enzima está sometida a elevadas temperaturas y por ello se incrementará el porcentaje de moléculas de Taq convencional que pierden su actividad. De cualquier manera, el tiempo de desnaturalización debe incrementarse si el ADN molde tiene un contenido elevado de pares GC.

2º.- **Fase de apareamiento:** para la mayoría de las reacciones PCR es suficiente un tiempo de 30-60 segundos en la fase de anillamiento.

3º.- **Fase de elongación:** El tiempo de incubación para la elongación varía según la longitud del fragmento que queramos amplificar pues la actividad de la Taq polimerasa a temperatura óptima suele ser de 2000 nucleótidos incorporados por minuto; el tiempo de extensión en la reacción, por tanto, se puede calcular de acuerdo con la actividad de la enzima (desde unos 20 segundos para fragmentos de menos de 500 pares de bases, 40 segundos para unos 1200 pares de bases, hasta varios minutos para fragmentos de varias Kilobases).

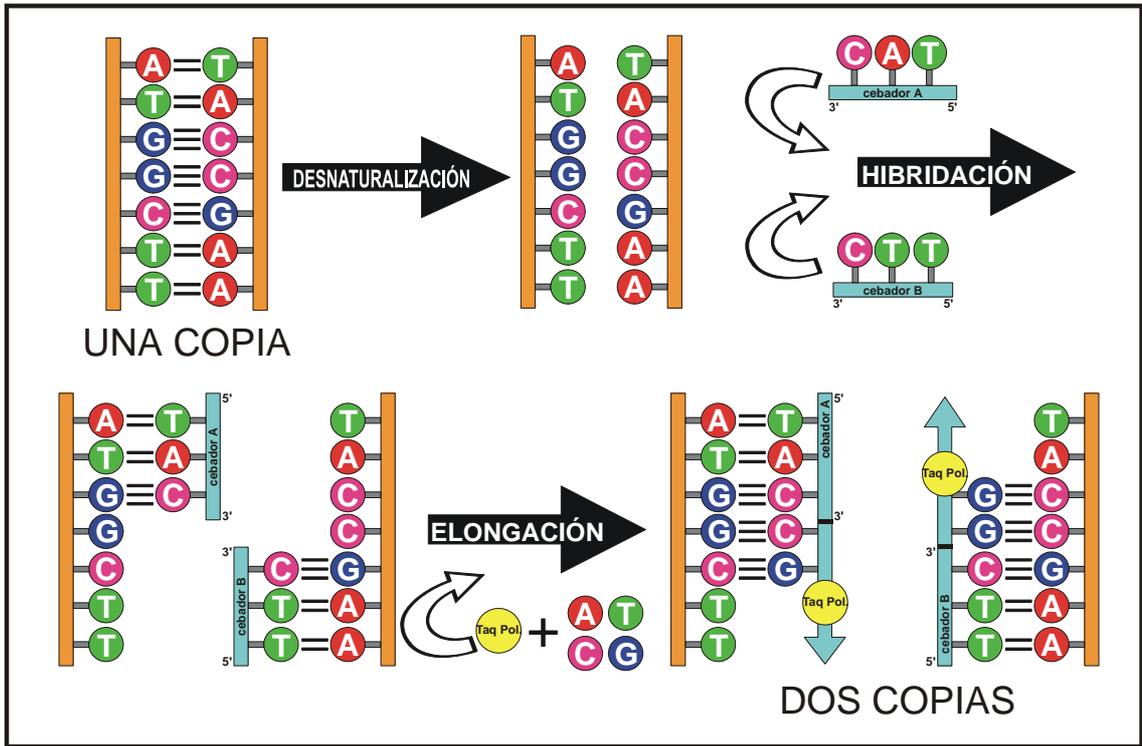


Figura nº 4: Desarrollo de un ciclo de PCR.

Lo mismo ocurre con el número de ciclos de PCR, se determina de manera empírica y oscila entre 20 y 35. Si interesa obtener una mayor cantidad de producto amplificado se puede aumentar este parámetro, pero se ha de tener en cuenta que dicho aumento irá en detrimento de la calidad, es decir, aparecerán más errores en las nuevas moléculas debido al empobrecimiento de la reacción.

Antes del comienzo de los ciclos es conveniente realizar un paso único de desnaturalización largo (5 minutos a 93-96°C) para asegurar que el ADN molde se desnaturaliza totalmente aunque sea muy largo. Y al final de los ciclos se suele añadir un paso único de elongación largo (5-15 minutos a 72°C) para que se termine la formación de los productos PCR generados durante la reacción. Si bien, algunos autores no recomiendan esta estrategia, pues describen, basándose en su experiencia para un gran número de loci, que estos dos pasos adicionales no modifican los resultados de la reacción PCR.

Por tanto, para realizar este tipo de reacciones se necesita:

- un ADN de partida que es el que vamos a copiar (ADN molde) procedente de las muestras a analizar. En nuestro caso se trata de ADN humano en condiciones algo especiales como describiremos en capítulos posteriores.
- los cebadores cuya función es señalar la zona concreta a multiplicar y aportar un extremo 3'-OH libre para que la polimerasa pueda empezar a actuar. En general se recomienda que el tamaño de los oligos se encuentre entre 20 y 30 nucleótidos. Una mayor longitud ayudará a obtener una mayor especificidad. Su concentración recomendada oscila entre 0,1 y 0,5 µM. Una concentración demasiado elevada puede producir inespecificidad en el alineamiento mientras que si hay escasez puede

producirse el agotamiento antes del fin de la reacción, perdiendo así rendimiento.

- nucleótidos sueltos (dNTPs) que formarán las nuevas cadenas de ADN y que siempre se añadirán a la reacción manteniendo la misma concentración final de cada uno de ellos para evitar errores en el proceso de copia del ADN molde. La cantidad de dNTPs a utilizar en la reacción dependerá de la longitud del fragmento a amplificar y se suelen añadir en exceso pero, como veremos, los dNTPs reducen el Cl_2Mg libre y por ello no debe incrementarse demasiado su concentración final. La concentración final de cada dNTP para el buen funcionamiento de la Taq polimerasa suele ser de 200 μM , a una concentración de Cl_2Mg de 1.5 mM. En un volumen total de reacción de 25 μL , teóricamente estos nucleótidos permiten la síntesis de aproximadamente 6-6.5 μg de ADN, cantidad suficiente para reacciones de un solo locus (“*singleplex*”) o de varios loci a la vez (“*multiplex*”).
- una enzima ADN polimerasa, en este caso termoestable, que lleve a cabo todo el proceso. En los inicios de los procesos de PCR se utilizaba como enzima el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de la bacteria *E. Coli*. Esto presentaba el inconveniente de que dicha enzima se inactivaba con el calor durante la desnaturalización, lo cual obligaba a añadir más enzima después de cada ciclo. La sustitución de ésta enzima por la DNA polimerasa aislada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (de ahí el nombre de *Taq* polimerasa) supuso un enorme avance pues se evita así el engorroso proceso de tener que estar pendiente continuamente del proceso PCR (Saiki y cols., 1988) ya que la enzima es estable a elevadas temperaturas. Además, el uso de esta nueva enzima ha permitido incrementar las temperaturas de alineamiento de los cebadores con el ADN, lo cual mejora de forma significativa la astringencia de la reacción y, en definitiva, la especificidad de los productos. La enzima consta de una sola cadena polipeptídica de 95 kDa, es muy activa en su función polimerasa 5' \rightarrow 3' y carece de actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5'. Existe actualmente una modificación de esta enzima, la Ampli-*Taq* Gold DNA polimerasa, que se comercializa de forma inactiva. Un paso inicial en la PCR de 9-12 minutos a 94-95°C (“*Hot Start PCR*”) produce su activación disminuyendo así la formación de productos inespecíficos. La cantidad de enzima recomendada habitualmente es de 1-2 Unidades para un volumen de reacción de 25 μL .
- El Mg^{2+} es un factor indispensable en las reacciones PCR porque actúa como cofactor de la enzima Taq polimerasa. Se suele añadir a la mezcla de reacción en forma de Cl_2Mg y forma complejos solubles con los dNTPs para producir el sustrato real que la enzima reconoce. La concentración óptima varía entre 0,5 mM hasta 5 mM y la concentración real libre en la reacción depende de la concentración de compuestos capaces de unirse al Cl_2Mg , como los dNTPs, el pirofosfato libre y el EDTA.
- Tubos especiales capaces de transmitir los cambios de temperatura a la muestra con la misma rapidez y cuyas paredes son más finas de lo normal. Se ha de tener en cuenta además que el calentamiento de la muestra a altas temperaturas induce a su evaporación, por lo que es conveniente añadir una capa de aceite mineral en la parte superior,

aunque actualmente existen termocicladores que ya incorporan una cubierta caliente en el bloque que impide la acumulación de la solución en la parte superior del tubo.

El resultado es la amplificación de un producto génico un número determinado de veces. Como los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como molde en el siguiente, el número de copias de ADN se dobla en cada ciclo. Así pues, después de 20 ciclos, la PCR rinde 2^{20} copias (ver Fig. nº 5). Para amplificaciones que no presentan “a priori” problemas se recomiendan 28-30 ciclos, pero este número se puede aumentar si el rendimiento de la PCR es bajo debido por ejemplo a la escasa cantidad de ADN molde.

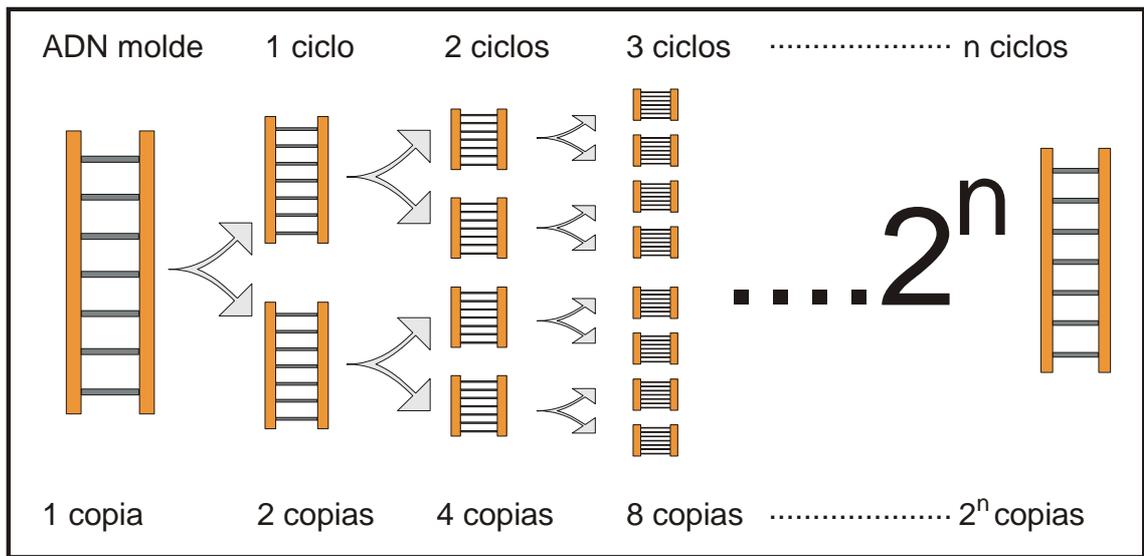


Figura nº 5: Desarrollo de una reacción PCR de n ciclos.

Resumiendo, la técnica descrita es extraordinariamente sensible, es posible teóricamente generar miles de millones de copias a partir de una molécula de ADN. Una o muy pocas moléculas de ADN intactas que sobrevivan en un tejido pueden amplificarse por PCR.

La exquisita sensibilidad de la PCR puede ser a veces un inconveniente. Cualquier fragmento de ADN exógeno a la muestra que caiga en el experimento será amplificado si lleva secuencias que puedan ser reconocidas por los cebadores, con lo que se pueden obtener falsos positivos (Kwok y Higuchi, 1989). Existen varias fuentes potenciales de contaminación:

- a) Contaminación con ADN humano procedente del ambiente de trabajo.
- b) Contaminación mediante ADN de origen bacteriano o fúngico procedente incluso de la propia muestra a analizar, que si bien no se espera que anille con los cebadores por tratarse de ADN no humano, sí puede interferir en la reacción disminuyendo el rendimiento de la misma.
- c) Contaminación cruzada de unas muestras a otras durante la preparación de las mismas. Este hecho es habitual cuando se procesa

un gran número de muestras a la vez por la gran atención que se requiere durante un tiempo más o menos largo.

La fuente de contaminación más peligrosa es la que se conoce como "*carry-over*" de productos de amplificación y ocurre cuando un ADN ya amplificado contamina a una muestra que todavía no ha sido amplificada. El producto PCR contaminante sirve como molde ideal para amplificaciones posteriores y obtendremos así resultados erróneos. Este tipo de contaminación puede suceder bien de forma directa, o bien indirecta como con aerosoles de una punta de pipeta sin filtro por ejemplo.

Todos estos problemas han obligado a establecer procedimientos que aseguren una buena calidad en el análisis de las muestras entre los que podemos destacar:

- Separación física en el laboratorio del área de extracción del ADN y preparación de la reacción PCR y el área de manipulación del producto amplificado (ver Fig. nº 6).
- Uso de guantes desechables cambiándolos frecuentemente.
- Uso de reactivos de buena calidad libres de nucleasas y autoclavados, siendo recomendable que cada operario mantenga su propio material de PCR de forma que resulte más fácil controlar las contaminaciones.
- Cerrar siempre los tubos que contiene la muestra, los reactivos y las cajas que contienen las puntas de pipeta mientras no se estén usando.
- Uso de puntas con filtro desechables estériles utilizando una punta para cada muestra.
- Centrifugar los tubos brevemente antes de abrirlos para evitar la dispersión de pequeñas gotitas de la muestra en el área de trabajo.
- No procesar un elevado número de muestras a la vez ni durante la extracción ni durante la amplificación.
- Incluir muestras control en cada amplificación de forma que podamos detectar la presencia de cualquier contaminante.

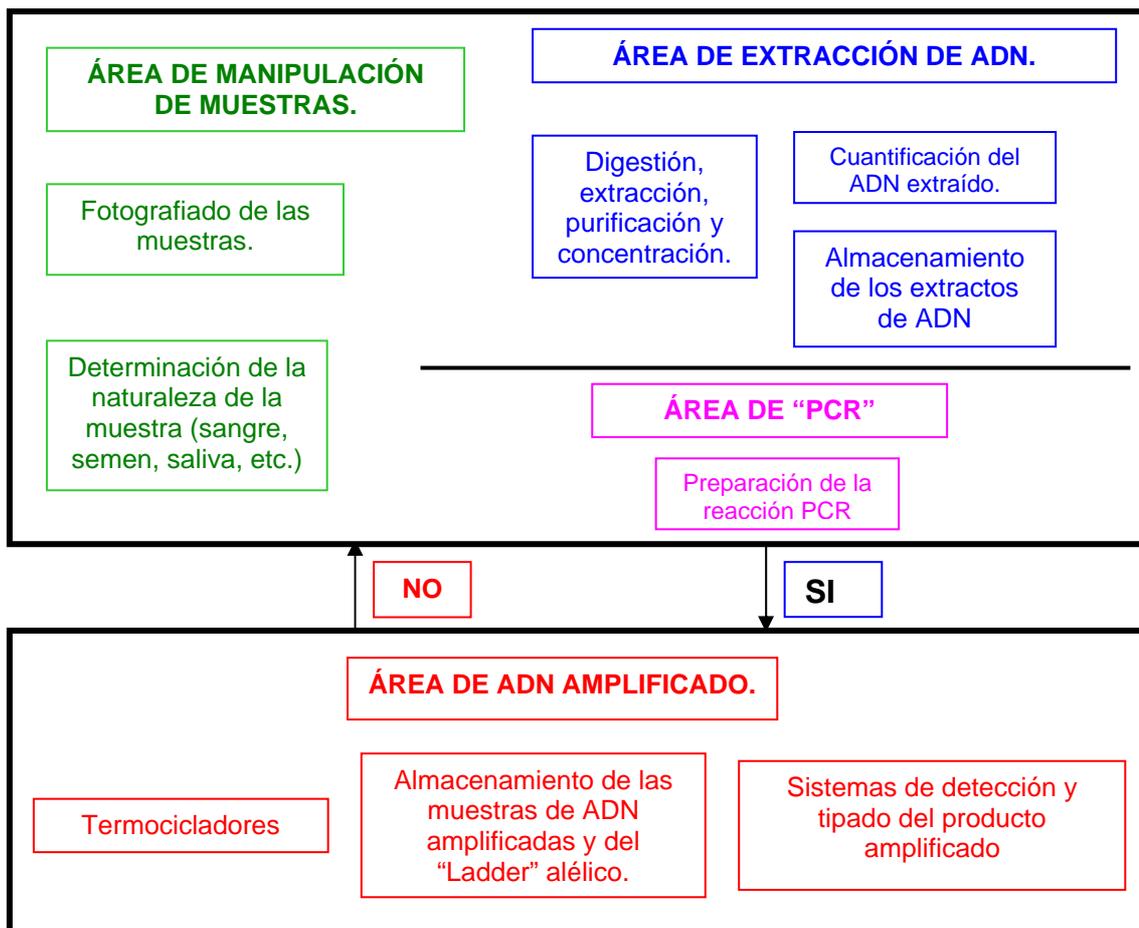


Figura nº 6: Separación física de áreas de trabajo en el laboratorio.

4.2.- PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

A pesar de la gran popularidad de la reacción de PCR debida principalmente a su elevada probabilidad de éxito y a su aparente simplicidad, esta reacción es relativamente complicada. Constantemente van cambiando las interacciones cinéticas entre sus componentes, lo cual determina la calidad de los productos. Aunque los resultados serán satisfactorios en muchos casos, existe un número de parámetros que pueden modificarse si se necesita mejorar la eficacia de la reacción. Los parámetros más influyentes en el éxito de la reacción son:

1.- CALIDAD Y CANTIDAD DEL ADN MOLDE: Saiki y colaboradores en 1988 demostraron experimentalmente el efecto de la concentración de ADN molde usando ADN genómico normal y ADN genómico con una delección en homocigosis de la β -Globina. Amplificaron ambos tipos de ADN con cebadores de la β -Globina. Usando ADN genómico normal, la reacción generaba un fragmento único de β -Globina; como se esperaba, usando ADN genómico mutante no se sintetizaba dicho fragmento, pero se producían varios fragmentos inespecíficos. Podemos observar con este experimento que en ausencia de ADN molde correcto, los primers de la β -Globina amplifican secuencias erróneas. Por tanto, la relación molde / cebadores tiene mucha influencia en la especificidad de la reacción. Si hay pocas moléculas molde, los oligos pueden no ser capaces de encontrar sus secuencias complementarias; si hay muchas se reduce el porcentaje de errores que la Taq polimerasa puede cometer al incorporar nucleótidos, pero con demasiadas moléculas pueden incrementarse los contaminantes y el alineamiento inespecífico reduciéndose la eficacia de la reacción. Con muestras forenses puede ocurrir que el ADN esté degradado o presente lesiones en su secuencia. Como veremos, se pueden modificar varios parámetros PCR para optimizar la especificidad de la amplificación en los casos en los cuales existen muy pocas copias íntegras de ADN molde. El uso de pequeños volúmenes en la reacción de PCR puede ser muy beneficioso cuando trabajamos con pequeñas cantidades de ADN molde ya que a cantidades constantes de molde, la cantidad de producto PCR obtenido por μL de reacción es mayor cuando los volúmenes de reacción son menores. Este hecho puede hacer que se visualicen productos de amplificación que son invisibles en volúmenes de reacción grandes.

2.- ELECCIÓN DE LOS CEBADORES: Como hemos apuntado anteriormente existen algunos parámetros a tener en cuenta a la hora de elegir los cebadores, entre los cuales podemos destacar:

- No presentar secuencias complementarias dentro del mismo cebador para evitar la formación de estructuras secundarias entre una o dos moléculas (ver Fig. nº 7).
- No presentar secuencias complementarias entre el par de cebadores para evitar que hibriden uno con el otro (formación de "*primer-dimer*") lo cual reduciría la eficacia de la reacción de PCR (ver Fig. nº 8).

- Elegir cebadores que presenten similares temperaturas de fusión (“melting”), para lo cual deben tener un contenido equilibrado de pares A/T y pares G/C. Dicha temperatura se define como la temperatura a la cual la mitad de las moléculas del cebador están unidas al ADN molde y depende: (i) de la secuencia de bases del propio cebador (un primer rico en pares G-C tendrá una temperatura de “melting” (Tm) mayor que uno rico en pares A-T), (ii) de la concentración (las concentraciones de oligos elevadas favorecen la hibridación y requieren una temperatura de “melting” mayor) y (iii) de la fuerza iónica de la solución en la cual se encuentran (a mayor fuerza iónica, mayor temperatura de melting).

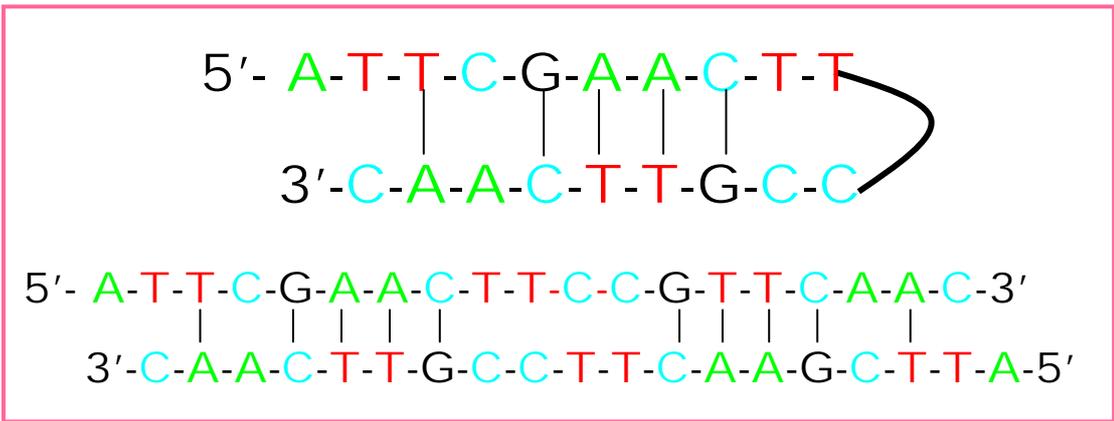


Figura nº 7: Secuencias complementarias dentro de un mismo cebador. Esto puede ocasionar la formación de estructuras secundarias en una única molécula de cebador o entre dos moléculas del mismo cebador.

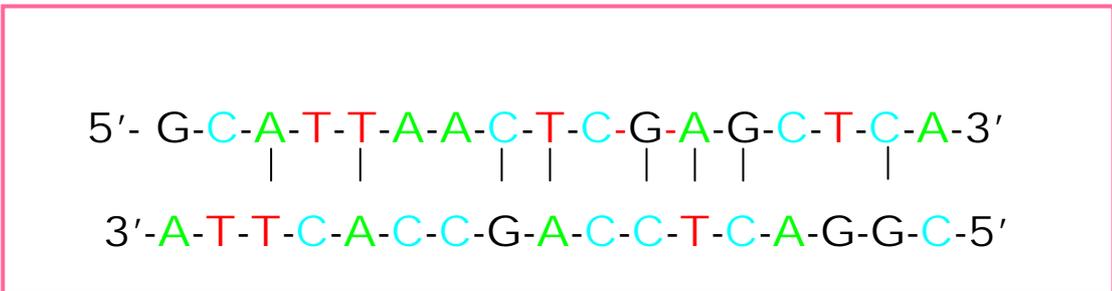
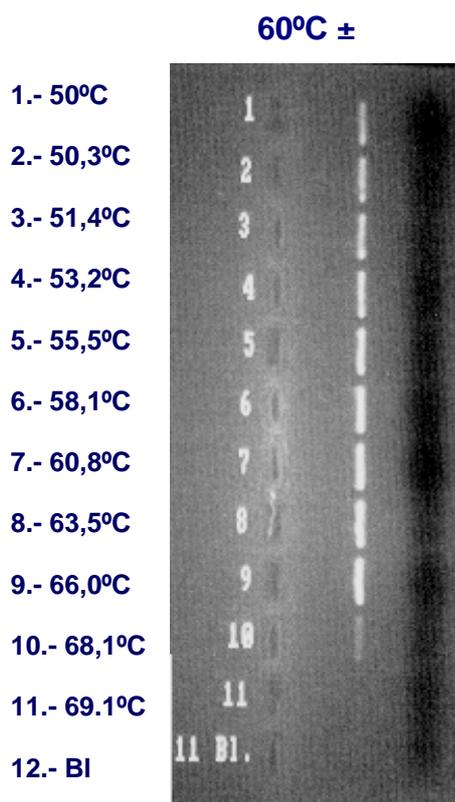


Figura nº 8.- Secuencias complementarias entre dos cebadores diferentes. Esto puede ocasionar la formación de estructuras secundarias entre los distintos cebadores formando los típicos “primer-dimers”.

Para calcular esta temperatura existen diferentes métodos: para oligos cortos (20 bases) se suele utilizar la clásica fórmula de Wallace que consiste en $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ y para oligos mayores se suele usar el método “nearest-neighbor” que combina la termodinámica de la reacción con los datos experimentales, resultando así una estimación muy real de la Tm (Breslauer y cols., 1986; Freier y cols., 1986; Schildkraut y cols., 1965). Pero normalmente, la temperatura óptima es mayor que la temperatura de melting calculada. Es conveniente por ello, realizar una reacción de PCR en gradiente para

asegurarnos de qué temperatura de anillamiento es la adecuada. Dicha PCR consiste en realizar varias reacciones a diferentes temperaturas de hibridación y observar cual resulta ser la más eficaz. Actualmente existen en el mercado termocicladores (Mastercycler®, Eppendorf) que permiten analizar las mejores condiciones de temperatura en un solo bloque metálico, en un único experimento (Ver Fotografía nº 9).

- Purificar los cebadores sintetizados. Las casas comerciales que sirven los cebadores disponen de múltiples sistemas de purificación (High Performance Liquid Chromatography o HPLC, Polyacrilamide Gel Electrophoresis o PAGE, etc.). Si el cebador es de pequeño tamaño (menos de 25 pb.) no suele ser necesaria la purificación para su uso en la aplicación PCR tradicional, pero si es de mayor tamaño es recomendable purificarlo. Esto se debe a que durante el proceso de síntesis del oligo, un porcentaje de las cadenas nuevas no llegan a extenderse totalmente, formándose así secuencias truncadas de primers incompletos; cuanto más largo sea el oligo a sintetizar, mayor cantidad de secuencias incompletas se formarán (por ejemplo, para primers de 15 bases la pureza final será del 85% aproximadamente y para primers de 35 bases será del 60%).



Fotografía nº 9: PCR en gradiente realizada en un termociclador Mastercycler, con una T^a de anillamiento central de 60°C y un rango de variación de 10°C. A 68,1°C la PCR empieza a perder eficacia; entre 61 y 66°C se obtienen resultados óptimos.

A pesar de tomar todas estas precauciones en el diseño de los cebadores, finalmente, la elección de los mismos para asegurar su eficacia y especificidad se realiza desgraciadamente de manera empírica. En los análisis de muestras no críticas los consejos que aparecen en la bibliografía, como hemos visto, se refieren a la distribución de bases al azar dentro del cebador, a la no elección de primers con polipurinas o polipirimidinas, a la coincidencia de la temperatura de melting de ambos cebadores, etc. Incluso hoy en día existen programas disponibles en el entorno Internet que nos ayudan a la elección de primers midiendo los parámetros anteriormente reseñados (<http://williamstone.com/primers/calculator/calculator>; http://www.genset.fr/Tech_Info; <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>). Pero para el tipo de muestras que en este trabajo nos ocupa es fundamental tener en cuenta dos aspectos:

A) Por un lado que la base 3' del cebador no sea complementaria a una timina o una citosina del ADN molde (ver Fig. nº 9), ya que probablemente dicho ADN molde se encuentre parcialmente despurinado (Pääbo S, 1989).

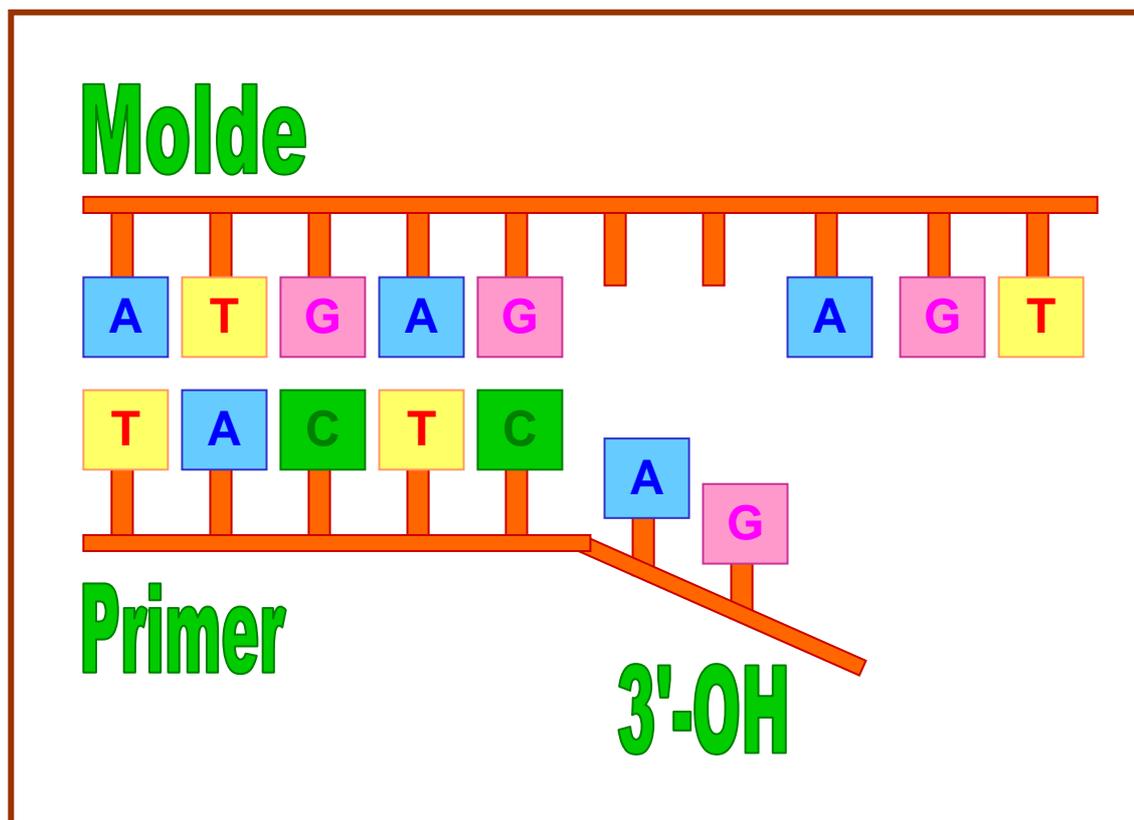


Figura nº 9: Despurinización. La elección de cebadores que contengan en su extremo 3'-OH bases complementarias a purinas puede ser contraproducente pues en ADNs que se encuentren despurinizados no se producirá la unión del primer con el ADN molde durante la PCR.

B) Por otro lado, es frecuente la formación de “*primer-dimer*” (dímeros de cebadores). Se trata de artefactos de la amplificación que se observan en los productos PCR, especialmente cuando se desarrollan muchos ciclos de amplificación en una muestra que contiene unas pocas copias iniciales de ADN molde. Son fragmentos de doble hebra cuya longitud aproximada es la suma de las longitudes de los dos cebadores juntos y suelen aparecer cuando un primer es elongado por la polimerasa sobre el otro primer. El resultado es un molde para la PCR muy eficaz, que si se forma en los ciclos iniciales, fácilmente será el producto predominante de la reacción. Los pares de cebadores con extremos 3' complementarios, lógicamente, están predispuestos a la formación de estos dímeros. Para evitar la formación de “*primer-dimer*” se pueden reducir las concentraciones de cebadores y de enzima.

3.- SOLUCIÓN TAMPÓN DE LA REACCIÓN: La principal precaución consiste en no usar una solución con exceso de sales, pues éstas pueden inhibir la Taq polimerasa. También se ha demostrado que la reducción o eliminación de gelatina y ClK en los tampones de amplificación puede ser beneficiosa (Innis y cols., 1988). No sólo hemos de tener en cuenta el tampón de reacción, sino también el medio en el cual el ADN extraído está resuspendido. Muchas veces se utilizan tampones de extracción de ADN con elevada concentración iónica en muestras forenses. Como veremos más adelante este exceso de sales inhibe a la Taq polimerasa.

4.- CONCENTRACIÓN DE Cl_2Mg : Las variaciones en la concentración de cloruro magnésico tienen un profundo efecto en la especificidad y el rendimiento de la amplificación. Generalmente, el exceso de Mg^{2+} dará como resultado una acumulación de productos de amplificación no específicos y el defecto reducirá el rendimiento de la PCR. Actualmente, la Taq polimerasa suele presentarse de forma comercial con el tampón ya preparado y con la concentración de Cl_2Mg que se ha de utilizar para que la reacción sea óptima. Pero cabe destacar que el Mg^{2+} influye en la unión del cebador con el ADN molde pues estabiliza dicha interacción y por ello puede incrementar el apareamiento no específico y producir productos PCR no deseados.

5.- CONCENTRACIÓN DE dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato): las elevadas concentraciones de dNTPs tienden a promover incorporaciones erróneas por parte de la polimerasa (Petruska y cols., 1988) y posiblemente inhiben a la Taq. Parece ser que son capaces de unirse al Mg^{2+} determinando la cantidad de Mg^{2+} libre presente en la solución; por ello, si se cambia significativamente la concentración de dNTPs, debe hacerse un cambio en el Cl_2Mg necesario en la reacción.

6.- Taq POLIMERASA: Las elevadas cantidades de enzima incrementan la producción de productos PCR no específicos y reducen el rendimiento de los fragmentos diana deseados posiblemente debido a que al aumentar la enzima aumenta la concentración de glicerol que lleva la solución donde la enzima se encuentra disuelta. Esta enzima tiene un elevado porcentaje de error pues no tiene actividad exonucleasa 3'→5' reparadora, pero es una enzima muy cómoda por requerir menos exigencias para su funcionamiento que otras. Si se necesita

una gran fidelidad de copia en las nuevas hebras pueden usarse otros tipos de polimerasas (*Tli* o *Pfu*) en combinación con la *Taq*.

7.- VARIACIONES EN LA TEMPERATURA DE LA REACCIÓN: El calentamiento insuficiente durante el paso de desnaturalización es un fallo muy común en la reacción de PCR. Es muy importante que la reacción alcance una temperatura adecuada para producir la separación de las dos hebras de ADN completamente. La temperatura del “annealing” o apareamiento depende de la longitud de los cebadores y de su contenido en bases GC. En algunos casos es posible realizar el apareamiento y la extensión de los cebadores a la misma temperatura (Kim y cols., 1988). La reducción del tiempo durante estos dos estadios reduce la oportunidad de incorporaciones erróneas.

8.- TIPOS DE TUBOS UTILIZADOS PARA DESARROLLAR LA REACCIÓN: los termocicladores de última generación han incorporado el desarrollo de la reacción en tubos de 0.2 ml de capacidad y pared fina o placas de 96 pocillos. Para este tipo de viales, las diferencias de resultados de vial a vial son mínimas debido a que el contacto entre el bloque metálico que proporciona la T^a adecuada y el tubo es muy bueno y además está ayudado por la presión que ejerce la tapa caliente que portan estas nuevas máquinas. En aparatos más antiguos, los tubos utilizados eran de 0.5 o 1.5 ml, con muchas diferencias de grosor y sin tapa que ejerciera presión, con lo que el contacto entre el bloque y el tubo no era siempre perfecto y por ello a veces se obtenía menos o ninguna amplificación.

9.- TERMOCICLADOR UTILIZADO: en cuanto a los termocicladores donde se desarrollan las reacciones, conviene reseñar que actualmente existe un gran número de tipos de aparatos, cada uno con unas características concretas. Incluso el mismo programa PCR puede desarrollarse de manera diferente en diferentes termocicladores pues las temperaturas y los tiempos pueden diferir dependiendo de cómo se haya construido la máquina. De cualquier forma, con un ajuste de los ciclos se pueden obtener resultados similares en la mayoría de los termocicladores. Actualmente, algunos fabricantes incluso ofrecen aparatos que controlan la temperatura mediante pequeños baños de agua en los cuales se colocan los pequeños viales durante la reacción. En tales casos, debido al buen intercambio de temperatura entre el plástico de la pared del tubo y el agua, las variaciones en los resultados de la PCR son realmente pequeñas.

5.- DEFINICIÓN DE MUESTRA CRÍTICA EN LOS ANÁLISIS VÍA PCR

5.1.- INTRODUCCIÓN

Inmediatamente después de la muerte se ponen en marcha los mecanismos de autólisis, las propias enzimas del organismo comienzan a descomponer las sustancias orgánicas del cuerpo. Normalmente, la primera fase de descomposición está seguida por el deterioro de los tejidos blandos por la acción de los microorganismos y, en un estado más avanzado, por la acción de organismos mayores como los insectos y animales vertebrados como ratas.

Puede ocurrir que desde que se comete un delito hasta que se tenga conocimiento de él transcurra un tiempo más o menos largo. Durante este tiempo, las muestras biológicas se ven sometidas a la acción de los agentes ambientales que la rodean: luz ultravioleta (U.V.), humedad, temperatura, cambios en el pH, agentes químicos, etc. Muchas veces son más determinantes las condiciones de conservación de la muestra que el propio tiempo que transcurra. Así, suele ocurrir que al Laboratorio llegan muestras muy antiguas pero muy bien conservadas que no dan problemas a la hora de analizarlas y muestras más recientes que han sido sometidas a condiciones ambientales extremas, el ADN que contenían se encuentra en muy mal estado y por ello son muy problemáticas para el análisis.

Los tres principales problemas que nos encontramos en el estudio mediante PCR de este tipo de muestras son:

- 1.- La **presencia de inhibidores** de la DNA polimerasa.
- 2.- La fragmentación o **degradación del ADN** que puede traducirse en la presencia de **mínimas cantidades** de ADN molde.
- 3.- Las **lesiones** presentes en el ADN molde.

Todas las muestras que presenten alguna de estas tres características serán consideradas muestras críticas y habrá que recurrir a diferentes estrategias para poder obtener algún resultado positivo en su análisis. Además nos encontramos muchas veces con el agravante de que estas características que hemos definido para delimitar la condición de muestra crítica, a menudo no se presentan aisladas sino que ocurre que una muestra con limitada cantidad de ADN además lo presente fragmentado por ejemplo. Esto complica aún más el estudio de estas muestras y justifica los pobres resultados que habitualmente se obtienen de ellas. Describiremos un poco más a fondo estos tres problemas que nos encontramos en las muestras críticas.

5.2.- INHIBIDORES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

Estas sustancias que impiden la función de la Taq polimerasa están presentes porque se extraen junto con el ADN y su presencia da como resultado falsos negativos (Pääbo y cols., 1988; Hagelberg y cols., 1989; Hagelberg y

Clegg, 1991b; Hochmeister y cols., 1991). La inhibición de la PCR no afecta únicamente a las muestras del entorno forense: el uso de la PCR como herramienta para el diagnóstico puede ser complicada cuando se utilizan drogas para el tratamiento de virus que inhiben la Taq Polimerasa produciendo falsos negativos en los pacientes (Yedidag y cols., 1996); algunas comidas contienen compuestos que inhiben la PCR resultando así también falsos negativos en los tests de contaminación microbiológica (Rossen y cols., 1992); cuando el ADN diana procede del suelo, el ácido húmico puede inhibir la PCR (Zhou y cols., 1996).

Los mecanismos de inhibición de la ADN polimerasa son múltiples y actúan a diferentes niveles. Podemos diferenciar fundamentalmente dos categorías de inhibición:

1.- Inhibidores de la Taq DNA polimerasa que se co-purifican con el ADN:

- Los **ácidos fosfonoacético y fosfonofórmico** (Orberg, 1989), a pesar de sus estructuras simples inhiben selectivamente las DNA polimerasas (*Ver Fig. nº 10*). Estos ácidos fosfónicos actúan como análogos del fosfato inorgánico, ocupando un sitio esencial en la enzima.
- Otro tipo de inhibidores de las polimerasas son los reactivos competidores de la incorporación de dNMPs (desoxinucleótidos monofosfato), como es el caso de la **afidicolina** (Chang y cols., 1981; Krokan y cols., 1981) (*ver Fig. nº 10*).

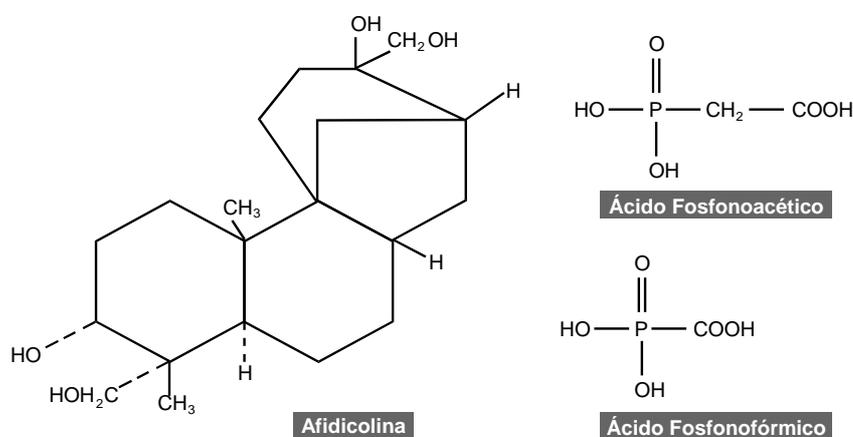


Figura nº 10: Inhibidores de las ADN polimerasas.

- El **grupo hemo** que a veces está presente en el ADN extraído de manchas de sangre es el mayor inhibidor de la PCR (Brynes y cols., 1975; de Franchis y cols., 1988; Akane y cols., 1994). Los estudios realizados, mediante espectrofotometría de varios compuestos que contienen el grupo hemo, sugieren que el inhibidor es un producto de la digestión del complejo hemo de la sangre con proteinasa K. Dicho producto no se aísla completamente por parte de los solventes orgánicos y coprecipita con el ADN.

- La co-purificación del **colágeno** junto con el ADN es el factor responsable de la inhibición en muestras de restos humanos (Scholz y cols., 1998).
- El **exceso de concentración salina**: A veces es necesario trabajar con elevadas molaridades en los tampones de extracción, como en el caso de la extracción de ADN a partir de tejidos duros. Normalmente, el extracto final de ADN todavía contendrá elevada concentración de sales que afectará a los tampones PCR modificando su molaridad y su pH y por ello también afectará a los resultados de la amplificación. En estos casos es recomendable resuspender el ADN extraído en agua o en tampones de baja concentración iónica.

2.- Modificaciones del ADN molde que lo hacen irreconocible como sustrato para la PCR:

- Algunos inhibidores son **análogos de nucleótidos** modificados en el azúcar o en la base. Son aceptados por la polimerasa para aparear con la hebra molde y así son incorporados al ácido nucleico, pero bloquean el crecimiento de la cadena o interfieren con las funciones del ácido nucleico. Un tipo especial de éstos análogos son los TERMINADORES usados habitualmente en biología molecular para secuenciar hebras de ADN. Los terminadores 2',3'-dideoxirribonucleósidos se incorporan al ADN pero no son adecuados como primer para la próxima polimerización.
- Los **inhibidores de las topoisomerasas** producen importantes efectos por medio de las alteraciones en la topología del ADN. Aunque el ADN es químicamente poco reactivo, la necesidad de preservar su conformación y su extraordinaria longitud lo hace vulnerable a agentes que se unen a él de forma no covalente o que introducen de forma ocasional modificaciones covalentes. La agrupación de pares AT y GC en regiones que sirven como orígenes de replicación, promotores de la transcripción, y otras señales vitales son dianas especialmente sensibles para la actuación de estos reactivos.
- La **unión de las proteínas** al ADN a través de los carbohidratos también hace que el ADN se presente de tal forma que la polimerasa no lo reconoce como sustrato (Poinar y cols., 1998).

Por último cabe destacar un efecto que no es inhibitorio propiamente dicho pero que puede afectar seriamente a la eficacia de la PCR. Se trata de la presencia en la muestra de **elevadas cantidades de ADN contaminante exógeno** (Ver Fig. nº 11). En muestras contaminadas con microorganismos (bacterias y hongos) además del ADN humano propio de la muestra podemos encontrarnos además otro ADN no humano procedente de dichos organismos. Este ADN exógeno puede causar reacciones competitivas durante la amplificación si contiene sitios complementarios a los cebadores de la reacción PCR. De esta manera se generarán productos de PCR no específicos o simplemente la reacción será inhibida totalmente dando como resultado un falso negativo.

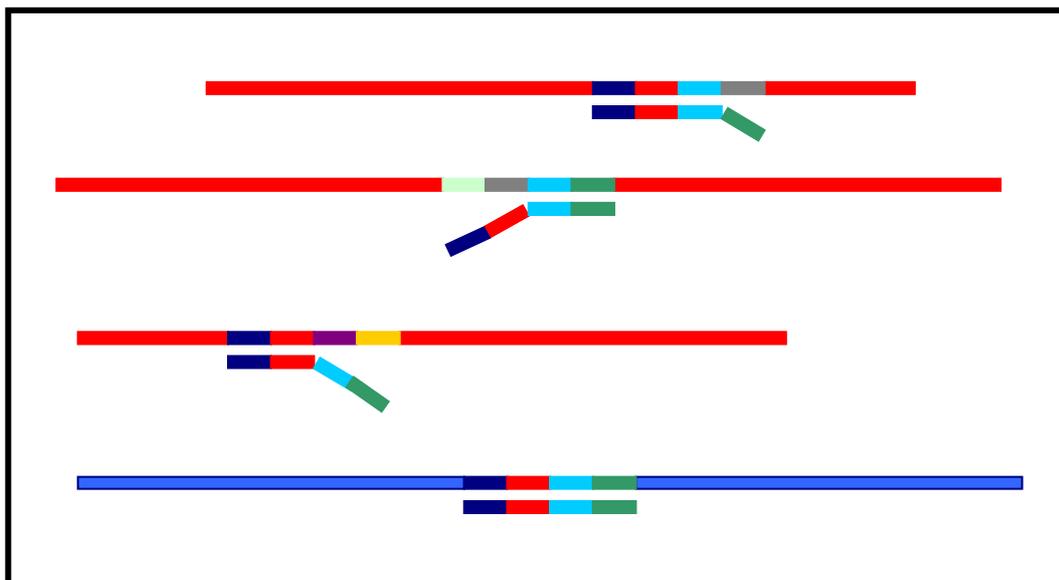


Figura nº 11: Elevadas cantidades de ADN contaminante. Si el ADN exógeno a la muestra (rojo) tiene zonas complementarias a los primers que usamos en la PCR, se genera una competición por la unión, por lo que si hay más cantidad de ADN extraño que de ADN molde (azul), casi todas las moléculas de primer se unirán a dicho ADN exógeno, perdiendo mucha eficacia la PCR, pues no se generarán copias del verdadero ADN molde.

La **presencia de inhibidores** en las muestras **puede demostrarse** fundamentalmente de tres formas:

A) Si una muestra crítica de ADN no da resultados en la amplificación por sí sola y al **añadir** a dicha muestra **ADN reciente** en buen estado no se obtiene resultado alguno, está claro que se debe a la presencia de sustancias inhibidoras; si se obtienen resultados concluyentes tras la mezcla de ADNs podremos pensar que lo que realmente estaba ocurriendo es que el ADN de la muestra crítica se encuentra en muy mal estado o simplemente no se encuentra en suficiente cantidad (Fox,1996).

B) La presencia de inhibidores suele estar correlacionada con la aparición de una **fluorescencia** bajo luz ultravioleta en los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio que habitualmente se utilizan para cuantificar de forma aproximada el ADN extraído y observar su estado de conservación.

C) Pääbo (1989) ha sugerido que la aparición de un **color marrón** en el ADN extraído puede ser debida a la formación de productos de la reducción de azúcares que son capaces de inhibir la reacción PCR.

Las sustancias inhibidoras no se eliminan con métodos convencionales como la extracción de ADN con solventes orgánicos o precipitación con etanol, pero **pueden eliminarse** mediante diferentes técnicas:

1.- Realizar **diluciones seriadas** de la solución de ADN de tal manera que el inhibidor se encuentre a una concentración mínima a la cual no sea capaz de inhibir. Esta técnica no es siempre posible ya que a veces disponemos de muy pequeñas cantidades de ADN molde en la solución y al

diluir el inhibidor también diluiremos dicho ADN, lo cual nos puede traer complicaciones en la reacción PCR por falta de molde.

2.- **Purificación del ADN:** Ya hemos visto que tras una extracción de ADN podemos reconocer la presencia de sustancias inhibidoras como polisacáridos, taninos y ácidos húmicos, por la aparición de un color marrón en la disolución y por su fluorescencia azul bajo la luz U.V. Este material fluorescente migra en geles de agarosa con una movilidad comparable a los fragmentos de ADN de 600 o menos pares de bases. Si en la muestra existen fragmentos largos de ADN, pueden separarse de los inhibidores mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior extracción a partir del gel.

Actualmente existen preparados comerciales de resinas que se unen al ADN y que parecen eliminar algunos inhibidores, como la resina Chelex-100. Este tipo de resinas se puede usar durante la extracción de ADN (Walsh y cols., 1991), o como un paso de purificación después de la extracción (Ellengren, 1991).

3.- Para eliminar la hemoglobina de las muestras de sangre y como paso previo a cualquier extracción de ADN a partir de sangre (líquida o en mancha) es necesario el **lavado** con un tampón que permita eliminar el contenido de hemoglobina.

4.- El uso de **elevados niveles de enzima Taq Polimerasa** (10 Unidades o más) también parece solucionar los problemas de inhibición; de cualquier manera esta puede ser una opción demasiado costosa, especialmente cuando es necesario procesar un gran número de muestras. El exceso de enzima también puede contribuir a incrementar los errores en la amplificación (Eckert y Kunkel, 1991).

5.- La **adición de albúmina bovina** (BSA) o gelatina a la reacción de amplificación produce un efecto positivo en la actividad enzimática (Pääbo y cols., 1988; Hagelberg y cols., 1989; Thomas y cols., 1990; Hagelberg y Clegg, 1991b; Hochmeister y cols., 1991). La albúmina bovina bloquea la inhibición debido a su fuerte afinidad por los inhibidores del tipo de las porfirinas (Pääbo, 1990a). Hemos comprobado que muestras que daban resultados negativos en la amplificación se convertían en verdaderos resultados positivos tras la adición de BSA a la mezcla de PCR.

6.- La aplicación de la técnica de **cromatografía de intercambio iónico** tras la extracción de ADN parece dar muy buenos resultados en la eliminación de sustancias inhibidoras (Thomas y cols., 1994; Arroyo y cols. 1997)

5.3.- DEGRADACIÓN DEL ADN.

Los ácidos nucleicos de muestras críticas se encuentran normalmente muy fragmentados y el rendimiento de su análisis queda reducido a unas 1000 veces menos que una muestra en buenas condiciones (Rogan y Salvo, 1991).

La **temperatura**, la **humedad**, el **pH**, los **agentes oxidantes**, la **radiación** y la **presión mecánica** son algunos de los factores más importantes que influyen sobre el ADN (Scholer y cols., 1960). Su impacto sobre el ADN todavía no se conoce en detalle, pero se sabe que bajo ciertas condiciones el ADN se fragmenta (Pääbo, 1989). Tras la muerte se ponen en marcha principalmente dos mecanismos (Bär y cols., 1988) (ver Fig. nº 12):

- La autólisis, que es una autodigestión mediante enzimas liberadas por los lisosomas celulares.
- La putrefacción, que es la descomposición anaeróbica de proteínas mediante bacterias, normalmente acompañada de la producción de gas.

Ambos procesos muestran su máxima actividad a temperaturas de entre 34-40°C (Thuesen y Engberg, 1990). La pérdida de la regulación enzimática y la acidosis láctica de la autólisis aumentan la actividad de algunas enzimas como las hidrolasas (Bradley, 1938). En este grupo de enzimas se incluyen las **nucleasas** presentes en la propia muestra antes de que ésta se seque y a su vez se pueden dividir en dos subgrupos: (i) endonucleasas que descomponen el ADN cortándolo en pequeños fragmentos y las (ii) exonucleasas que despegan nucleótidos desde los extremos de las moléculas de ADN haciéndolas cada vez más cortas (Lewin, 1987). El Calcio y el Magnesio pueden activar las nucleasas que atacan al ADN en la cromatina (Burgoyne y Hewish, 1978). El tipo de daño más común causado por las nucleasas es el ataque en las zonas del ADN más expuestas, como las cortas regiones entre nucleosomas adyacentes que no se encuentran protegidas por las histonas. Este tipo de degradación es característico de las nucleasas de mamíferos dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} y también de algunas nucleasas bacterianas (Noll, 1974).

La **humedad** del aire también influye en el grado de autólisis (Machie, 1929) y por tanto en la degradación del ADN. Perry y cols. (1988) han realizado estudios sobre la degradación del ADN extraído de restos óseos. En sus análisis concluían que las muestras sometidas a bajas condiciones de humedad se degradaban más lentamente que las sometidas a elevada humedad.

Por tanto, el **agua** es uno de los compuestos que más afectan a la degradación del ADN por intervenir en los mecanismos de descomposición como reactante o como medio (Machie, 1929; Rogan y Salvo, 1990). En ausencia de agua, el crecimiento bacteriano, la degradación enzimática, la hidrólisis espontánea y otras formas de daño químico, se reducen drásticamente (Pääbo, 1985; Pääbo 1989; Pääbo y Wilson, 1991).

En algunas muestras forenses podemos encontrarnos con **contaminantes microbianos** (Por ejemplo: muestras recolectadas de la boca o de la vagina). Otras veces aparece este tipo de contaminación cuando la muestra permanece en condiciones de humedad durante un período de tiempo considerable. La contaminación microbiana tiene dos consecuencias para el análisis ADN:

- el aporte de nucleasas exógenas a la muestra que producen degradación.
- el aporte de ADN exógeno de tal manera que a veces la muestra contiene más cantidad de ADN microbiano que de su propio ADN original.

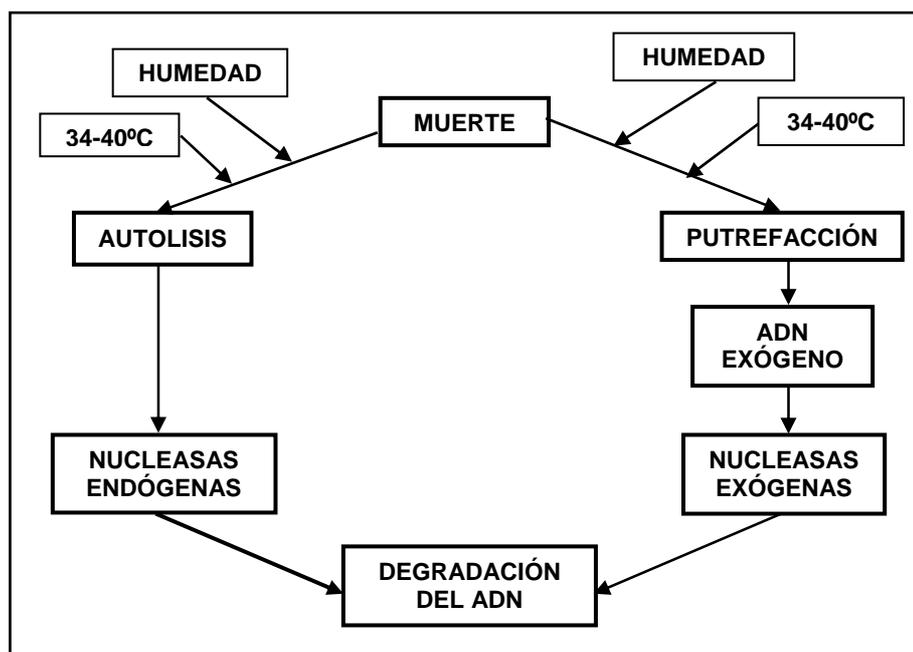


Figura nº 12: Efecto de los procesos de autólisis y putrefacción, que se producen tras la muerte, en la integridad de la molécula de ADN.

En muestras de sangre es el **hierro presente en la hemoglobina** la causa de la degradación del ADN pues cataliza la ruptura de las uniones fosfodiéster entre los azúcares adyacentes. Además, como hemos visto, la hemoglobina inhibe la reacción en cadena de la polimerasa, por eso es tan importante eliminarla en un proceso anterior a la extracción a partir de sangre mediante sucesivos lavados de la muestra en un tampón.

Para evaluar el estado de degradación que presenta una muestra de ADN se recurre a la electroforesis submarina en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Si al leer el gel bajo la luz U.V. aparece una banda nítida, nuestro ADN está en excelentes condiciones, se trata de ADN de alto peso molecular. Si aparece una "cola" ("*smear*") a lo largo del carril de migración, nuestro ADN estará degradado, serán fragmentos que migran a diferente altura por ser de diferente tamaño.

El uso de ADN degradado como molde puede dar resultados negativos en una reacción PCR si no existe ninguna copia completa en la muestra del fragmento a amplificar. Este problema puede solucionarse únicamente probando experimentalmente series de cebadores para cada muestra.

5.4.- LESIONES EN EL ADN

El ADN es objeto de lesiones mediante agentes físicos y químicos en el medio ambiente y mediante radicales libres o agentes alquilantes en el metabolismo. El ADN también puede sufrir errores en el transcurso de su

replicación y durante otros procesos metabólicos. Algunas de las modificaciones químicas pueden ser consecuencia de la oxidación de las desoxirribosas o de las bases. Estos procesos afectan a la integridad y al rendimiento de las secuencias de ADN que han de ser analizadas. Las lesiones más comunes en el ADN son:

1.- **Pérdida de una base:** Los ácidos y el calor eliminan purinas en el ADN (Pääbo, 1985); a pH y temperaturas fisiológicas se pierden alrededor de 2000-10.000 purinas y varios cientos de pirimidinas por día. Gracias a la continua reparación del ADN, los organismos vivos son capaces de mantener su material genético, pero después de la muerte dicha reparación del ADN cesa y los procesos destructivos continúan. Ciertas alteraciones desestabilizan a las bases llegando a su eliminación.

2.- **Alteración de una base** (o un nucleósido): las radiaciones ionizantes y los agentes electrofílicos (incluidos los agentes alquilantes) modifican las bases y azúcares. Mutágenos alquilantes como la nitrosamina añaden un grupo metilo o etilo a la base de un nucleótido. Esto lleva a una alteración de los puentes de hidrógeno de manera que el nucleótido alterado puede aparearse con otro nucleótido erróneo (sustitución de bases). Un sitio especialmente sensible a este tipo de daño es el carbono nº 6 de la Guanina. Se alquila rápidamente aceptando un grupo metilo. El producto resultante, O⁶-metilguanina, puede formar sólo dos puentes de hidrógeno y así aparearse con timina en vez de hacerlo con citosina. Durante la próxima replicación, la citosina estará reemplazada por una timina en esa posición (transición).

3.- **Bucle debido a delección o inserción:** los agentes intercalantes (ej.: acridinas) insertados entre los anillos planos de las bases, causan la omisión o adición de nucleótidos durante la replicación.

4.- **Pirimidinas ligadas:** La radiación U.V. (254 nm.) produce dímeros de ciclobutilo entre pirimidinas adyacentes, concretamente dímeros de timina, citosinas vecinas o una timina y una citosina (ver Fig. nº 13). Esto ocasiona una ruptura de los puentes de hidrógeno con las bases opuestas complementarias. Estos y otros cambios estructurales hacen que se incorpore una base errónea en la nueva hebra de ADN durante la siguiente replicación. No obstante, la célula viva dispone de mecanismos de reparación para este daño. Por citar uno de ellos la célula es capaz de escindir las dos timinas unidas (dímeros) mediante una nucleasa y la reparación de las bases correctas mediante polimerasa seguida de ligasa. En nuestro caso, es importante saber que este tipo de daño en el ADN produce un decrecimiento del producto amplificado pero no produce falsos positivos, ya que el poco ADN que pueda permanecer intacto es el que sirve preferencialmente como molde en la amplificación.

5.- **Rotura de hebras:** Mediante el ataque directo a un residuo de azúcar o como consecuencia de alteraciones en las bases, las uniones fosfodiéster se rompen (simples o dobles) tras la radiación ionizante (Henner y cols., 1982) o la acción de ciertos agentes químicos. Los radicales libres del tipo hidroxilo hidrolizan las desoxirribosas y producen la rotura de hebras. Estas alteraciones

son irreversibles y destruyen la capacidad de la hebra rota de actuar como “*primer*” para la ADN polimerasa ya que los extremos 3’ y 5’ se encuentran modificados (Demple y cols., 1986; Lafleur y cols., 1979; Rogan y Salvo, 1990).

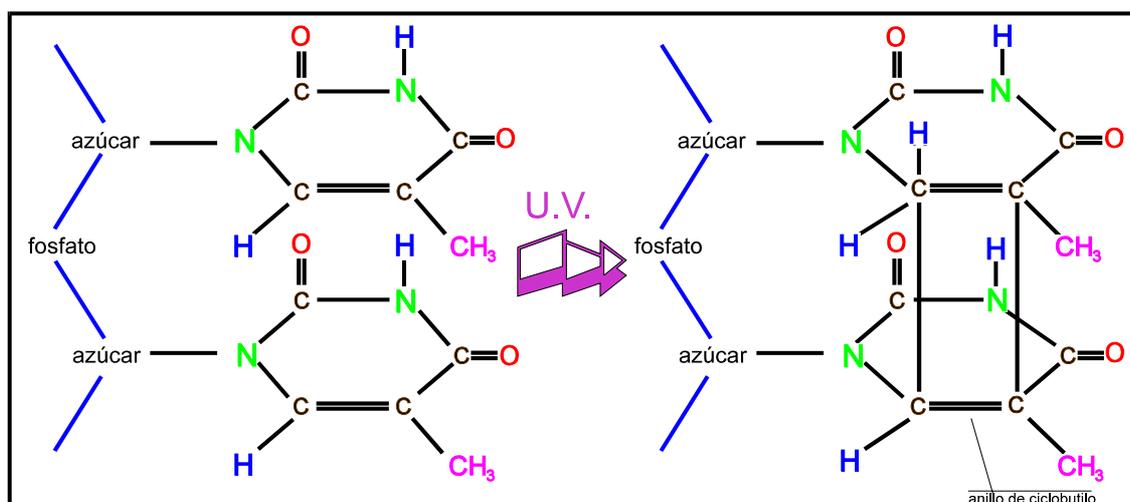


Figura nº 13: Estructura de un dímero de ciclobutina. Tras la radiación ultravioleta se forman enlaces entre residuos de timina adyacentes en la cadena de ADN.

6.- **Fragmentos de desoxirribosa:** La ruptura de desoxirribosa mediante agentes generadores de radicales libres (bleomicina y radiación ionizante) dejan las hebras rotas terminadas con azúcares 3’.

7.- **Cruzamiento de hebras:** los agentes bifuncionales alquilantes pueden formar uniones covalentes entre las dos hebras de ADN impidiendo su separación (mitomicina).

8.- **Radicales de oxígeno:** Es una de las mayores fuentes de lesiones en el ADN. El oxígeno tiene un efecto adverso en las células eucarióticas. Las hebras de ADN pueden romperse como resultado del daño oxidativo causado por los radicales de oxígeno generados en la mitocondria y producidos en el ambiente circundante por los microbios (Gibson, 1984). La presencia de algunos metales como el hierro o el zinc también contribuyen al daño facilitando el ataque, ya que el efecto que producen los radicales de oxígeno está mediado por iones metálicos (Butzow y Eichorn, 1975; Singer y Fraenkel-Conrat, 1965). Por ello, los quelantes, basureros de radicales de oxígenos, y los niveles incrementados de ciertas enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa) reducen la toxicidad del oxígeno in vivo e in vitro.

9.- **Desnaturalización de la doble hebra de ADN:** las condiciones alcalinas pueden desnaturalizar el ADN de doble hebra y así eliminar la estabilidad que la molécula tiene por las uniones del tipo puentes de hidrógeno entre ambas hebras (Lafleur y cols., 1979). Las bases nitrogenadas expuestas, además, pueden ser más susceptibles a modificaciones químicas y degradación; la timina puede convertirse en timglicol y la citosina en 5-

hidroxicitosina y ácido isodialúrico (Teoule y Cadet, 1978). La alteración de la estructura de los anillos en las bases puede modificar las interacciones de bases adyacentes y así desestabilizar la doble hebra aunque no cambie la especificidad del apareamiento entre bases (Rogan y Salvo, 1990).

La consecuencia de la modificación de nucleótidos para los análisis posteriores depende de la naturaleza y la extensión de la modificación. Los tests de la formación de dímeros de pirimidinas, por ejemplo, indican que el daño debe ser cercano a la saturación para causar efecto (Buoncristiani y cols., 1990). Los entrecruzamientos de ADN reducen la eficacia de la extracción y, en casos extremos, hacen al ADN inextraíble.

En resumen, la modificación de los ADNs molde pueden afectar de dos maneras los análisis vía PCR: o bien introduciendo bases incorrectas en la secuencia resultante, o bien bloqueando la ADN polimerasa. Todo ello limita la longitud de las secuencias que podrían amplificarse de manera exitosa (Pääbo y cols., 1990c).

6.- MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN "in vivo".

6.1.- INTRODUCCIÓN

La supervivencia de la especie exige absolutamente que el registro genético se mantenga de manera exacta. El mantenimiento adecuado del material genético no sólo requiere un mecanismo extremadamente exacto para copiar las secuencias de ADN una vez en cada generación celular, sino que también necesita un mecanismo para reparar las numerosas lesiones accidentales que ocurren de forma espontánea en el ADN (Lindahl, 1982; Sancar y cols., 1996).

6.2.- FIDELIDAD DE LA REPLICACIÓN

Las secuencias de ADN se mantienen con una elevada fidelidad de una generación a la siguiente. La velocidad a la que cambian las secuencias de ADN (la frecuencia de mutación) sólo puede estimarse de forma indirecta. Uno de los sistemas consiste en comparar la secuencia de aminoácidos de la misma proteína procedente de varias especies distintas: el porcentaje de aminoácidos diferentes se compara con el número estimado de años transcurridos desde que las dos especies divergieron a partir de un ancestro común, tal como se determina a partir de los registros fósiles (Dickerson y cols., 1969). De esta manera se puede calcular el promedio de años necesarios para generar un cambio estable en el 1% de los aminoácidos de una proteína. Debido a que cada una de estos cambios reflejará, en general, una única alteración de la secuencia de ADN del gen que codifica dicha proteína, este valor puede ser utilizado para estimar el promedio de años necesarios para que se produzca una mutación estable en un gen (Wilson y cols., 1977).

Estos valores estimados serán siempre menores a la frecuencia real de mutación, ya que algunas mutaciones comprometerán la función de la proteína y desaparecerán de la población a causa de la presión de selección. Pero gracias a la técnica de la secuenciación del ADN se ha determinado la similitud de las secuencias de ADN de regiones no codificantes homólogas, del genoma de varias especies diferentes de mamíferos. El análisis de estas secuencias indica que una proteína media de 400 aminoácidos de largo puede alterarse de forma aleatoria por un cambio de un aminoácido, más o menos una vez cada 200.000 años (Jukes, 1980).

La frecuencia de los errores en la replicación del ADN puede estimarse de manera directa observando la velocidad a la que aparecen cambios espontáneos en el genoma de las células en crecimiento (Drake, 1969). Ello puede efectuarse estimando la frecuencia con que aparecen nuevos mutantes en poblaciones animales muy grandes (por ejemplo, colonias de mosca de la fruta) o estudiando alteraciones en enzimas específicos de células que crecen en cultivo. Los valores obtenidos en ambos casos aunque son sólo aproximados, concuerdan con una frecuencia de error de un par de bases por cada 10⁹ replications. Por consiguiente, un gen que codifique una proteína de tamaño medio y que contenga unos 10³ pares de bases codificantes, necesitaría unas 10⁶ generaciones celulares para acumular una mutación. Este

valor concuerda con la frecuencia de mutación evolutiva estimada, que es de una mutación en un gen promedio cada 200.000 años, si admitimos unas cinco generaciones celulares al año en una línea germinal media (desde el huevo paterno al huevo hijo).

6.3.- SISTEMAS REPARADORES

Si no fueran corregidas las lesiones espontáneas en el ADN cambiarían rápidamente las secuencias (Schrödinger, 1945). Las moléculas de un gen sufren cambios importantes debido a las fluctuaciones térmicas. Actualmente sabemos, por ejemplo, que unas 5000 bases púricas (Adenina y Guanina) se pierden cada día del ADN de cada célula humana debido a la destrucción térmica de enlaces N-glicosídicos entre estas bases y la desoxirribosa (despurinización). Análogamente se estima que las desaminaciones de citosina a uracilo en el ADN, se producen a una velocidad de 100 por genoma y día (ver Fig. nº 14). Las bases del ADN están sujetas también a cambios debidos por un lado a metabolitos reactivos que alteran la capacidad de apareamiento de bases y por otro a la luz ultravioleta del sol, que puede favorecer la formación de un enlace covalente entre dos bases de Timina en el ADN (formándose dímeros de timina), como ya hemos visto. Estos sólo son algunos de los muchos cambios que pueden ocurrir espontáneamente en nuestro ADN. Cabría esperar que la mayoría de ellos condujera a la eliminación de uno o más pares de bases en la cadena hija de ADN después de la replicación, o a la sustitución de un par de bases (por ejemplo, cada desaminación C→U transformaría un par de bases C-G en un par de bases A-T, puesto que el Uracilo es muy parecido a la Timina y forma un par de bases complementario con Adenina). Estos cambios tendrían consecuencias desastrosas para los organismos vivos.

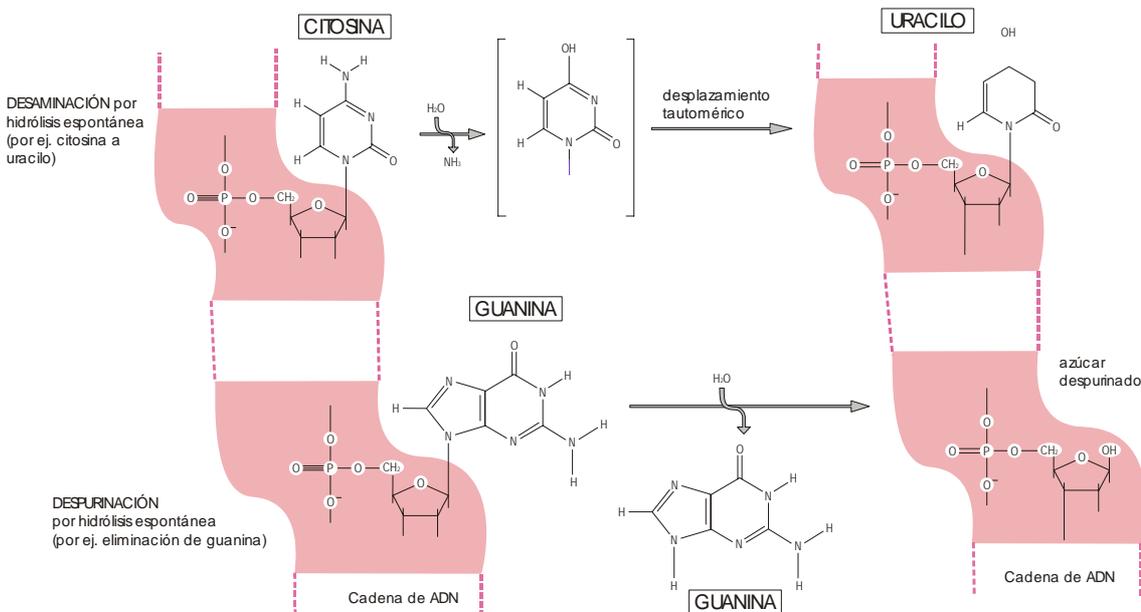


Figura nº 14: Desaminación y despurinización. Dos reacciones químicas frecuentes que originan graves lesiones del ADN de las células (Alberts, 1986).

A pesar de los miles de cambios aleatorios en el ADN de una célula humana provocados por la energía térmica de cada día, se acumulan en la secuencia del ADN de cada célula como máximo unos cuantos cambios estables en un año. La explicación es que las lesiones se eliminan con una eficacia notable a través del proceso de reparación del ADN. Los diversos mecanismos de reparación, dependen de la existencia de dos copias de la información génica, una en cada hebra de la doble hélice de ADN. La porción alterada de una hebra dañada es reconocida y eliminada por un conjunto de enzimas (Lindahl, 1976) (ver Fig. nº 15 a y nº 15 b), y luego reemplazada por los elementos de su forma original por otro enzima, la polimerasa, que copia la información almacenada en la hebra "buena" mediante el apareamiento de bases complementarias (Kornberg, 1980). Finalmente, una enzima denominada ligasa sella la muesca que permanecía en la hélice de ADN, completando la restauración.

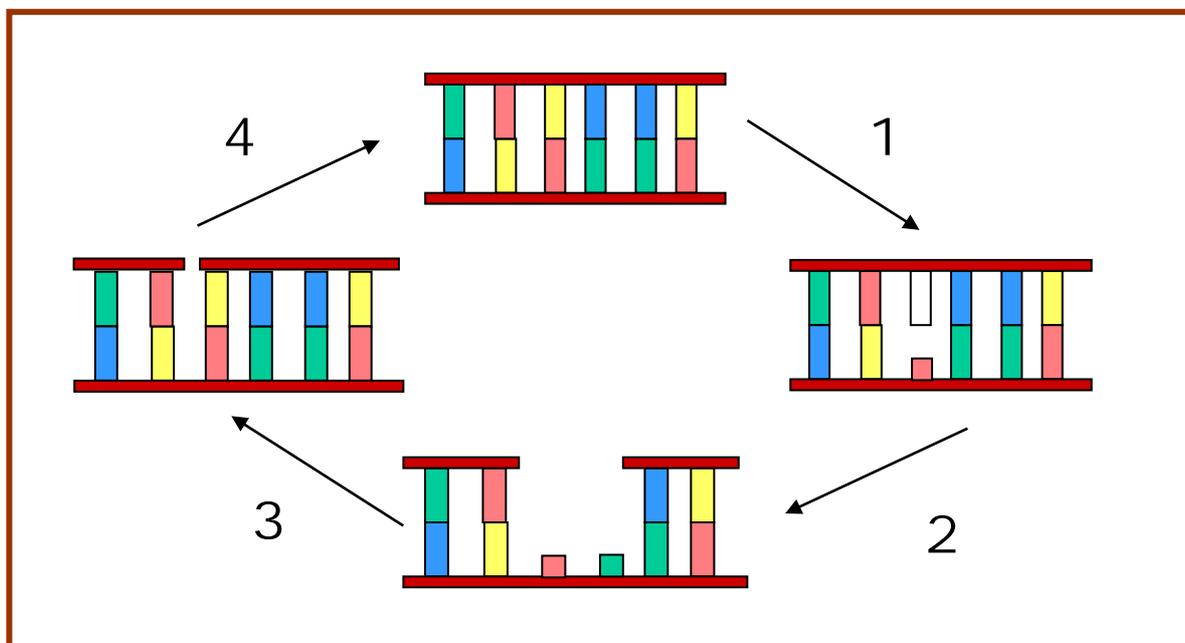


Figura nº 15a: Excisión y reparación. ① Lesión en una de las copias. ② Excisión de la región lesionada. ③ La ADN polimerasa produce una nueva copia a partir de la copia buena que queda. ④ La ADN ligasa sella la muesca.

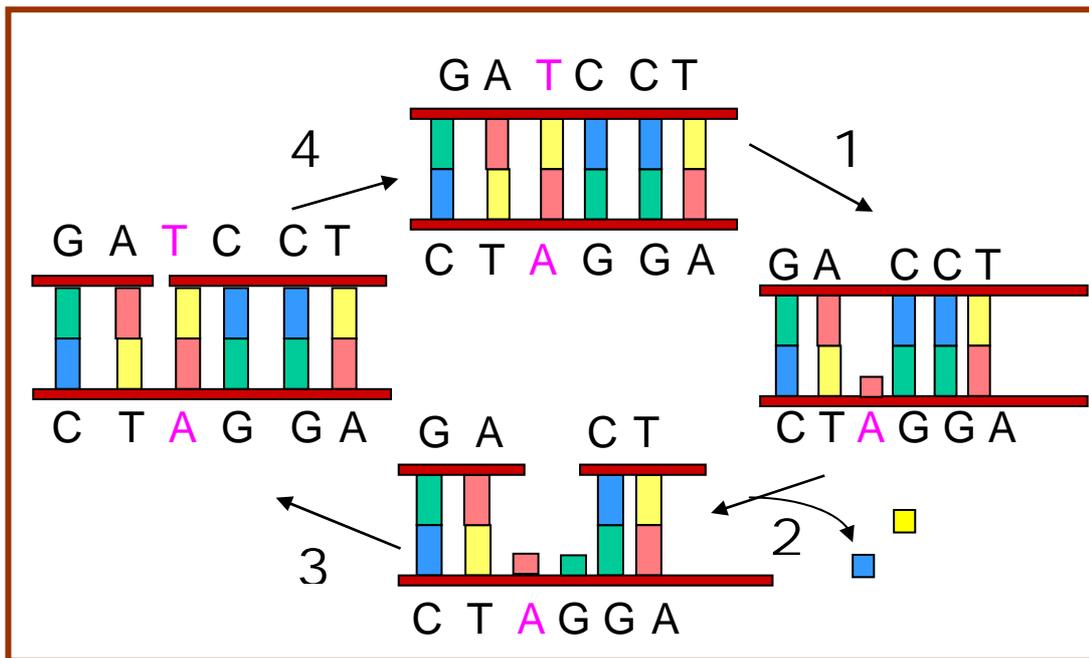


Figura nº 15b: Excisión y reparación. ① Despurinización espontánea. ② Las nucleasas rompen el punto donde falta una base. ③ La ADN polimerasa produce un nueva copia a partir de la copia buena que queda. ④ La ADN ligasa sella la muesca.

Las propiedades químicas de la doble hélice de ADN facilitan su reparación. La base púrica más simple, capaz de aparearse con Citosina, es la Hipoxantina, con quien forma dos enlaces de hidrógeno. Pero la Hipoxantina es el producto directo de la desaminación de Adenina (ver Fig. nº 16).

Añadiendo un segundo grupo amino a la Hipoxantina y generando la Guanina, la evolución produjo el par de bases G-C con sus tres enlaces de hidrógeno. A consecuencia de ello, las dos bases púricas A y G no son interconvertibles por desaminación espontánea. Por ello, cualquier posible acontecimiento de desaminación en el ADN da lugar a una base no natural, que puede ser reconocida y eliminada directamente por una ADN glicosilasa especial.

El ADN es la única molécula que, cuando se encuentra alterada o dañada, es reparada por la propia célula. Un gen bacteriano tiene el 50% de probabilidad de permanecer inalterado después de haberse duplicado 100 millones de veces. Esta remarcada estabilidad del ADN en todas las células se debe a la variedad de mecanismos para preservar su integridad y reparar cualquier lesión. La reparación del ADN dañado es una ventaja selectiva. Durante la evolución se ha desarrollado un complejo y eficiente sistema de reparación.

BASES NATURALES DEL ADN

BASES NO NATURALES DEL ADN

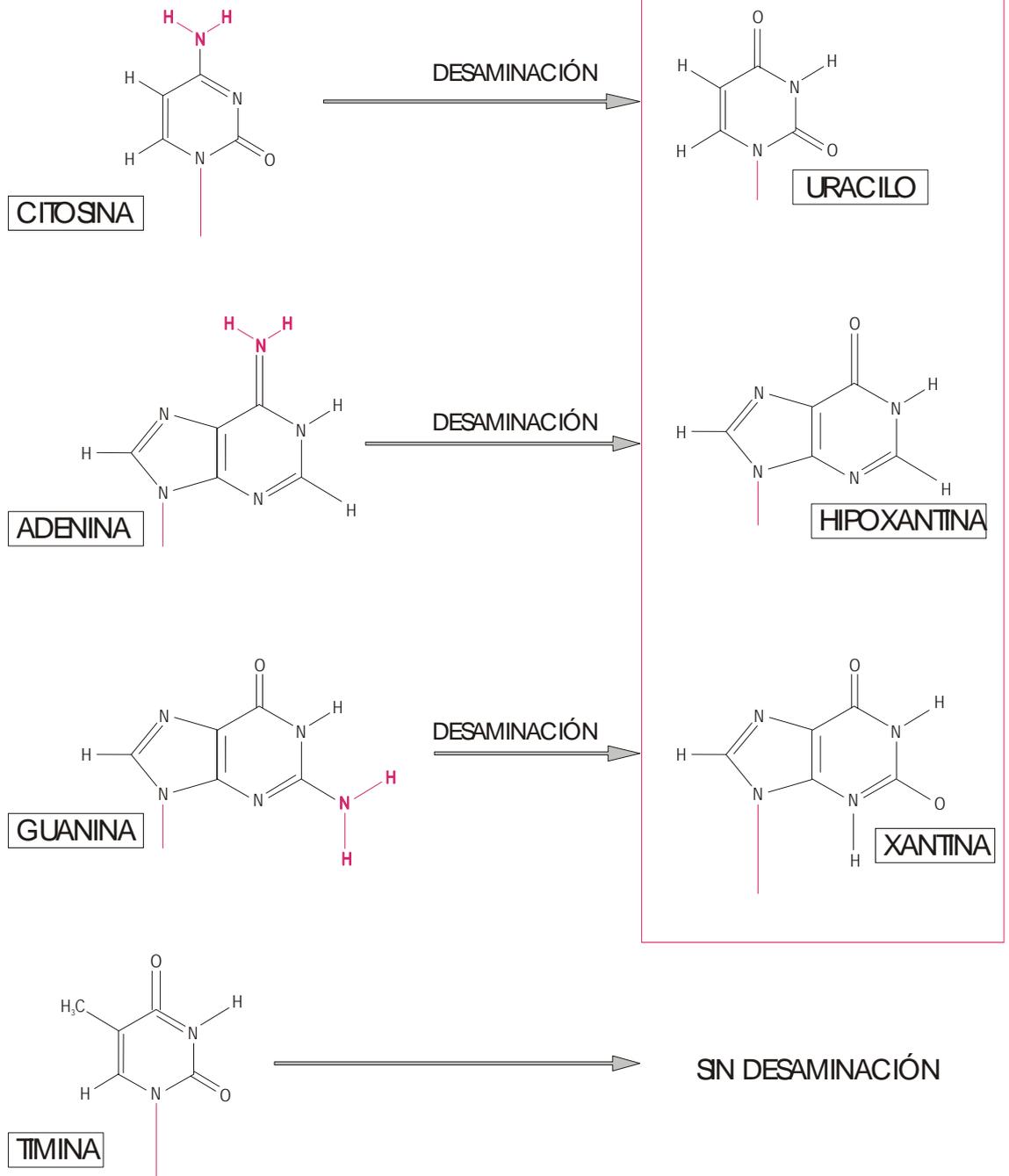


Figura nº 16: Productos de desaminación espontánea de las bases nitrogenadas (Alberts 1986).

Los sistemas de reparación son extraordinariamente diversos y efectivos (Friedberg, 1985). En *E. Coli* están involucrados en la reparación de ADN y funciones relacionadas aproximadamente 100 loci. La estructura complementaria del ADN asegura que la información perdida tras la escisión de una lesión en una de las hebras puede recuperarse gracias a su hebra

complementaria. Tan solo en el caso muy improbable de que ambas copias se lesionen simultáneamente en el mismo par de bases, la célula quedará sin una copia "buena" que pueda utilizarse como patrón para la reparación del ADN (cuando las hebras se encuentran separadas, como en la horquilla de crecimiento, la reparación puede ser más difícil). Algunos errores que se encuentran en ambas hebras también pueden ser reparados. Las deleciones o inserciones de nucleótidos, o el entrecruzamiento de hebras, pueden corregirse mediante el reemplazamiento de la región a través de recombinación. Un par de bases inapropiado resultante de un fallo en la lectura, es aparentemente irremediable, sin embargo puede detectarse por el sistema reparador de errores. Una rotura en la doble hebra será quizás la más dañina de las lesiones, pero puede sellarse mediante ligasas o repararse mediante recombinación.

Los mecanismos moleculares de reparación pueden dividirse en (Sancar y cols., 1988; Sibghat-Ullah y cols., 1990):

(1) Aquellos que **invierten la lesión**, por ejemplo fotorreactivación, desaquilación.

(2) Aquellos que **rompen y sustituyen** la unidad dañada mediante replicación, recombinación, o mecanismos de reparación.

Cuando la reparación falla, la continuidad del genoma puede preservarse a través de la replicación "error-postrado" (*error-prone*), en la cual un puente ("*bypass*") de la lesión permite que se proceda a la replicación.

6.3.1- Fotorreactivación mediante fotoliasas

(Walker, 1985; Jorns, 1989; Jorns y cols., 1990; Li y cols., 1990; Payne y cols., 1990; Sancar, 2000).

La fotorreactivación (ver Fig. nº 17), como alternativa a la escisión, repara los dímeros de ciclobutil inducidos por luz U.V. Las fotoliasas utilizan la energía de la luz visible (300 a 600 nm) para romper el dímero de ciclobutil pirimidina in situ, restaurando las bases a su forma monomérica (Kim y Sancar, 1995). En un primer estado de la fotorreactivación, la enzima reconoce y se une específicamente al dímero en la oscuridad (Weinfeld y cols., 1990). Todas las fotoliasas contienen dos cromóforos, uno de los cuales es 1,5-dihidroflavin adenina dinucleótido (FADH₂). La naturaleza del segundo cromóforo divide las fotoliasas en dos clases; las enzimas de la levadura y de *E. Coli* pertenecen a una clase que utiliza una pterina (coenzima folato) y la otra clase usa una deazaflavina (Wang y cols., 1989). Cuando la lesión absorbe luz (de una longitud de onda característica para el cromóforo), la energía es usada por el complejo estable enzima-DNA para convertir el dímero de ciclobutilo en monómeros de pirimidina. La enzima entonces se disocia del DNA.

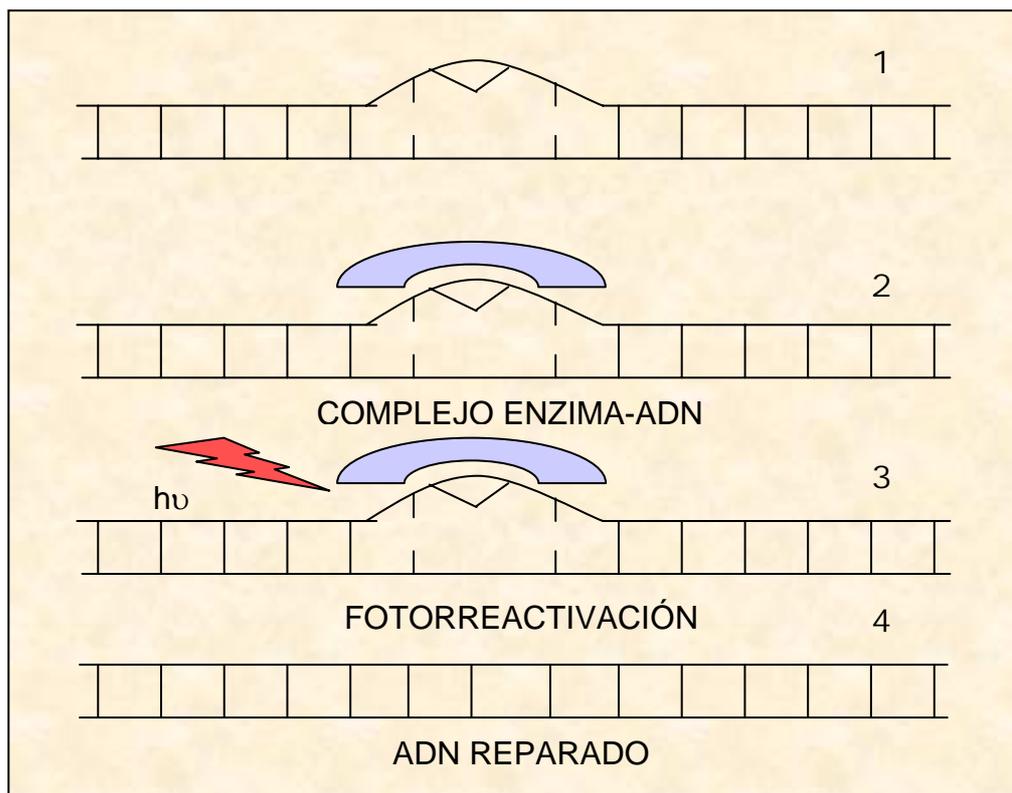


Figura nº 17: Esquema de la fotorreactivación enzimática de un dímero de pirimidina.

6.3.2- Reparación por escisión.

Los sistemas que escinden lesiones en el DNA dependen de enzimas nucleasas (Walker, 1985; Friedberg, 1985; Sancar, 1994; Mu y cols., 1996; Sancar, 1996). Mediante dichas enzimas se lleva a cabo la reparación de una gran variedad de lesiones y de bases modificadas (Ver Fig. nº 18), pues eliminan:

- (1) las bases dañadas, creando un sitio AP (apurínico/apirimidínico).
- (2) un fragmento que contiene un sitio AP.
- (3) el nucleótido dañado y la región de ADN vecina.
- (4) una unión interhebra.

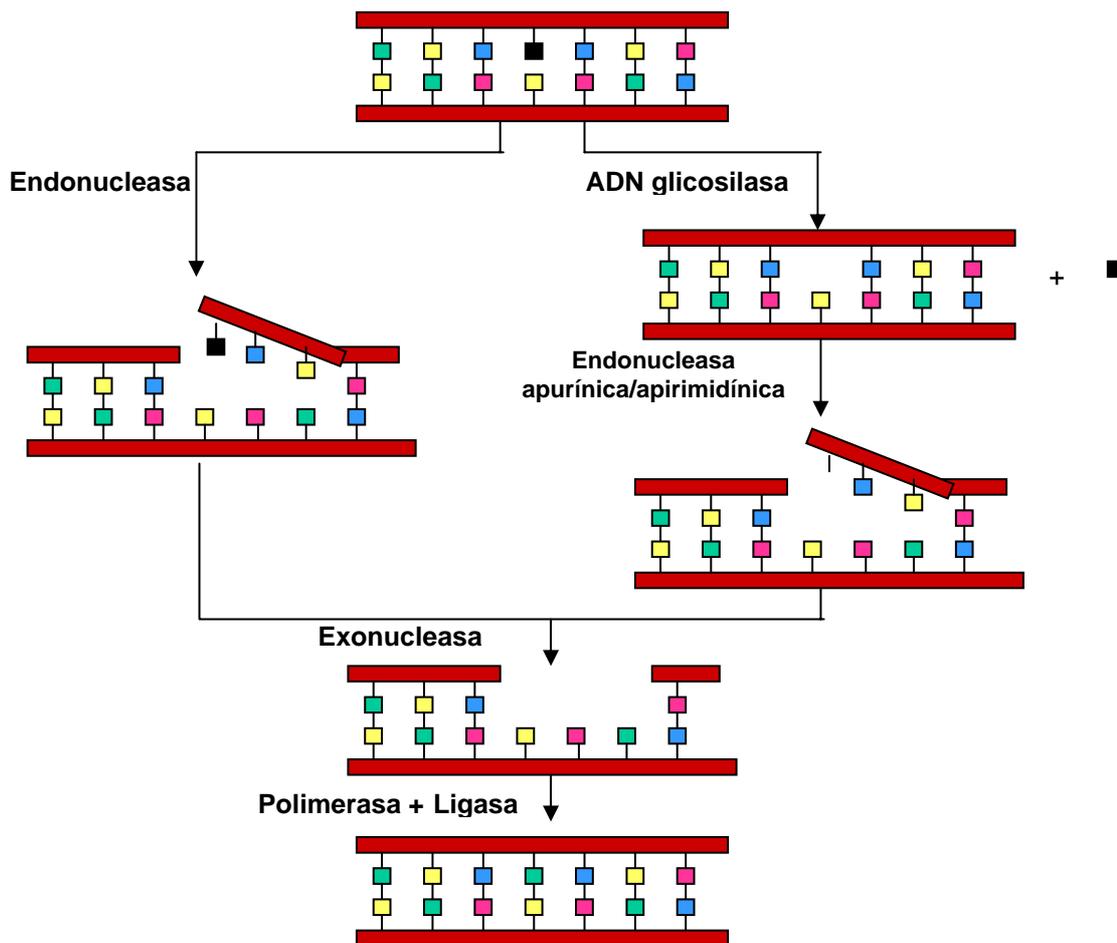


Figura nº 18: Dos mecanismos de reparación por escisión (Prof. S. Linn).

El corte generado por la escisión es rellenado por la ADN polimerasa y unida covalentemente por la DNA ligasa.

(1) **Escisión de bases.** La escisión de bases para eliminar la lesión, creándose así un sitio AP, es llevada a cabo mediante varias N-glicosilasas que reconocen una base desaminada o alterada, o una deformación helicoidal causada por la lesión, y entonces, hidrolizan la unión de la base al azúcar.

Cada uno de los enzimas glicosilasa reconoce un único tipo de base del ADN alterada y cataliza su eliminación hidrolítica del azúcar desoxirribosa (ver Fig. nº 19). Al parecer, existen por lo menos 20 de estos enzimas, entre los que se encuentran los que eliminan las Citosinas desaminadas, las Adeninas desaminadas, diferentes tipos de bases alquilizadas, bases con anillos abiertos y bases en las que un doble enlace carbono=carbono haya sido convertido accidentalmente en un enlace sencillo carbono-carbono (Coulondre y cols., 1978; Arlett y cols., 1978).

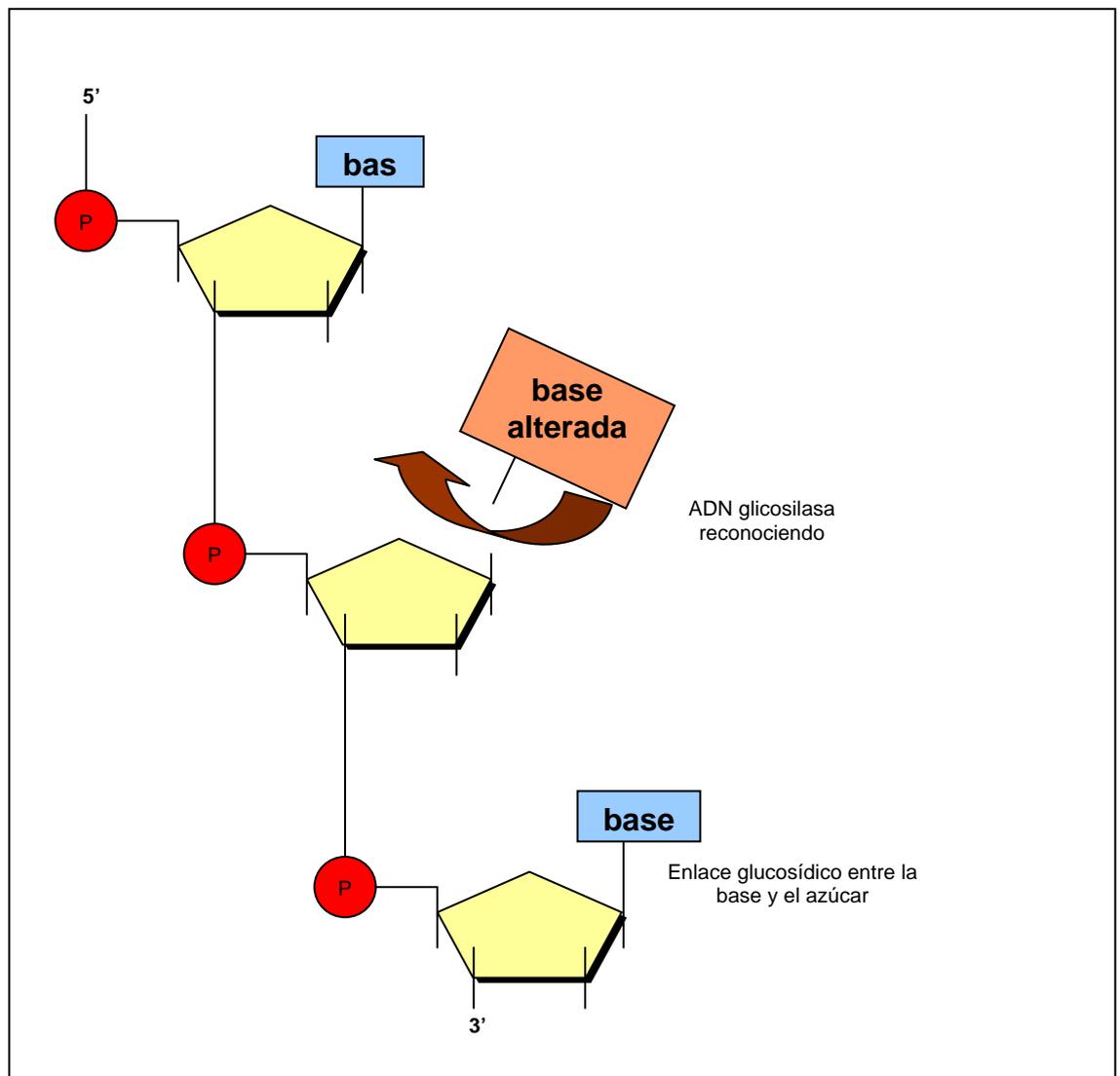


Figura nº 19: Eliminación de bases alteradas en el ADN. Esta reacción está catalizada por distintas enzimas glicosilasas. Cada enzima reconoce una base alterada diferente.

La importancia de la eliminación de las bases de ADN desaminadas accidentalmente ha sido demostrada directamente de dos maneras distintas. En primer lugar, en bacterias mutantes que carecen del enzima Uracil ADN Glicosilasa, la frecuencia normalmente baja de un cambio espontáneo de un par de bases C-G a un par de bases T-A, aumenta unas veinte veces. El segundo ejemplo se refiere al hecho de que normalmente algunas de las bases Citosina son metiladas produciendo 5-metilcitosina en puntos determinados de la secuencia de ADN (esto ocurre tanto en bacterias como en células superiores). En los estudios efectuados sobre un gen bacteriano determinado, se vio que estas metilaciones aumentaban la probabilidad de mutación en el lugar metilado. Este resultado se atribuye al hecho de que la desaminación espontánea de la 5-metilcitosina da lugar a un residuo de Timina, que es un

componente normal de ADN, y no a un residuo Uracilo que no lo es. A consecuencia de ello, estas desaminaciones de C no son reconocidas por la Uracil ADN Glicosilasa de la célula, y por tanto no son reparadas (ver Fig. nº 20).

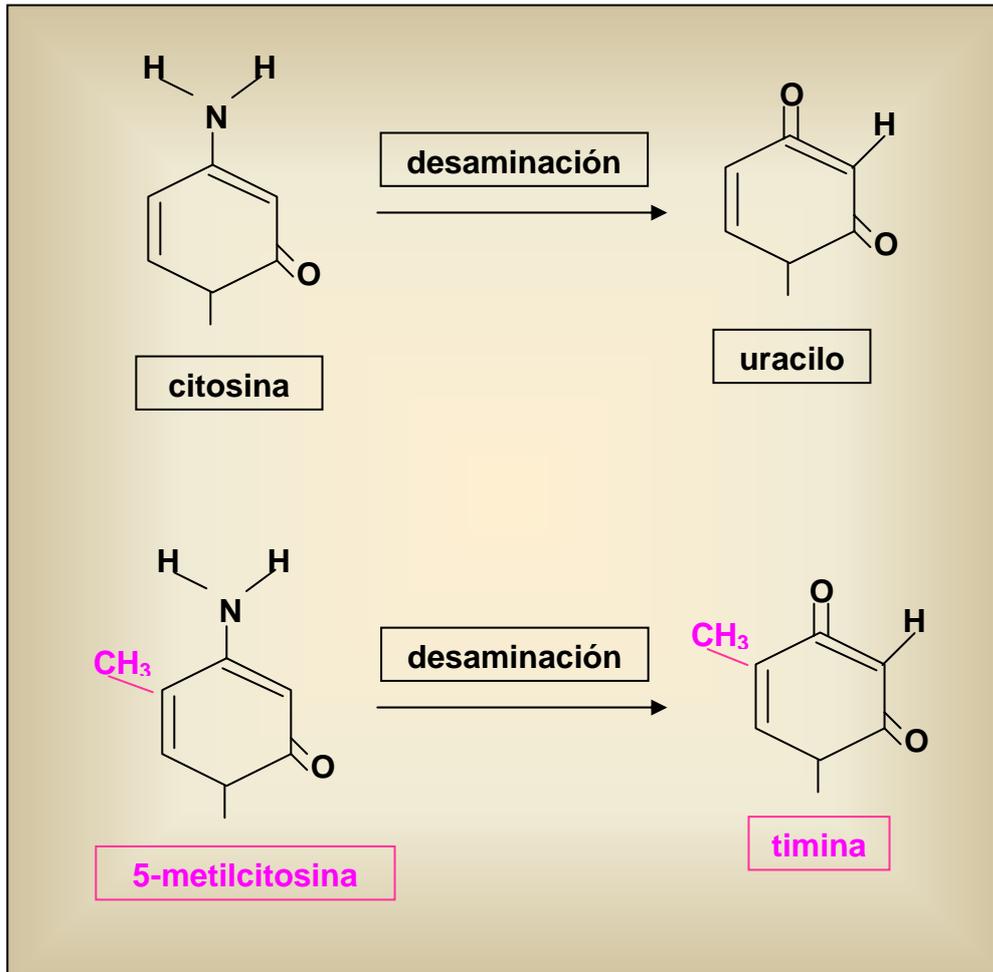


Figura nº 20: Desaminación. La desaminación de un residuo de Citosina produce Uracilo que puede ser eliminado por la enzima uracil ADN glicosilasa. Sin embargo, si el residuo de Citosina se encuentra metilado, la desaminación produce Timina, que no puede ser eliminada por ser un componente normal en la cadena de ADN (Alberts, 1986).

(2) **Excisión de una región AP.** La lesión que se produce con mayor frecuencia en el ADN es la despurinización. Este tipo de lesión se repara con gran eficiencia (Ver Fig. nº 15b). Primero se detecta la ausencia de la base púrica, luego una endonucleasa corta el esqueleto fosfodiéster del ADN en el punto alterado. Después de que los nucleótidos vecinos hayan sido eliminados por cortes posteriores alrededor del punto inicial de incisión, se restaura una secuencia intacta de ADN como hemos descrito anteriormente.

(3) **Excisión de oligonucleótidos.** La excisión de regiones que contienen un dímero producido por la luz U.V. (Sancar y Sancar, 1988; Van Houten, 1990), o una unión interhebra (ver después) se realiza por una excinucleasa, como el complejo UvrABC de *E. Coli*, que corta un fragmento de 12 o 13 nucleótidos de una hebra. El espacio resultante se rellena mediante DNA pol Y y se engancha mediante ligasa. La polimerasa Y y la helicasa II son esenciales para la eliminación del oligonucleótido y reciclaje de la excinucleasa. La endonucleasa α de *Dinococcus (Micrococcus) radiodurans*, el organismo más resistente a la luz UV conocido, tiene funciones similares (Evans y Moseley, 1985).

En humanos, los estudios de xeroderma pigmentosum (XP) muestran que los defectos en la reparación de lesiones UV están distribuidas a lo largo de ocho grupos de genes (XP-A hasta XP-G y una variante XP). Varias de las proteínas correspondientes se han identificado y tienen funciones reparadoras de lesiones UV (Sancar, 1995). Una es la proteína XP-D, una DNA glicosilasa / endonucleasa AP clase I que actúa sobre pirimidinas oxidadas (Keeney y Linn, 1990). Otra, la proteína XP-E, se une al ADN dañado y parece funcionalmente análoga a la proteína de levaduras fotoliasa (Chu y Chang, 1988; Patterson y Chu, 1989; Chu y Chang, 1990). Además de la reparación dependiente de luz, las fotoliasas de *E. Coli* y de levaduras parecen participar en la reparación por excisión (Sancar, 1990).

(4) **Excisión de una unión intrahebra.** Tales uniones se producen por muchos carcinógenos y agentes quimioterapéuticos (mitomicina C, gas mostaza de nitrógeno y azufre); la excisión requiere la reparación de ambas hebras (ver fig. nº 21). En *E. Coli* y en células de mamíferos, las uniones se reparan mediante una combinación de excisión de nucleótidos y una recombinación (Sancar y Sancar, 1988). En *E. Coli*, la acción de la excinucleasa Uvr (Jones y Yeung, 1988; Sladek y Sancar, 1989), la recombinasa RecA (Sinden y Cole, 1978) y la asistencia de la nucleasa RecBCD pueden explicar los productos de la reparación (Cimino y cols., 1985). La excisión de un oligonucleótido de una hebra y su reemplazamiento mediante recombinación mediada por RecA es seguida por la excisión del oligonucleótido correspondiente de la otra hebra y su reemplazamiento, llenando el hueco, mediante síntesis.

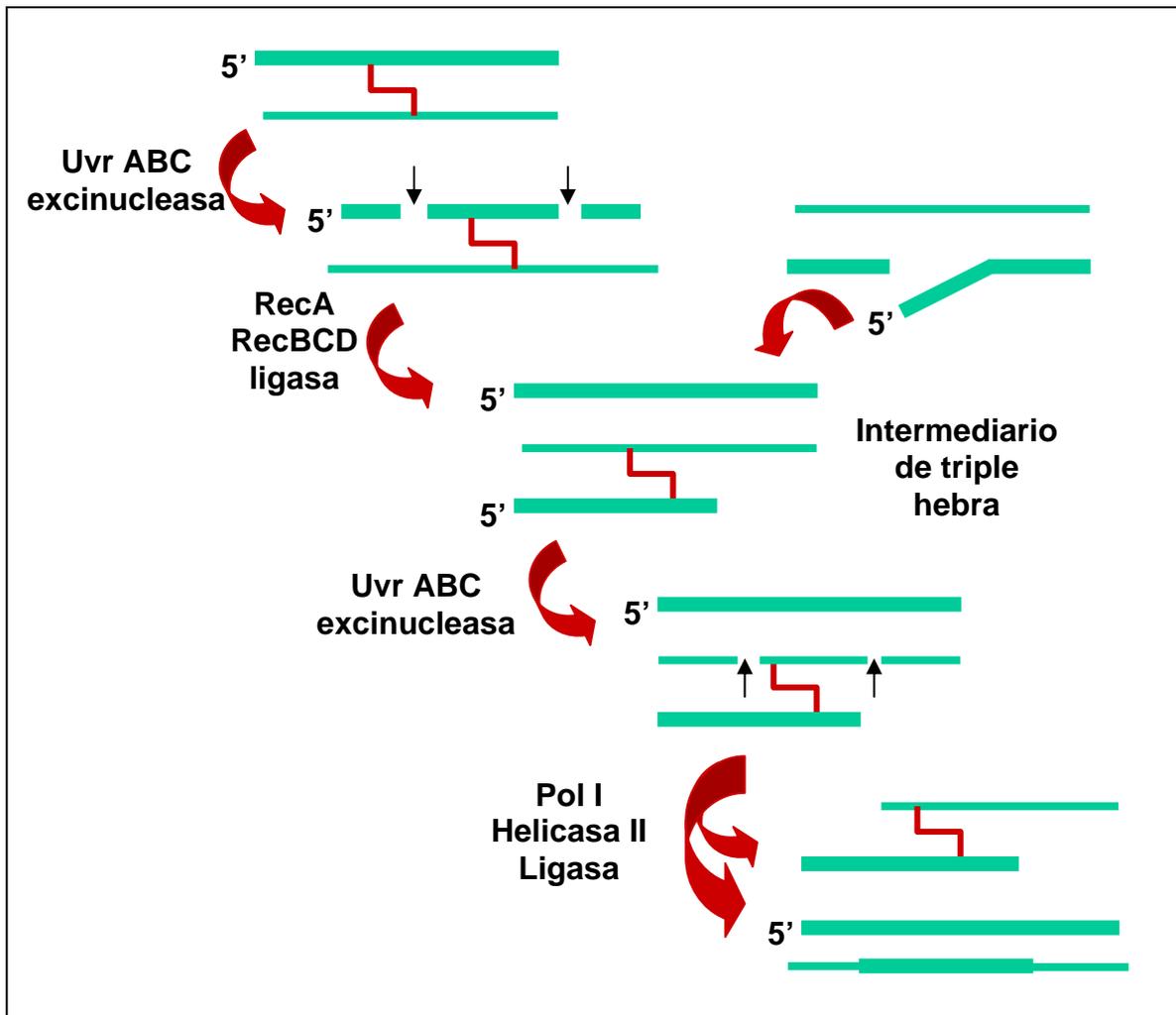


Figura nº 21: Modelo de reparación por excisión de una unión interhebra en E. Coli (basado en Sancar, 1988).

7.- POLIMORFISMOS DEL ADN

7.1.- INTRODUCCIÓN

Sabemos que la longitud del ADN humano es extensa y el número de pares de bases o nucleótidos que lo forman es de aproximadamente 3000 millones por célula haploide. Sin embargo, no todos estos pares de bases tienen una función específica. Podemos clasificar al ADN según su función, en tres tipos diferentes (ver Fig. nº 22):

(i) **ADN codificante** que se traduce en proteínas. Es el ADN responsable directamente de la formación de proteínas, pues lleva la información necesaria para formar la secuencia de aminoácidos de cada proteína. Este tipo de ADN es el que forma los genes estructurales y también se le ha llamado ADN informativo. Del total del genoma humano, se considera que tan solo el 1-2 % codifica para proteínas.

(ii) **ADN auxiliar** que participa en la formación de proteínas pero no es responsable directo del orden de aminoácidos de la proteína. Suele tener diversas funciones:

a) reguladora de la transcripción, es decir, contiene la información para que se forme una proteína (activación) o para que se paralice su formación (desactivación).

b) mantenimiento de la integridad estructural del cromosoma.

c) migración de los cromosomas durante la división celular.

(iii) **ADN no funcional**, que no se traduce a proteínas. Se creía que carecía de función alguna y por eso se la ha llamado ADN basura, pero existen hipótesis que postulan que también interviene en el mantenimiento de la arquitectura de los cromosomas (Puertas, 1991).

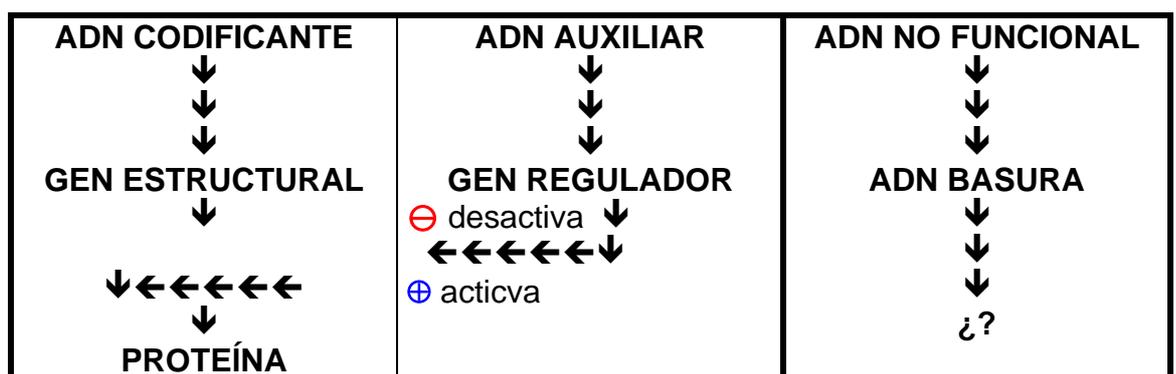


Fig. nº 22: Clasificación de los tipos de ADN según su función.

A medida que los biólogos moleculares fueron investigando y descubriendo los secretos del ADN, encontraron que a veces aparecían tramos cortos de ADN humano que variaban de una persona a otra. Es decir, el ADN humano no era totalmente igual en todas las personas, existían zonas que eran

polimórficas pues variaban en la secuencia u orden de bases nitrogenadas. Estas variaciones de secuencia se llaman polimorfismos genéticos ya que permiten distinguir a los individuos. Algunas de las diferencias descritas son significativas, pues ocurren en genes (variaciones en ADN codificante). Sin embargo, muchas de las variaciones parecían tener poco que ver con los genes y, su objetivo, si es que lo tienen, es desconocido (variaciones en ADN no funcional). Por tanto, el ADN no codificante no está sujeto a presión selectiva intensa, por lo que admite unos niveles de variación muy grandes convirtiéndose estas regiones en objeto de interés para análisis de identificación. Se han descrito diferentes tipos de polimorfismos que veremos más detalladamente.

7.2.-TIPOS DE POLIMORFISMOS.

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 (Klug y Cummings, 1999).

Una categoría importante de ADN repetitivo, esta constituida por el **ADN repetido en tándem**. Está 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. Estas secuencias están distribuidas a lo largo de todo el genoma y su polimorfismo es debido a cambios en el nº de veces que se repite una secuencia núcleo o core. Si dicho núcleo está formado por 2-7 pb estaremos ante un microsatélite (Weber y May, 1989) o **POLIMORFISMO STR** (*Short Tandem Repeat*). Si está formado por más de 7 pb estaremos ante un minisatélite (Jeffreys y cols., 1985) o **POLIMORFISMO VNTR** (*Variable Number of Tandem Repeat*). Esta variación se traduce en diferencias en la longitud de los fragmentos a estudiar. Por ejemplo, imaginemos una secuencia núcleo o core CTGA que se puede repetir un número variable de veces:

CTGA-CTGA -----= 2 veces.
 CTGA-CTGA-CTGA -----= 3 veces.
 CTGA-CTGA-CTGA-CTGA -----= 4 veces.
 (CTGA)_n -----= n veces.

Cada individuo presenta en cada cromosoma un número de repeticiones diferente, heredados de su padre y de su madre, que podremos estudiar separándolos por tamaños.

Individuo 1:

hereda de su padre: CCGAT(CTGA)(CTGA)(CTGA)TTGCGA (n=3 repeticiones)

hereda de su madre: CCGAT(CTGA)TTGCGA (n=1 repetición)

Individuo 2:

hereda de su padre: CCGAT(CTGA)(CTGA)TTGCGA (n=2 repeticiones)

hereda de su madre: CCGAT(CTGA)(CTGA)(CTGA)(CTGA)TTGCGA (n=4)

Desde el punto de vista genético-legal es el ADN repetido en tándem y, dentro de él, el ADN minisatélite y microsatélite (polimorfismos de repetición), el más interesante. Sin embargo no debemos perder de vista los **POLIMORFISMOS DE SECUENCIA**, pues también son útiles en identificación. Un polimorfismo de secuencia se produce cuando en una misma región de ADN puede aparecer una secuencia de bases u otra distinta, sin tener que ver con el número de repeticiones. Este es el caso de la región que codifica para el sistema HLA en el ADN nuclear y de la región control del ADN mitocondrial (Ver Tabla nº 1).

A cada una de estas regiones polimórficas que se estudian en genética forense se les ha llamado MARCADOR GENÉTICO, SISTEMA O LOCUS (loci, en plural). Por ejemplo, el grupo sanguíneo o sistema AB0 es un marcador genético que difiere de unas personas a otras, ya que existen personas del grupo sanguíneo A, personas del grupo B, del grupo 0 y del grupo AB. Al igual que el grupo sanguíneo, existen muchos marcadores genéticos y para diferenciar unos de otros se les ha puesto nombre propio; así, al marcador genético relacionado con los grupos sanguíneos se le llama Sistema AB0 (se trata de un polimorfismo de secuencia).

TIPOS DE POLIMORFISMOS	
DE REPETICIÓN → para un fragmento equivalente de ADN, el número de veces que se repite una secuencia núcleo no es idéntico.	DE SECUENCIA → para un fragmento equivalente de ADN, la secuencia de nucleótidos no es idéntica.
MICROSATÉLITES → la secuencia que se repite es de menos de 7 pares de bases (pb). Ej.: (CTGA) _n . MINISATÉLITES → la secuencia que se repite es de más de 7 pb. Ej.: (CCCTGAACAATGG) _n	Ej.: Polimorfismos tipo SNP (single nucleotide polymorphism). En cierta zona del ADN un individuo tiene una secuencia del tipo: AATGCAT, y en la misma región de ADN otro individuo tiene la secuencia del tipo: AACGCAT.

Tabla nº 1: Tipos de polimorfismos del ADN.

El tipo de nombre propio que se le pone a cada marcador varía; algunas veces es un nombre arbitrario que se refiere al cromosoma donde se encuentra el fragmento de ADN, como es el caso del marcador D1S80 (se trata de un polimorfismo de repetición del tipo minisatélite). La D indica que es un fragmento de un ácido nucleico del tipo "DNA", el 1 significa que se encuentra en el cromosoma nº 1, la S significa que es un segmento único de ADN (es decir que no se repite en otros cromosomas) y el 80 es el nº de orden en que fue descrito el fragmento. Este tipo de nomenclaturas suele estar asociada a secuencias repetitivas sin ninguna conexión a genes que codifiquen proteínas, y en el caso de que sean segmentos que expresen suelen llevar el sufijo "E" para indicar este hecho. Otras veces el nombre del marcador hace referencia a la información que produce el fragmento de ADN codificante que se encuentra más cercano al propio marcador, como por ejemplo el marcador HUMTH01 que

son las siglas de la proteína Tirosina Hidrolasa HUMana (se trata de un polimorfismo de repetición del tipo microsatélite que se encuentra cercano al gen de la mencionada proteína).

Las diferentes formas alternativas en las que un marcador puede manifestarse se denominan alelos. Cuantos más alelos (posibilidades) tenga un marcador genético, mejor resultará a la hora de diferenciar entre unas personas y otras. El sistema ABO tiene solamente tres alelos diferentes (alelo A, alelo B y alelo 0); decir que una persona es del grupo sanguíneo A no es decir mucho, ya que aproximadamente el 45% de la población española pertenece a este grupo. Sin embargo, el marcador genético D1S80 presenta al menos 27 alelos diferentes numerados del 14 al 41 con frecuencias más o menos repartidas, y por ello este marcador discrimina más entre las personas (identifica más) que el anterior sistema ABO.

Para presentar los resultados de la analítica de las evidencias forenses ante la Justicia y para transferir datos entre distintos laboratorios ha sido necesaria la estandarización de la nomenclatura de los alelos. En los polimorfismos de repetición los alelos se denominan según el número de repeticiones. Por ejemplo, en el sistema HUMTH01 la secuencia que se repite es (TCAT). Si dicha secuencia se repite siete veces, el alelo se llama 7, si se repite ocho veces se llamará alelo 8, si se repite nueve veces se llamará 9, y así sucesivamente (*DNA recommendations*, 1994). En los polimorfismos de secuencia los alelos se denominan tanto con números como con letras. Por ejemplo, en el sistema DQA1 los alelos se denominaron por convenio alelo 1, alelo 2, alelo 3, alelo 4, pero se han encontrado alelos muy parecidos al 1 (solo se diferencian de él en algunas bases) que se han denominado alelo 1.1, alelo 1.2, alelo 1.3; y alelos muy parecidos al 4 que se han denominado alelo 4.1, alelo 4.2, alelo 4.3. En el sistema HBGG los alelos se denominan por convenio con letras y así están descritos el alelo A, el alelo B y el alelo C.

Como hemos visto parte de nuestro material genético nuclear lo heredamos de nuestro padre y parte de nuestra madre. Si el ADN heredado de nuestro padre es igual al ADN heredado de nuestra madre para un marcador genético concreto, se dice que el individuo en cuestión es homocigoto para ese carácter. Por ejemplo, cuando en un polimorfismo STR de los descritos anteriormente, un individuo hereda 14 repeticiones de su madre (alelo denominado 14) y 14 repeticiones de su padre (alelo denominado 14), se dice que dicho individuo es homocigoto 14-14. Si por el contrario el material genético heredado de la madre es diferente al heredado del padre, estaremos ante un individuo heterocigoto. Por ejemplo, un individuo que herede 14 repeticiones de su madre (alelo 14) y 16 de su padre (alelo 16) en el marcador genético anterior, será un individuo heterocigoto 14-16.

7.2.1- Polimorfismos de secuencia.

Los polimorfismos de secuencia pueden ser de varios tipos pues las variaciones que aparecen en los alelos pueden deberse a múltiples motivos como el cambio en una sola base nitrogenada o la inserción o delección de una o más bases. Podemos hacer una sencilla clasificación atendiendo a estos criterios:

a) Sustituciones de una única base o SNPs (*single nucleotide polymorphism*): se trata de mutaciones puntuales dentro de la secuencia de ADN y suelen ser de tipo bialélico, es decir presentan únicamente dos alelos (ver tabla nº 2). Estas mutaciones se clasifican en dos tipos: (i) transiciones, consistentes en el cambio de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina y (ii) transversiones, consistentes en el cambio de una purina por una pirimidina o una pirimidina por una purina.

SNP	ALELO	SECUENCIA
EA2	A	----CCGCCGCGCTCCCAGCCCCGGCAGCCTCAGCATC A GCGGGCGGGCGGGCGTC----
	G	----CCGCCGCGCTCCCAGCCCCGGCAGCCTCAGCATC G GCGGGCGGGCGGGCGTC----
CSTB	T	---GCCGCCAAGATGATGTGCGGGG T CCCTCCGCCACGCAGCCGGCCACC----
	G	---GCCGCCAAGATGATGTGCGGGG G CCCTCCGCCACGCAGCCGGCCACC----

Tabla nº 2: Polimorfismos tipo SNP. Transición: EA2 en el cromosoma 19 (NCIB Assay Id: 18419); Transversión: CSTB (Cystatin B) en el cromosoma 21 (NCBI Assay Id: 8005).

b) Sustituciones de varias bases: Cuando se produce un acúmulo de estas sustituciones en una región más o menos corta de ADN nos encontraremos ante un polimorfismo de secuencia clásico con alelos que se diferencian en su secuencia en varias posiciones en vez de en un único nucleótido. Tal es el caso del 2º exón de DQA1 (Erlich y cols., 1986) dentro del sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) en el cromosoma 6 (ver tabla nº 3).

ALELO	SECUENCIA
1	----GATGAGGAGTTCTACG-----TGGAGAGGAAGGAGAC-----CGGTGGCCTGAGTTCAGCAAATTTGGAG
2	----G A C G AGGAGTTCT A T G -----TGGAGAGGAAGGAGAC----- A AG T T G C C T C T G TT C C A G A G C T T G G A A
3	----G A C G AGGAGTTCT A T G -----TGGAGAGGAAGGAGAC----- C A G T T G C C T C T G T T C G C A G A T T T A G A A
4	----G A C G A G C A GTTCTACG-----TGG G GAGGAAGGAGAC----- T G T T T G C C T G T T C A G A C AATTTGGAA

Tabla nº 3: Polimorfismo de secuencia clásico en el marcador DQA1 del sistema HLA. Puede observarse que los alelos se diferencian en varios nucleótidos situados en distintas posiciones (Perkin-Elmer. "Amplitype user guide of Amplitype HLA DQA1 Forensic DNA Amplification and Typing kit").

c) Inserciones y deleciones de bases puntuales: también son mutaciones puntuales dentro de la secuencia de ADN pero implicando la suma o resta de algún nucleótido (ver tabla nº 4).

LOCUS	ALELO	SECUENCIA
7.31.98 (3)	-	----CATTAGATGTTTCATGGACT-GCACAGAGACTGTATT----
	G	----CATTAGATGTTTCATGGACT G GCACAGAGACTGTATT----

Tabla nº 4: Delección de una base. Cromosoma 7q21-22 (NCIB Assay Id: 8).

d) Inserciones y deleciones de una secuencia completa: se trata de mutaciones dentro de la secuencia de ADN que implican la suma o resta de un grupo de nucleótidos.

7.2.2- Polimorfismos de repetición.

Se trata del polimorfismo que se observa más frecuentemente en el ADN repetido en tándem. Es el número de veces que se repite un fragmento de ADN ó unidad de repetición que determina la diferencia entre unos individuos y otros. Según el número de nucleótidos que forman las unidades de repetición de estos fragmentos se distinguen:

a) Polimorfismos minisatélite: Como hemos visto, los minisatélites son polimorfismos formados por la repetición en tándem un número variable de veces de una secuencia núcleo mayor de 7 pb. El número de repeticiones puede ser distinto entre los cromosomas homólogos y entre diferentes individuos (Nakamura y cols., 1987). Un ejemplo de ello es el locus D1S80 (Nakamura y cols.,1988), de uso muy extendido hasta no hace mucho tiempo en los laboratorios de genética forense. Su unidad de repetición posee una longitud de 16 pb que se repiten entre 14 y 41 veces dando lugar a un elevado número de alelos. Pero además de estas variaciones también se han descrito en este marcador alelos mayores que el 41 (Kadasi y Bohusova, 1995) y alelos variantes o interalelos (Skowasch y cols.,1992; Alonso y cols., 1993; Huang y cols., 1994; Nagai y cols., 1994). Estas microvariaciones son debidas a pequeñas diferencias en el tamaño del alelo o a variaciones en la secuencia.

Por tanto, los minisatélites no están formados por unidades de repetición idénticas en cuanto a secuencia y por ello, en realidad poseen dos tipos de variación, una debida a la longitud (que depende del número de repeticiones, VNTR) y otra debida a las diferencias en la secuencia de la unidad de repetición (*minisatellite variant repeat* o *MVR*).

Parece ser que los loci de mayor variabilidad en cuanto al número de repeticiones (mayor número de alelos diferentes) poseen un nivel más bajo de variación entre la secuencia de las unidades de repetición. Tal es el caso del ejemplo anterior (D1S80) en el cual las microvariaciones son mínimas. Pero existen otros minisatélites como MS32 localizado en el cromosoma 1 tremendamente variables, con al menos 50 alelos diferentes. La secuenciación de este minisatélite (Wong y cols., 1987) puso de manifiesto que la mitad de las unidades de repetición poseían una mutación del tipo sustitución que creaba un sitio de corte para la enzima de restricción *HaeIII*; de hecho se utiliza esta enzima para el análisis del polimorfismo de este marcador, como veremos posteriormente.

Los polimorfismos MVR se presentan tanto en autosomas como en cromosomas sexuales, como se ha demostrado con la descripción del minisatélite MSY1 del cromosoma Y (Jobling Tyler-Smith., 1995). La gran diversidad de los polimorfismos minisatélites MVR hace que sean una herramienta muy valiosa en la identificación genética, pero desgraciadamente presentan el inconveniente de no ofrecer buenos resultados cuando se trata de

analizar muestras de ADN muy degradado y por ello no son marcadores que se usen rutinariamente en muestras forenses o muestras antropológicas antiguas.

b) Polimorfismos microsatélite: la unidad de repetición o core consta de 2-7 nucleótidos y son más pequeños que los minisatélites pues cuentan con alelos de un tamaño aproximado de 80-400 pb. Así mismo, el número de repeticiones puede ser diferente entre los dos cromosomas homólogos de un mismo individuo (Edwards y cols., 1991). Según el número de pares de bases que presenten en la unidad repetitiva se clasifican en: dinucleótidos, con dos pb en cada core (son los más abundantes), trinucleótidos, con tres pb en cada core, tetranucleótidos, con cuatro pb en cada core, pentanucleótidos, con cinco, etc. Los dinucleótidos presentan el inconveniente de que cuando se analizan aparecen artefactos de amplificación minoritarios (llamados “*shadow bands*” o picos “*stutter*”) debidos al mecanismo de “*slippage*” (resbalamiento) de la enzima polimerasa (Hauge y Litt, 1993). Los STRs tetraméricos presentan este problema de manera mucho más atenuada y los artefactos de amplificación suelen ser bandas que se identifican fácilmente y que presentan una unidad de repetición menos que el alelo real. Como en el caso de los polimorfismos minisatélite, en los microsatélites también pueden existir microvariaciones en la secuencia de la unidad de repetición. Según este tipo de variaciones podemos clasificar los STRs en (Urquhart y cols., 1994):

1.- STRs simples: son polimorfismos que contienen repeticiones con unidades idénticas en longitud y secuencia. Tal es el caso del locus HUMFES/FPS cuyo núcleo de repetición es (ATTT)₈₋₁₄.

2.- STRs simples con alelos no consenso: se trata de STRs simples pero alguno de sus alelos presenta alguna unidad de repetición incompleta, como el locus HUMTH01 que presenta un alelo con una de sus unidades de repetición formada por tres pares de bases en vez de cuatro. Concretamente aparece una deleción de un residuo de Timina en la quinta unidad de repetición: (TCTA)₄-**(CTA)**₁-(TCTA)₅. La designación de alelos en este caso se realiza contando el número de unidades de repetición completas (nueve) seguido de un punto y el número de pares de bases que forman la repetición incompleta (9.3).

3.- STRs compuestos: son polimorfismos que comprenden dos o más tipos de unidades de repetición adyacentes, con diferente secuencia; por ejemplo el locus HUMGABRB15, con unidades de repetición del tipo (GATA), del tipo (GATC) y del tipo (TATC): (GATA)₅₋₁₂-(GATC)₂₋₄-(TATC)₁₋₂. La designación de alelos en este tipo de STRs es más complicada, pero en este caso consiste en la suma del número de repeticiones de cada tipo de núcleo, es decir, el número de repeticiones del tipo (NATM), pues los tres tipos de unidades de repetición poseen Adenina y Timina en las posiciones centrales de la unidad.

4.- STRs compuestos con alelos no consenso: son polimorfismos compuestos pero con alelos que presentan alguna unidad de repetición incompleta como el locus HUMVWAF31 que presenta dos deleciones (de un residuo de Citosina y otro de Timina) en una de sus unidades: (ATCT)₂-

(GTCT)₃₋₄-(ATCT)₉₋₁₃-(ATCT)₂-(GTCT)₄-(ATCT)₅-(**AT**)₁-(ATCT)₄. La designación de alelos en este caso se realiza contando las unidades de repetición del tipo (NTCT).

5.- **STRs complejos**: son polimorfismos que presentan varios bloques de repetición con unidades de longitud variable con otras secuencias intercaladas más o menos variables; por ejemplo el locus D21S11, que además de diferentes unidades de repetición del tipo tetranucleótido posee di, tri y hexanucleótidos menos variables y cuya estructura es: (TCTA)₄₋₆-(TCTG)₅₋₆-(TCTA)₃-(**TA**)₁-(TCTA)₃-(**TCA**)₁-(TCTA)₂-(TCCATA)₁-(TCTA)₈₋₁₆-(**TATCTA**)₀₋₁-TC. La nomenclatura aquí todavía se complica más pero se basa en el número de unidades de repetición del tipo (TCTN) incluyéndose el hexanucleótido final como si se tratara de un dinucleótido AT más un tetranucleótido TCTA como se indica en la tabla nº 5 (Möller y cols, 1994).

Alelo	Longitud en pb	Estructura de la secuencia
26	209	(TCTA) ₄ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₈
27	213	(TCTA) ₄ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₉
28	217	(TCTA) ₄ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₀
29	221	(TCTA) ₄ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₁
29	221	(TCTA) ₆ (TCTG) ₅ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₀
30	225	(TCTA) ₆ (TCTG) ₅ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₁
31	229	(TCTA) ₆ (TCTG) ₅ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₂
31	229	(TCTA) ₅ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₂
32	233	(TCTA) ₆ (TCTG) ₅ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₃
30.2	227	(TCTA) ₅ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₀ TA (TCTA)
31.2	231	(TCTA) ₅ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₁ TA (TCTA)
32.2	235	(TCTA) ₅ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₂ TA (TCTA)
33.2	239	(TCTA) ₅ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₃ TA (TCTA)
34.2	243	(TCTA) ₅ (TCTG) ₆ (TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA(TCTA) ₂ TCCATA(TCTA) ₁₄ TA (TCTA)

Tabla nº 5: Sistema HUMD21S11: alelos, tamaño en pares de bases y estructura de la secuencia.

Es importante puntualizar que revisando la literatura podemos encontrarnos que para un mismo locus del tipo STR simple aparecen descritas dos unidades de repetición diferentes. Por ejemplo, el locus TH01 podemos encontrárnoslo descrito como repeticiones del tipo (TCTA) o como repeticiones del tipo (AATG). Ambas son correctas pues se trata del mismo motivo de repetición eligiendo una hebra o la complementaria para describirlo así como un punto de inicio en la lectura del motivo de repetición diferente en una y otra hebra (Gill y cols., 1997). Sin embargo estas diferencias de nomenclatura pueden dar lugar a errores por lo que se ha hecho un esfuerzo para estandarizar además de la nomenclatura de los alelos, también la descripción de los distintos loci (Bär y cols., 1997).

La sensibilidad de estos marcadores que permite el análisis incluso en muestras de ADN degradado, la estabilidad, la facilidad de la determinación del tamaño de los alelos, la reproducibilidad y la posibilidad de realizar el análisis

de varios marcadores en un solo tubo evitándose así un gasto excesivo de ADN molde, de reactivos y de tiempo son algunos de los parámetros que han hecho que los STRs sean los polimorfismos elegidos por los laboratorios de identificación.

7.3.- POLIMORFISMOS DEL CROMOSOMA Y.

El cromosoma Y es el más corto de los cromosomas humanos (60 Mb) y en la especie humana sólo está presente en los varones, por lo que su herencia es paterna. Citológicamente, posee una región heterocromática y otra eucromática (ver Fig. nº 23). La primera está situada en la zona distal del brazo largo (Yq) y varía fenotípicamente en los varones normales desde tamaños virtualmente indetectables a longitudes de más de la mitad del cromosoma Y. Por el contrario, la región eucromática (30 Mb) tiene un tamaño constante en los varones normales y se localiza en el brazo corto (Yp), en el centrómero y en la zona proximal del brazo largo. La región eucromática está formada por cuatro tipos de secuencias (Hammer y Zegura, 1996):

- Bloques de secuencias que son homólogas al cromosoma X.
- Secuencias repetitivas del centrómero y sus alrededores.
- Familias de secuencias repetitivas específicas del cromosoma Y.
- Secuencias únicas específicas del cromosoma Y.

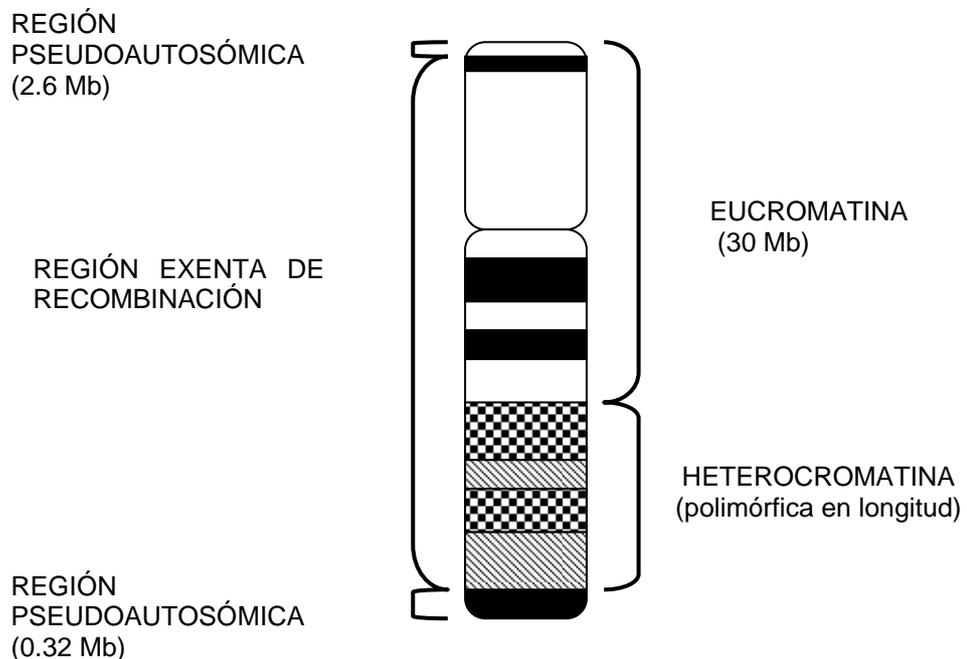


Figura nº 23: Idiograma de bandas g del cromosoma Y. La recombinación entre los cromosomas X e Y tiene lugar en las dos regiones pseudoautosómicas.

A pesar de que mucha bibliografía describe a este cromosoma como **haploide**, es decir, que no recombina con ningún otro durante la meiosis, esto no es del todo cierto. Los extremos finales del cromosoma Y tienen regiones que recombinan normalmente con el cromosoma X; a estas regiones se les denomina pseudoautosómicas y ocupan unas 2.7 Mb. Incluso existen hipótesis que apoyan que el cromosoma Y puede ser considerado como un cromosoma X degradado durante la evolución (Graves, 1995).

Por tanto, de forma parecida a lo que ocurre con el ADNmt, la parte no recombinante de los cromosomas "Ys" es transmitida de padres a hijos sin ningún cambio, a excepción de la acumulación gradual de mutaciones. Los haplotipos están confinados dentro de linajes, es decir, los hombres emparentados por vía paterna comparten el cromosoma Y. Esto permite reconstruir el historial de los linajes paternos mediante la comparación con los cromosomas Ys modernos, usando los polimorfismos. Así se pueden construir árboles filogenéticos que pueden aportar datos complementarios a los aportados por el ADNmt y los autosomas sobre la evolución humana (Jobling y Tyler-Smith, 1995).

El cromosoma Y contiene muchos polimorfismos y de muy diferentes tipos:

1.- Polimorfismos binarios. Se trata de marcadores bialélicos y comprenden dos tipos de polimorfismos:

1.1.- Las **sustituciones de bases o SNPs** (*single nucleotide polymorphism*): como ya hemos visto en la descripción general de polimorfismos se trata de mutaciones puntuales (Knijff y cols., 1998) y entre otros podemos destacar: SRY-2627, 92R7, M9, etc. Los SNPs parecen ser los marcadores del futuro por su fácil estudio a través de técnicas de biochips.

1.2.- **Inserciones y delecciones:** Como 12f2 o la inserción **YAP Alu** en DYS287, que presenta 2 alelos observados (según la ausencia o presencia del elemento Alu) denominados 455pb-YAP⁺ y 150pb-YAP⁻ (Hammer, 1994).

Ambos polimorfismos tienen tasas de mutación muy bajas (sobre 5×10^{-7} por sitio y por generación para las sustituciones de bases). Las sustituciones de bases son bastante útiles para distinguir entre los principales grupos poblacionales (Pestoni y cols., 1999), por lo que son los mejores marcadores para construir árboles de cromosomas Y.

2.- Polimorfismos minisatélite: MSY1. Este polimorfismo puede analizarse mediante MVR-PCR y presenta un elevado número de estructuras (code) variables (Jeffreys y cols., 1991). La diversidad observada en MSY1 sugiere una tasa de mutación de más del 1% por generación (Jobling y cols., 1997).

3.- Polimorfismos microsatélites: la búsqueda de microsatélites ha sido más exitosa que la búsqueda de minisatélites. Basándonos en la frecuencia de microsatélites en las librerías de cósmidos, un locus de repetición de trinucleótidos aparece cada 180 Kb en el genoma (Gaster y cols., 1995). Las 30 Mb del cromosoma Y deberían contener entonces unos 170 loci de este tipo.

Pero según Spurdle y Jenkins, (1992), los STRs en el cromosoma Y aparecen con menor frecuencia que en los autosomas (con una proporción de 1:4). Están presentes todos los tipos de STRs (Kayser y cols., 1997; White y cols., 1999; Ayub Y cols., 2000; Gusmao y cols., 2001): diméricos (DYS288, YCA-I, YCA-II, YCA-III), triméricos (DYS388, DYS392), tetraméricos (DYS19, DYS385, DYS389 I y II, DYS390, DYS391, DYS393, DYS437, DYS439, GATA A.7, GATA A10, GATA C4, GATA H4), pentaméricos (DXYS156Y también presente en cromosoma X, DYS438). Algunos de estos STRs presentan características especiales. Por ejemplo:

a) DYS389 I y II es un polimorfismo STR complejo que puede generar dos productos de amplificación de diferente tamaño (Jobling y Tyler-Smith, 1995; Cooper y cols., 1996). El análisis de su secuencia muestra que el sitio de unión al primer directo (*forward*) está duplicado en la misma hebra. De esta manera, el producto PCR de mayor tamaño (DYS389 II) incluye tres zonas (*stretches*) de repetición del tipo TCTG/TATC, mientras que el producto de menor tamaño sólo tiene dos. La diferencia de tamaño entre los alelos de los dos productos de PCR ronda las 100 pb, lo cual permite que se puedan asignar claramente los alelos a cada uno de los dos sistemas DYS389 I y DYS389 II.

b) YCA-I, YCA-II, YCA-III y DYS385 también muestran dos productos PCR después de la amplificación (**polimorfismos bilocales**). Lo más probable es que las secuencias de repetición estén duplicadas en el cromosoma Y con idénticas regiones flanqueantes, permitiendo la amplificación duplicada de alelos de longitud variable a partir de dos loci independientes con un único par de primers. Debido a que los tamaños de las dos regiones se solapan, el origen de los alelos de uno u otro locus no puede determinarse. Por ello, los alelos se designan reunidos en clases (pares) y no como alelos simples.

c) DYS392: La mayoría de los Y-STRs presenta una distribución de alelos en las poblaciones estudiadas unimodal y simétrica, es decir, suelen tener un único alelo de elevada frecuencia (unimodal) que suele corresponderse con uno de los alelos de tamaño medio (simétrica). Pero el caso de DYS392 es una excepción pues se trata de un **STR bimodal** que presenta dos alelos de máxima frecuencia en varias poblaciones estudiadas (Kayser y cols., 1997).

Los **microsatélites** del cromosoma Y son los polimorfismos más apropiados en el análisis de muestras de ADN degradado porque se tipan usando pequeños productos PCR. Sin embargo, la estructura del **minisatélite** MSY1 (largos clusters de unidades de repetición y alelos de 1.7-2.7 Kb) hace que los resultados obtenidos con muestras de ADN degradado sean bastante pobres. De cualquier manera, en los casos en los que la calidad del ADN no es un problema, la gran diversidad de MSY1 tiene la ventaja de ser más informativo que los haplotipos derivados de loci microsatélites. En definitiva, los polimorfismos STR específicos del cromosoma Y son los más apropiados para las muestras forenses por ser los más variables y de corta longitud. Recientemente se han seleccionado 7 STRs como marcadores ideales para el tipaje de muestras forenses en un estudio de varios laboratorios (Kayser y cols., 1997).

Por otra parte, las **sustituciones de bases (SNPs)** pueden ser útiles para diferenciar entre haplotipos idénticos de polimorfismos Y-STR y además proporcionarán información adicional importante en el campo antropológico. Y presentan la ventaja de que también pueden ser tipadas en ADN degradado mediante la elección de primers que amplifiquen una pequeña región que contenga el sitio polimórfico.

7.4.- POLIMORFISMOS EN EL ADN MITOCONDRIAL (ADNmt).

7.4.1.- Introducción.

Las células humanas contienen aproximadamente de 5 a 6 pgr de ADN, gran parte del cual es ADN nuclear. Sólo el 1% del total de ADN es ADN mitocondrial. Por tanto, las mitocondrias son orgánulos celulares con su propio material hereditario. Se trata de ADN circular de doble hebra con 16.569 pares de bases de longitud (ver Fig. nº 24) y contiene información para 22 ARNts mitocondriales diferentes, para 2 ARNrs y para 13 proteínas mitocondriales localizadas en la membrana interna, todas ellas participantes en los procesos de fosforilación oxidativa y cadena respiratoria (Attardi, 1987; Borst, 1972; Borst y Grivell, 1981). Su herencia es materna (Giles y cols., 1980) y no sufre recombinación, es decir todos los individuos emparentados vía materna compartirán el mismo ADNmt. Esta es una característica que ha servido para la comparación de miembros familiares no emparentados directamente pero que comparten un ancestro materno común, permitiendo así la identificación de cadáveres o el estudio de parentesco entre individuos vivos (Gill y cols., 1994; Holland y cols., 1995; entre otros). Sin embargo, hay autores que proponen la herencia también paterna (Gyllensten y cols., 1991), aunque con las técnicas utilizadas en genética forense (secuenciación directa) este tipo de herencia no aparece. Las razones para el tipo de herencia materna son dos fundamentalmente:

- **Numérica:** las cabezas de espermatozoides contienen sólo unas pocas copias de ADN mitocondrial comparadas con las miles de copias del óvulo (Chen y cols., 1995).
- Parece ser que existe un **mecanismo de reconocimiento específico** que puede eliminar las pocas mitocondrias parentales que se hayan podido introducir en el óvulo. Por ejemplo, cuando se introducen mitocondrias de espermatozoides humanos en un cultivo de células somáticas desprovisto de ADNmt, el 10-20% de las células contienen mitocondrias espermáticas funcionales inmediatamente tras la introducción, mientras que sólo una pequeña fracción de células ($1/10^5$) sobrevive más de 48 horas (Manfredi y cols., 1997). Por otro lado, cuando se introducen mitocondrias de células somáticas en un cultivo celular, se produce una rápida sustitución del ADNmt endógeno (King y Attardi, 1988). Esto indica la existencia de mecanismos que eliminan específicamente mitocondrias procedentes de espermatozoides pero no mitocondrias procedentes de células somáticas.

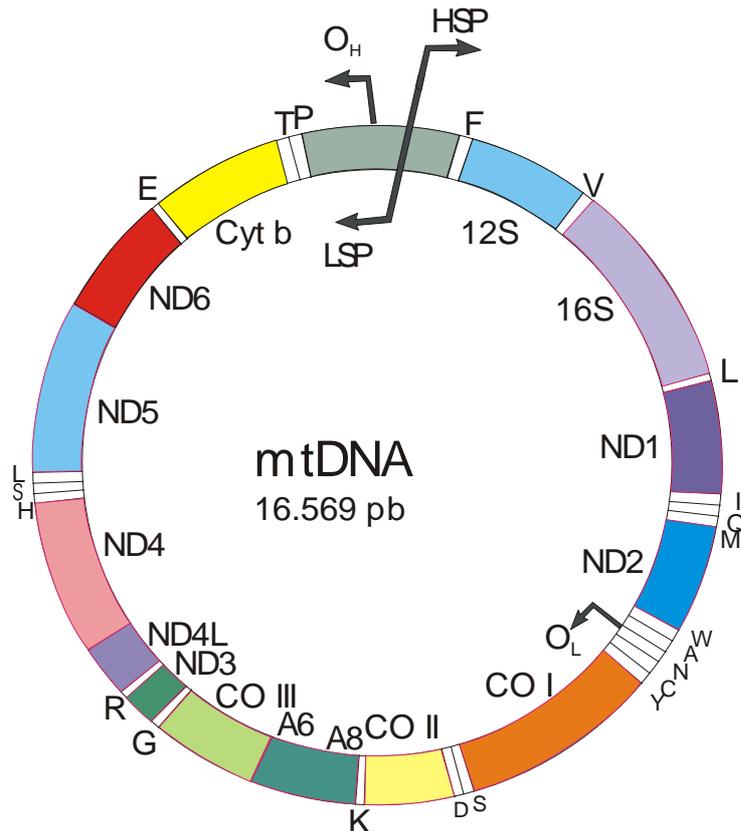


Figura nº 24: Mapa del genoma mitocondrial humano. Contiene genes para ARN ribosomal (12S y 16S), subunidades del complejo enzimático NADH-coenzimaQ-oxidoreductasa (ND), complejo citocromo c oxidasa (CO), citocromo b (Cyt b), ATP sintetasa (A) y 22 RNAs transferentes señalados en la parte exterior con la inicial del aminoácido que codifican. Las flechas muestran los orígenes de replicación de la hebra ligera (O_L) rica en pirimidinas y de la hebra pesada (O_H) rica en purinas, así como los promotores de la transcripción de las hebras ligera (LSP) y pesada (HSP).

El ADN mitocondrial tiene relación con diversas enfermedades y procesos degenerativos y se conoce con exactitud la secuencia de todos sus nucleótidos. Dicha secuencia fue publicada por 14 investigadores de Cambridge (Anderson y cols., 1981) y se le ha llamado "secuencia de referencia" o "secuencia de Anderson" (por ser éste el primer autor) o "CRS" (Cambridge Reference Sequence).

La molécula de ADN mitocondrial ha sido de gran ayuda para los antropólogos moleculares, pues a través de ella han aprendido más sobre filogenia y evolución (Cann, 1988; Salas y cols., 2000). Se ha utilizado para establecer el linaje de todos los humanos en África hace 200.000 años, para estudiar animales extinguidos (Thomas y cols., 1989), o para estudio de otros restos antiguos como huesos humanos de hace 5500 años (Hagelberg y cols., 1989).

En el campo forense, el ADNmt ha sido también de gran utilidad por presentar secuencias polimórficas y por presentarse en las células en mayor cantidad que el ADN nuclear (Rath y Merrill, 1989; Vigilant y cols., 1989; Budowle y cols., 1990; Sullivan y cols., 1991). El número de moléculas de ADNmt por

célula es difícil de determinar, pues depende del tipo celular y del momento funcional, pero como norma general las mitocondrias contienen de dos a diez copias de ADN por mitocondria. Además, el hecho de que el ADNmt sea circular es una razón para suponer una elevada estabilidad de la molécula contra las exonucleasas durante la degradación por putrefacción (Szibor y cols., 1997). Por otro lado, la puesta a punto de procedimientos automáticos para la secuenciación ha permitido que el análisis de secuencia sea una técnica rutinaria en muchos laboratorios (Hunkapiller y cols., 1991).

7.4.2.- Composición.

Por su composición bioquímica, las dos cadenas son diferentes, ya que en la secuencia nucleotídica de una prevalecen las bases púricas (A y G), por lo que es más pesada que su complementaria donde priman las bases pirimidínicas (C y T); en consecuencia, a la primera de las cadenas se le denomina **H** (*heavy*) y a la otra **L** (*light*).

Llama la atención la gran economía que presenta este ADN. Los genes tienen muy pocas o ningunas regiones no codificantes entre ellos. Los principales genes son: 12S del ARNr, 16S del ARNr, 22 ARNt, Subunidades I, II y III de la Citocromo C oxidasa, Subunidad VI de la ATPasa, Citocromo b y 8 genes codificantes de diversas proteínas.

La principal zona no codificante se denomina "asa de desdoblamiento" o "*D-loop*", y se trata de una región de 1,2 Kb situada entre los genes ARNt^{pro} y ARNt^{phe} que está implicada en los procesos de replicación de la cadena H. Las mutaciones se acumulan en esta zona con una frecuencia cinco veces mayor que en el resto del genoma mitocondrial. Dentro de esta región "*D-loop*" existen dos regiones especialmente hipervariables, denominándose región hipervariable 1 (HV1) a la flanqueada por el ARNt de la prolina, y región hipervariable 2 (HV2) a la flanqueada por el ARNt de la fenilalanina. Como pauta habitual utilizada en la actualidad en algunos laboratorios, en la región hipervariable 1 (HV1) se estudian del nucleótido 16.024 al 16.365, y en la región HV2, del 73 al 340 (Wilson y cols., 1995b).

Lutz y cols. (1997) han descrito una tercera región hipervariable localizada entre los nucleótidos 438 a 574, llamada HV3, con 25 sitios polimórficos en 137 pb (18%) frente a los 88 sitios en 342 pb de HV1 (26%) y los 65 sitios polimórficos en 268 pb de HV2 (24%).

7.4.3.- Polimorfismos.

Se ha podido demostrar que en este tipo de ADN se acumula un nº de mutaciones superior a las que se acumulan en el ADN genómico. Este hecho se explica por cuatro mecanismos distintos que intervienen paralelamente:

- El material genético mitocondrial está especialmente expuesto a la acción de moléculas reactivas en general (recordemos los procesos de oxidoreducción que acontecen en el interior de las mitocondrias).

- El ADNmt carece del efecto protector que las histonas otorgan al ADN nuclear.
- Los mecanismos reparadores del ADN mitocondrial son menos efectivos que los del ADN nuclear (Yakes y Van Houten, 1997).
- La baja fidelidad de la ADN polimerasa mitocondrial (Kunkel y Loeb, 1981)

Esta elevada mutabilidad ha permitido la diferenciación entre especies muy relacionadas (Tamura y Nei, 1993) así como la comparación entre poblaciones dentro de la misma especie (Budowle y cols., 1999).

Como hemos visto, dentro de toda la molécula de ADN mitocondrial, las mutaciones se acumulan en el “*D-Loop*”, y por eso esta región es la más polimórfica. Existen principalmente dos tipos de polimorfismos en esta región:

a) **Polimorfismos de secuencia:** estos polimorfismos se deben a las mutaciones que pueden ser bien sustituciones de nucleótidos, inserciones o deleciones. Como hemos visto en apartados anteriores, si la sustitución consiste en el cambio de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina se denomina transición y si se trata de un cambio de una purina por una pirimidina o una pirimidina por una purina se denomina transversión. En la población caucásica son mucho más frecuentes las transiciones que las transversiones (ver Fig. nº 25).

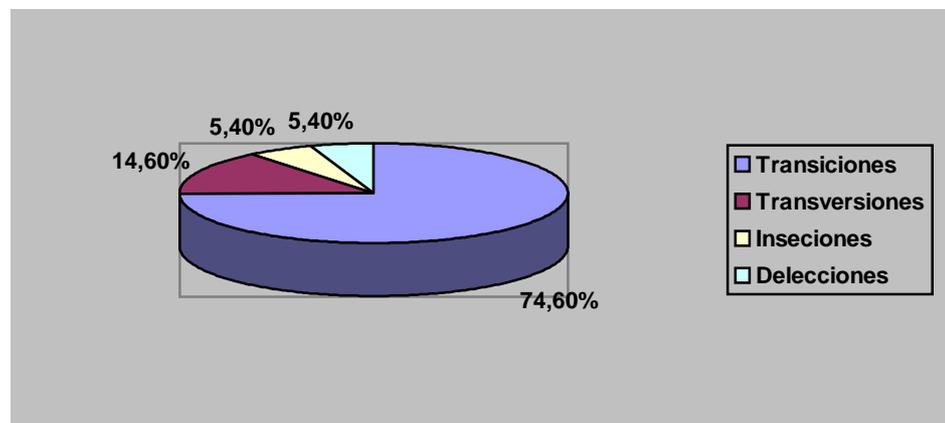


Figura nº 25.- Tipos de polimorfismos de secuencia en el ADN mitocondrial. El tipo más frecuente es la transición que consiste en el cambio de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina.

La publicación en 1981 de la llamada secuencia de referencia o de Anderson permite usar la misma como secuencia común sobre la que los resultados aparecerían reflejados como variaciones, según propone Mark Wilson (Wilson y cols., 1993). La nomenclatura a seguir consiste en reflejar las diferencias de la muestra secuenciada con la secuencia de referencia. Así las sustituciones se nombran indicando la posición y la base nueva (Ej.: 16.293-G), las inserciones indicando la posición anterior a la inserción seguida del número

de bases insertadas y de las bases nuevas (Ej.: 309.1-C) y las deleciones indicando el número del nucleótido perdido precedido de la letra D (Ej.: D312).

b) **Polimorfismos de repetición:** existe un polimorfismo microsatélite del tipo dinucleótido situado a partir de la base nº 514 del “*D-Loop*” (nº de acceso en la base de datos EMBL = V00662; EMBL DNA DATABASE: <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>). El núcleo o core está formado por la secuencia (AC)_n y se han descrito cuatro alelos con una distribución de frecuencias alélicas muy heterogénea, lo que implica un poder de discriminación muy bajo que limita su utilidad forense (Bodenteich y cols., 1992). En los primeros estudios de este STR se definieron 4 alelos diferentes con 4, 5, 6 y 7 unidades de repetición (Bodenteich y cols., 1992), pero actualmente se ha descrito un alelo con 3 “repeats” (Szibor y cols., 1997) y otro con 8 repeticiones (Montesino y cols., 2000). La distribución de las frecuencias alélicas varía según las poblaciones:

- Las poblaciones Caucasoides muestran elevada frecuencia del alelo 5, mientras que el 7 es raro.
- Las poblaciones africanas muestran una elevada frecuencia del alelo 4 (0.543) mientras que los alelos 6 y 7 no están representados. En estas poblaciones además aparecen individuos que presentan el alelo 3 (2 individuos de 105) (Szibor y cols., 1997).

Cabe destacar la presencia de zonas de policitosina (“poly-C stretches”) tanto en HV1 como en HV2 y HV3: en HV1 se extiende desde el nucleótido 16184 al 16193 y está interrumpida por una T en 16189; en HV2 se extiende desde el nucleótido 303 al 315 y está interrumpida por otra T en 310; en HV3 se extiende desde el nucleótido 568 al 573 y no contiene interrupciones (6 Cs, +2C-6C). Cuando se produce una transición de T a C en dichos “stretches” se genera un segmento de 10 Cs seguidas en HV1; estas zonas son a menudo difíciles de interpretar porque este hecho suele ir asociado a la presencia de distintos mitotipos en el mismo individuo en cuanto al número de residuos de C (Bendall y Sykes, 1995). Dicho fenómeno conocido como heteroplasmia (ver más adelante) produce un desfase en la lectura por parte de la polimerasa durante la reacción de secuenciación, por lo que el desciframiento de la secuencia se hace realmente difícil.

Con el transcurso del tiempo, las mutaciones se van produciendo y se van perpetuando en diversas personas, por lo que incluso individuos que proceden de una misma línea materna, y que por tanto debían tener el mismo ADNmt, aparecerán diferentes.

Se han definido casos de heterogeneidad de ADNmt en un mismo individuo; se trata de los llamados heteroplásmidos, en los cuales aparece una mezcla de ADNmt “mutante” y ADNmt “salvaje” o incluso más de dos tipos de ADNmt en un mismo individuo. Hasta hace poco tiempo se pensaba que en la región control no era muy común este tipo de fenómeno (Gill y cols., 1994; Bendall y cols., 1996), pero estudios recientes están demostrando que la heteroplasmia en esta región es más habitual de lo que se esperaba (Hühne y cols., 1999a). Se sospecha que la heteroplasmia es una situación intermedia en

la transición desde una secuencia homoplásmica (una única secuencia de ADNmt en un individuo) hasta otra.

La condición heteroplásmica en un individuo puede presentarse de tres maneras (ver Fig. nº 26):

- Unas células contienen genomas mitocondriales homoplásmicos de un tipo y otras células contienen genomas mitocondriales homoplásmicos de otro tipo.
- Cada célula porta dos mitotipos diferentes pero cada mitocondria es homoplásmica.
- Cada mitocondria individual es heteroplásmica.

Atendiendo al tipo de mutación también podemos clasificar las heteroplasmas de la siguiente manera (ver fig. nº 27, nº 28 y nº 29):

- **Heteroplasmas de secuencia:** corresponden a sustituciones nucleotídicas y aparecen cuando en una posición concreta del ADNmt se presentan secuencias con un nucleótido y secuencias con otro nucleótido distinto.
- **Heteroplasmas de longitud:** corresponden a inserciones o deleciones de nucleótidos y aparecen cuando en un individuo algunas copias de su ADNmt existe una deleción o inserción de uno o más nucleótidos y en otras copias no aparece tal mutación.
- **Heteroplasmas de secuencia y longitud:** cuando ocurren los dos mecanismos anteriormente descritos al mismo tiempo en un mismo individuo.

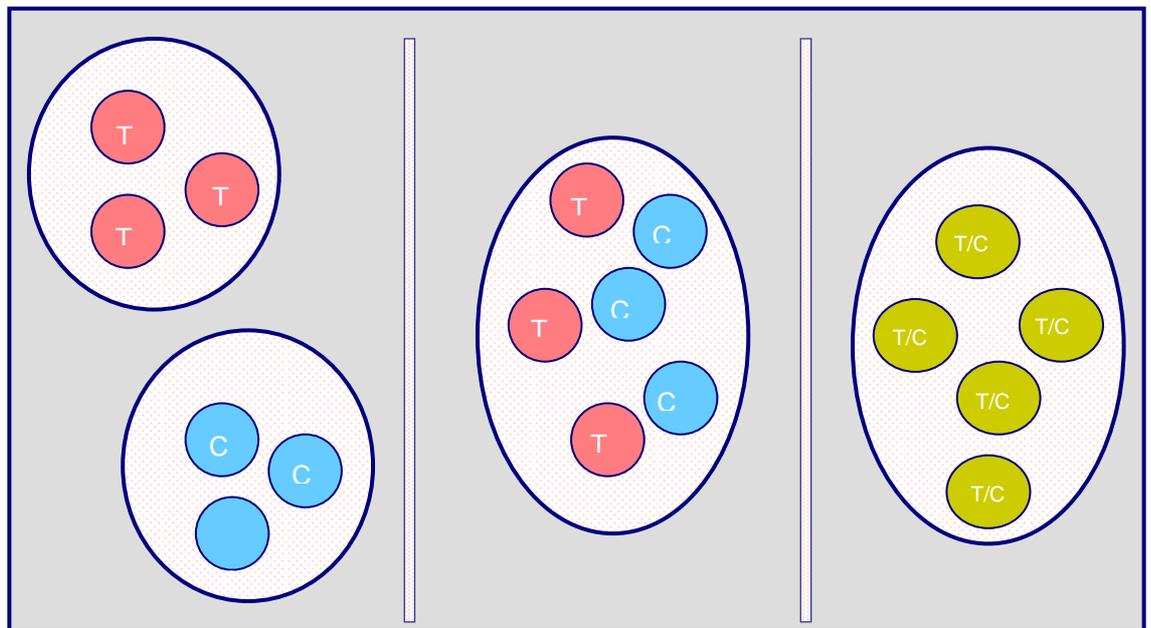


Figura nº 26: Diferentes tipos de heteroplasmas según localización: Izda.: Células con un mitotipo y células con otro mitotipo distinto; Centro: misma célula que contiene mitocondrias con un mitotipo y mitocondrias con otro mitotipo distinto; Drcha.: dentro de cada mitocondria hay dos mitotipos distintos.

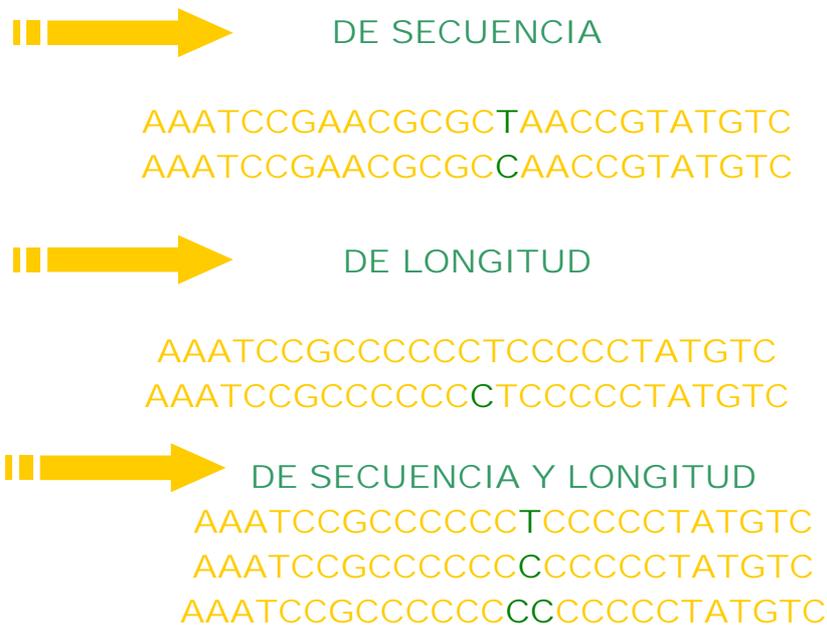


Figura nº 27: Tipos de heteroplasma: de secuencia (dos tipos de moléculas que se diferencian en la secuencia), de longitud (dos tipos de secuencia que se diferencian en su longitud) y de secuencia y longitud simultáneamente (tres tipos de moléculas que se diferencian en la secuencia y en la longitud).

Como era de esperar, se ha demostrado que, a diferencia de las regiones no codificantes, en las regiones codificantes del ADNmt no se detecta variabilidad heteroplásmica (Jazin y cols., 1996). También se han descrito variaciones en los niveles de heteroplasma dentro del D-Loop a dos niveles: (i) a nivel interindividual se observan variaciones de unos individuos a otros de una misma familia incluidos gemelos idénticos (Veltri y cols, 1990; Bendall y cols., 1996; Parsons y cols., 1998); (ii) a nivel intraindividual se han observado variaciones de unos tejidos a otros (Sullivan y cols, 1997), o en diferentes zonas de un mismo tejido (Hühne y cols., 1999b; Salas y cols., 2001). También existe variedad dentro del D-Loop, pues no todas las posiciones nucleotídicas tienen la misma propensión a ser heteroplásmicas, por ejemplo las posiciones 16093 y 16129 de HV1 son “hot spots” heteroplásmicos (Holland y Parsons, 1999). Además se puede observar una correlación entre los nucleótidos en donde se presenta la heteroplasma y los nucleótidos en los que se acumulan las diferencias entre individuos de la población humana a lo largo del tiempo de evolución (Jazin y cols., 1996). Esto hace pensar que tanto la heteroplasma como el polimorfismo poblacional tienen el mismo origen, es decir, la sustitución de bases en posiciones particulares de las moléculas de ADNmt.

7.5.1.2.- POLYMARKER:

La casa comercial Perkin Elmer Cetus (USA) ha desarrollado un kit, llamado "Amplitype® PM PCR amplification and typing kit", para amplificar y fenotipar de una sola vez cinco marcadores genéticos polimórficos en cuanto a su secuencia. Dichos marcadores son: LDLR (Receptor de lipoproteínas de baja densidad), de 214 pb, GYPA (Glicoforina A), de 190 pb, HBGG (Gamma-hemoglobina G), de 172 pb, D7S8 de 151 pb y Globulina Gc (Componente específico de grupo), de 138 pb. Todos ellos son polimorfismos de secuencia.

Además de estos cinco marcadores, también se incluyen en el kit los cebadores necesarios para amplificar un sexto marcador, el DQA1 perteneciente al sistema HLA. Pero el kit no incluye lo necesario para poder fenotiparlo.

El **LDLR** es un receptor que se une a la mayor parte de las proteínas transportadoras de colesterol en plasma humano, entre ellas la proteína LDL. Dichas proteínas penetran en el interior de la célula mediante endocitosis y se metabolizan liberando el colesterol que será usado por la célula para la síntesis de hormonas esteroideas, de membranas y de ácidos biliares. La cantidad de colesterol libre a nivel intracelular regula la expresión del receptor LDLR en la superficie celular de manera que elevadas cantidades de colesterol intracelular inhiben su expresión y las bajas cantidades la activan. El ADN que codifica la formación del LDLR se encuentra situado en el cromosoma número 19 y existen dos formas polimórficas con frecuencias parecidas en la población española (Rodríguez-Calvo y cols., 1996): una denominada alelo A con frecuencia 0.439 y la otra alelo B con frecuencia 0.561.

La **GLICOFORINA A** es una sialoproteína que se encuentra en la membrana de los eritrocitos (Siebert y Fukuda, 1986). Se trata por tanto de un antígeno de membrana, concretamente el clásico sistema eritrocitario MN que antiguamente se fenotipaba mediante aglutinación con anticuerpos.

El locus genético de **GYPA** se encuentra en el cromosoma 4 y presenta dos alelos en la población española llamados A y B (correspondientes a M y N). Las frecuencias de aparición de dichos alelos en dicha población están muy repartidas: 0.508 para el alelo A y 0.492 para el alelo B (Rodríguez-Calvo y cols., 1996).

La **HBGG** es una proteína embrionaria que aparece hacia el segundo o tercer mes de la vida fetal y desaparece después del nacimiento, pero el fragmento de ADN que la codifica permanece por supuesto durante toda la vida (Slightom y cols., 1980). El locus polimórfico de la HBGG se encuentra en el cromosoma 11 y presenta tres alelos denominados alelo A, alelo B y alelo C, de los cuales el A y el B son muy frecuentes en la población española (0.477 y 0.519 respectivamente) y el C es muy poco frecuente (0.004) (Rodríguez-Calvo y cols., 1996).

El locus **D7S8** es un fragmento de ADN que no forma parte de la codificación de ninguna proteína, simplemente fue identificado mediante enzimas de restricción durante la búsqueda de RFLPs, polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (Bartels y cols., 1986). Se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 (banda 7q31-7q31). Presenta dos variantes alélicas en la población española con frecuencias similares (0.576 y 0.424) (Rodríguez-Calvo y cols., 1996).

La **globulina Gc** es una proteína que se une a la vitamina D en el plasma y cuyo gen codificador fue secuenciado por Yang y cols. en 1985. El locus se encuentra en el brazo largo del cromosoma 4 y presenta fundamentalmente tres alelos denominados A, B y C con frecuencias en la población española de 0.277, 0.155 y 0.568, respectivamente (Rodríguez-Calvo y cols., 1996). Hace algunos años esta proteína se fenotipaba en los laboratorios de analítica forense mediante isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida. Los alelos en este caso se denominaban 2 (que se corresponde con el alelo A), 1F (correspondiente al alelo B) y 1S (correspondiente al alelo C). Además de estos tres alelos, por medio del isoelectroenfoque era posible detectar otras variantes de distinta movilidad electroforética a las tres descritas.

7.5.1.3.- AMELOGENINA

(accesión GDB: G00-119-676; The Genome Database: <http://gdbwww.gdb.org/>): Un fragmento de este gen es uno de los marcadores más utilizados en Biología Forense para el diagnóstico de sexo. En el caso de los varones se observan dos bandas de ADN, una perteneciente al cromosoma Y de 112 pares de bases de longitud y otra perteneciente al cromosoma X de 106 pares de bases de longitud. En el caso de las mujeres solo aparecen la banda de 106 pares de bases de longitud (Sullivan y cols., 1993).

7.5.2.- VNTRs.

7.5.2.1.- D1S80

(accession: 178639. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank) (“accesión ID”: 178639. The Genome Database: <http://gdbwww.gdb.org/>): Se trata de locus minisatélite polimórfico situado en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36-1p35) y reconocido por la sonda pMCT118 (Nakamura y cols., 1987, 1988). La unidad de repetición posee una longitud de 16 pares de bases y se han descrito multitud de alelos que incluyen de 14 a 41 repeticiones del core e incluso algún alelo fuera de este rango con 52-55 unidades de repetición (Kádasi y Bohusová, 1995). También se han encontrado microvariaciones en los alelos debidas a variaciones en la secuencia de la unidad de repetición o pequeñas diferencias en el tamaño de los alelos (interalelos) (Skowasch y cols. 1992; Alonso y cols., 1993; Huang y cols. 1994; Harashima y cols., 1997). Kasai (Kasai y cols., 1990) publicaron las secuencias de los “primers” y las condiciones de reacción para un análisis efectivo y rápido de este polimorfismo mediante PCR. Existen múltiples publicaciones sobre la distribución de sus alelos en un gran número de grupos poblacionales y puede observarse que en todas ellas es un sistema muy polimórfico, con elevado índice de heterocigosidad y alto valor de poder de discriminación (Alonso y cols., 1993; Sugiyama y cols., 1993; Huang y cols., 1994; Budowle y cols., 1995; Sepulchre y cols., 1995).

7.5.3.- STRs.

7.5.3.1.- HUMTH01

denominado también TC11 (accession: D00269. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Edwards y cols., 1991; Wiegand y cols., 1993). Está localizado en el intrón 1 del gen de la enzima tirosín-hidroxilasa humana, dentro del cromosoma 11 (banda 11p15-p15.5). El núcleo de repetición es (AATG)_n y en la mayoría de las poblaciones caucasoides posee 7 alelos comunes (5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10) aunque se han descrito otros alelos (3, 8.3, 10.3, 11, 12 y 13.3). Algunos presentan una microvariación en longitud (8.3, 9.3, 10.3 y 13.3) como ya vimos en el apartado de polimorfismos STR de la parte teórica de este trabajo.

7.5.3.2.- HUMTPOX

denominado también hTPO (accession: M68651. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Edwards y cols., 1991; Anker y cols., 1992) que está localizado en el intrón 10 del gen de la tiro-peroxidasa dentro del cromosoma 2 (banda 2p23-2pter). La unidad de repetición es (AATG)_n y se han descrito nueve alelos que incluyen de 6 a 14 repeticiones.

7.5.3.3.- HUMCSF1PO

denominado también CSF (accession: X14720. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de otro polimorfismo STR simple con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Hammond y Caskey, 1992; Puers y cols., 1993). Está localizado en el proto-oncogen c-fms para el gen del receptor CSF-1, dentro del cromosoma 5 (banda 5q33.3-34). La unidad de repetición es (AGAT)_n y se han descrito 11 alelos (6, 7, 8, 9, 10, 10.3, 11, 12, 13, 14 y 15) (Puers y cols., 1993).

7.5.3.D.- HUMVWA

también denominado vWF y VWA31A (accession: M25858. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR compuesto con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Kimpton y cols., 1992; Möller y cols., 1994). Está localizado en gen del factor von Willebrand, dentro del cromosoma 12 (banda 12p12-pter). La unidad de repetición es (TCTA) con inserciones (TCTG) y (TCCA) y presenta 18 alelos algunos de ellos de igual longitud pero diferente secuencia y un alelo con microvariación en longitud (11, 12, dos alelos 13, dos alelos 14, dos alelos 15, 15.2, dos alelos 16, 17, dos alelos 18, 19, 20, 21 y 22).

7.5.3.E.- HUMF13A1

denominado también FXIII A01 (accession: M21986. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido con alelos no-consenso (Polymeropoulos cols., 1991a). Está localizado en el gen de la subunidad a del factor XIII de la coagulación, dentro del cromosoma 6 (banda 6p24.3-p25.1). La unidad de

repetición es (AAAG)_n y presenta 16 alelos (3, 3.2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17).

7.5.3.F.- HUMFES/FPS

también denominado FES (accession: X06292. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Polymeropoulos cols., 1991b; Möller y cols., 1994). Se encuentra localizado en el proto-oncogen humano c-fes/fps, dentro del cromosoma 15 (banda 15q25-qter). La unidad de repetición es (ATTT)_n y presenta 9 alelos con 7 a 15 repeticiones (alelos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15). Se han descrito microvariaciones de secuencia en la región que flanquea al polimorfismo en sí, concretamente una transversión de A a C en los alelos 7, 10, 11, 12 y 13 (a estos nuevos alelos se les ha denominado 7a, 10a, 11a, 12a y 13 a) (Moller y cols., 1994; Barber y cols., 1995a).

7.5.3.G.- D3S1358

(accesión GDB: 196594; The Genome Database: <http://gdbwww.gdb.org/>): Se trata de un STR compuesto con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Li y cols., 1993). Está localizado en el cromosoma 3 (brazo 3p). La estructura de la unidad de repetición es (TCTG)_n (TCTA)_n y presenta 13 alelos con microvariaciones de longitud (9, 11, 12, 13, 14, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 18, 19 y 20).

7.5.3.H.- HUMFGA

también denominado FIBRA (accession: M64982. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR complejo con alelos no-consenso del tipo tetranucleótido (Mills y cols., 1992; Barber y cols., 1996; Rolf y cols., 1997). Está localizado en el tercer intrón del gen del alfa-fibrinógeno, dentro del cromosoma 4 (banda 4q28). La estructura de la repetición es (TTTC)₃TTTTTTCT(CTTT)_nCTCC(TTCC)₂ y presenta 32 alelos con múltiples microvariaciones de longitud (15, 16, 16.2, 17, 18, 18.2, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 22.3, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26, 26.2, 27, 27.2, 28, 28.2, 29, 30, 30.2, 34.2 y 46.2).

7.5.3.I.- D8S1179

(accession: G08710. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Sheffield y cols., 1995; Barber y Parkin, 1995). Está localizado en el cromosoma 8. La unidad de repetición es (TATC)_n y presenta 12 alelos con 8 a 19 repeticiones.

7.5.3.J.- D21S11

(accession: M84567. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR complejo del tipo tetranucleótido con alelos no-consenso (Sharma y Litt, 1992; Möller y cols., 1994). Está localizado en el cromosoma 21. La estructura tetranucleotídica de la unidad de repetición es (TCTA)_n(TCTG)_n y está combinada con el dinucleótido TA, el trinucleótido TCA y el hexanucleótido TCCATA, los tres invariables. Presenta 26 alelos pero al tratarse de un

polimorfismo complejo, la designación de los mismos es más problemática que para los STR simples, pues cada alelo tiene unidades de repetición del tipo di-, tri-, tetra- y hexanucleótidos característicos. Existen fundamentalmente dos tipos de denominaciones: (i) Urquhart (Urquhart y cols., 1994) decide nombrar los alelos mediante el número de dinucleótidos del tipo TV (donde V puede ser A, C o G) y (ii) Moller (Moller y cols., 1994) nombra los alelos mediante su número de repeticiones, teniendo en cuenta las microvariaciones de longitud.

7.5.3.K.- D18S51

(accession: X91254 y L18333. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido con alelos no-consenso (Barber y Parkin, 1995). Se encuentra localizado en el cromosoma 18 (banda 18q21.3). La unidad de repetición es (AGAA)_n y presenta 21 alelos, algunos de ellos con microvariación de longitud (8, 9, 10, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 17, 17.2, 18, 19, 19.2, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27)

7.5.3.L.- D13S317

también denominado D13 (accession: G09017. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Lins y cols., 1997; Jin y cols., 1997). Está localizado en el cromosoma 13 (banda 13q22-q31). La unidad de repetición es (TATC)_n y presenta 9 alelos con 7 a 15 repeticiones.

7.5.3.M.- D5S818

también denominado D5 (accession: G08446. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Lins y cols., 1997; Jin y cols., 1997). Está localizado en el cromosoma 5 (banda 5q21-q31). La unidad de repetición es (AGAT)_n y presenta 9 alelos con 7 a 15 repeticiones.

7.5.3.N.- D7S820

también denominado D7 (accession: G08616 y G20012. GenBank: http://www2.ncbi.nlm.gov/cgi_bin/genbank): Se trata de un polimorfismo STR simple del tipo tetranucleótido (Bouffard y cols., 1997; Jin y cols., 1997; Lins y cols., 1997). Está localizado en el cromosoma 7 (banda 7q11.21-q22). La unidad de repetición es (GATA)_n y presenta 9 alelos con 6 a 14 repeticiones.

8.- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE ADN.

8.1.- INTRODUCCIÓN.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN tras la PCR, ¿cómo pueden separarse unos de otros, y purificar para poder trabajar con ellos individualmente?. Existen hoy en día múltiples técnicas para analizar fragmentos de PCR pero elegiremos una u otra fundamentalmente dependiendo del tipo de polimorfismo que queramos estudiar. En líneas generales podemos distinguir:

- Técnicas que nos separen los fragmentos de ADN según peso molecular: se usan principalmente para analizar polimorfismos de longitud, pues sólo con detectar el tamaño de las moléculas de ADN amplificadas de cada muestra podremos diferenciar unas de otras. Las más habituales son la electroforesis convencional con distintos tipos de geles y de sistemas de detección y la electroforesis capilar y variantes de la misma. Estas técnicas las describiremos más detenidamente en apartados posteriores.
- Técnicas que separen los fragmentos de ADN según su secuencia de nucleótidos: se usan para analizar polimorfismos de secuencia, pues en este caso interesa conocer parcial o totalmente el orden de nucleótidos de los fragmentos amplificados para poder diferenciarlos. Las más habituales son la hibridación con sondas de ADN conocido (con infinidad de variantes) y la secuenciación completa del fragmento ADN, que a su vez implica una separación electroforética.

El uso de unas técnicas no implica la exclusión de las otras pues en numerosos casos se ha utilizado una combinación de ambos tipos para revelar los polimorfismos de ADN.

8.2.- ELECTROFORESIS

8.2.1. Electroforesis convencional.

Los polimorfismos de longitud dan lugar a alelos que difieren en su tamaño. Una vez que hemos extraído, cuantificado y amplificado una región polimórfica en longitud, nos interesa separar los fragmentos de ADN obtenidos para poder identificarlos mediante comparación con otros fragmentos de tamaño previamente conocido. Los fragmentos de ácidos nucleicos de diferente tamaño pueden separarse mediante electroforesis a través de un medio semi-sólido como son los geles de agarosa o de poliacrilamida. La técnica se basa en que el ADN está cargado negativamente y al someterlo a una diferencia de potencial se moverá hacia el ánodo a través del gel una distancia proporcional a su tamaño, alcanzando mayor distancia las moléculas de menor peso. Además del tamaño, la movilidad de una molécula de ácido nucleico depende de la porosidad del gel, de la conformación del propio ácido nucleico, de la corriente aplicada al gel, del tampón utilizado en la formación del gel y del utilizado para el paso de corriente durante el proceso, de la composición de

bases de la molécula y de la temperatura a la que transcurre la electroforesis (temperatura de migración). En general se consigue una buena correlación entre el logaritmo del tamaño y el logaritmo de la movilidad relativa, pero ha de tenerse en cuenta que la movilidad de las moléculas de ADN en el gel depende de la forma de las mismas (circular, lineal), por lo que sólo pueden ser comparadas movilidades de moléculas de la misma forma y los patrones deben ser elegidos de acuerdo con las moléculas cuyo tamaño se quiere determinar. El tamaño del gel también es un parámetro a tener en cuenta pues, como norma general, cuanto más largo sea, más capacidad de separación tendrá y por ello los geles más grandes son los que se suelen utilizar para separar moléculas que difieran sólo en un par de bases (Ej.: secuenciación).

En un solo gel se pueden procesar varias muestras a la vez simplemente realizando una fila de pocillos al mismo nivel y depositando en cada pocillo una muestra, de manera que cada una disponga de una “calle” para poder moverse sin interferir con las otras muestras. En cada calle, además, se pueden separar varios loci si éstos presentan distintos rangos de tamaño para sus alelos (ver fig. nº 30).

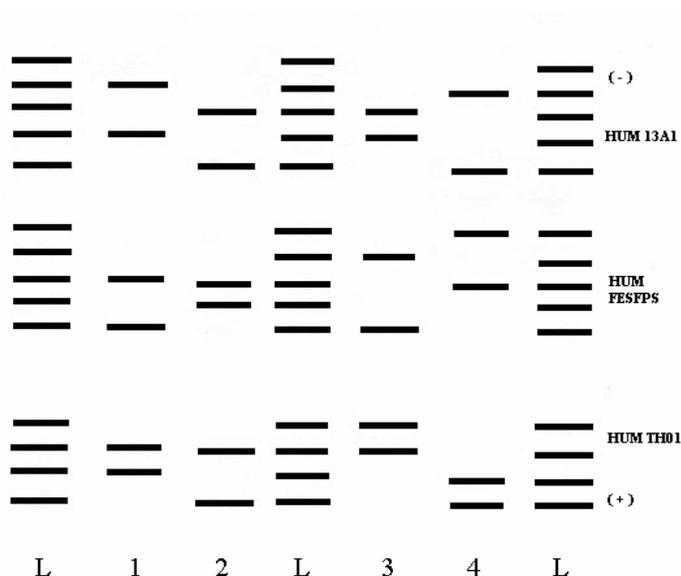


Figura nº 30: Patrones de bandas obtenidos mediante electroforesis convencional tras una PCR simultánea de tres STR: Loci HUM 13A, HUM FESFPS, HUM TH0, L= Ladder alélico.)

Debido a la variabilidad de las condiciones de un experimento a otro, es necesario introducir patrones de tamaño conocido en cada gel para poder determinar el tamaño del ADN problema. Para los polimorfismos de longitud se suelen procesar en paralelo las llamadas escaleras alélicas (ladders), que son mezclas artificiales de productos amplificados procedentes de distintos individuos polimórficos entre sí con el fin de obtener la mayoría de los alelos de un locus juntos. El “ladder” suele cargarse varias veces en el gel para poder realizar una comparación más adecuada con las muestras problema (ver fig. nº

30). Actualmente existen multitud de “ladders” comerciales para diferentes loci pero también se pueden fabricar en el laboratorio con el inconveniente de que se trata de una ardua tarea ya que es requisito indispensable la secuenciación de cada alelo antes de realizar la mezcla.

Como hemos apuntado anteriormente, el soporte en el cual se realiza la electroforesis puede ser de dos tipos según el grado de resolución requerido en la separación:

- En geles de agarosa: la agarosa es un polisacárido natural que se obtiene principalmente a partir de algas marinas capaz de gelificarse con la suficiente rigidez para poder ser manipulada. Pueden prepararse geles a varias concentraciones, desde 0.3% a 2% según el tamaño de los fragmentos de ADN a separar (ver tabla nº 6), teniendo en cuenta que a mayor concentración, el diámetro del poro del gel será menor y por ello presentará mayor resistencia al avance de la muestra de ADN. Convencionalmente se han descrito como geles que se pueden usar para separar fragmentos de 100-6000 pares de bases pero no son muy resolutivos, es decir, no sirven para separar fragmentos que difieran en unas cuantas pares de bases entre sí. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que un pequeño gel de agarosa (10 cm de longitud y 1mm de espesor) puede tener un poder de resolución suficiente para separar STRs del tipo tetranucleótidos (White y Kusukawa, 1997). Para poder ver los fragmentos de ADN separados en este tipo de geles suele utilizarse la tinción con Bromuro de Etidio y posterior observación del gel bajo la luz U.V. Se trata de una sustancia que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y produce fluorescencia bajo este tipo de luz.

Concentración de agarosa	Tamaño del ADN a separar (Kb)
0.3 %	60-5
1%	7-0,5
2%	3-0.1

Tabla nº 6: Rango de concentraciones de agarosa habitualmente usadas para separar los fragmentos de ADN según su tamaño.

- En geles de poliacrilamida (PAGE): se usan para separar fragmentos de menos de 500 pb que difieran poco en tamaño los unos de los otros. El gel se prepara mediante la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida (o piperacina) para formar poliacrilamida; las propiedades físicas y el tamaño de poro del gel se controlan mediante la proporción de poliacrilamida en el gel y su grado de entrecruzamiento. Se trata de geles mucho más resolutivos y su poder de resolución depende sobre todo de la concentración de poliacrilamida; por ejemplo, los geles al 6% pueden separar perfectamente fragmentos que difieran de 4 a 20 pb y los geles al 12% pueden separar incluso fragmentos que difieran en un único par de bases. Estos geles pueden visualizarse con Bromuro de Etidio bajo la luz ultravioleta, mediante tinción convencional con Nitrato de Plata (Bassam y cols., 1991) o mediante marcaje fluorescente (Mansfield y cols., 1993). Existen muchos caminos para marcar de forma

fluorescente los fragmentos de ADN, pero el más común es la incorporación del marcador fluorescente en el extremo 5' de uno de los primers (bien el forward o bien el reverse) durante la PCR, de forma que las copias nuevas de ADN estarán marcadas en una de sus hebras. Para visualizar el marcaje se suelen utilizar sistemas automatizados como el ABI 377 (Perkin Elmer, USA), que examina el gel durante la electroforesis con un láser. Si la PCR que hemos desarrollado es un multiplex de varios loci amplificados a la vez, con la tinción de plata necesariamente los loci amplificados han de tener rangos de tamaño diferentes entre sí para poder discriminarlos en un único gel. Si por el contrario el marcaje es fluorescente esta condición no es necesaria pues podemos marcar con fluorocromos de diferente color los loci que tengan el mismo rango de tamaño para poder diferenciarlos. Por este motivo, la detección fluorescente permite el desarrollo de reacciones multiplex de mayor número de loci que la detección con plata, ya que en la primera podemos diferenciar los fragmentos por tamaño y color de marcaje y con la segunda sólo diferenciaremos por tamaño.

La electroforesis en estos geles de poliacrilamida puede desarrollarse en condiciones nativas (no desnaturalizantes) o en condiciones desnaturalizantes (Robertson, 1994). Con las primeras condiciones los fragmentos de ADN se separan en su forma original de doble hebra y la electroforesis es más rápida, además de que se ahorra tiempo al no tener que desarrollar un paso previo de desnaturalización de las muestras antes de cargarlas en el gel. Bajo estas condiciones no se pueden separar fragmentos de ADN que difieran en un único par de bases. Las condiciones desnaturalizantes normalmente se consiguen añadiendo urea y/o formamida al gel. Bajo estas condiciones los fragmentos de ADN migran por el gel como hebras separadas y el poder de resolución es grande, pudiendo separarse hebras de ADN que difieran en tamaño en una única base. Antes de cargar las muestras en el gel, éstas necesitan un tratamiento especial para conseguir la desnaturalización que normalmente consiste en someterlas a elevadas temperaturas (94-95 °C durante 3-5 minutos en un termociclador) en presencia de formamida o urea. Los puentes de hidrógeno que unen ambas cadenas de una molécula de ADN tienen baja energía de enlace y por eso un aumento de la temperatura es suficiente para deshacer dichos puentes de H entre las cadenas. Sustancias como la formamida o la urea, son capaces de formar puentes de H con las bases del ADN en las mismas posiciones que lo harían los puentes de H intercatenarios. Por tanto compiten con la formación del dúplex y su presencia dificulta la estabilidad de las dobles hebras.

En el caso de que las moléculas de ADN a separar se encuentren en un rango tal que podamos utilizar un tipo u otro de geles diremos que la agarosa posee algunas ventajas frente a la poliacrilamida pues no polimeriza al gelificar, sino que simplemente cambia de estado, por lo que la variabilidad de la polimerización de la poliacrilamida desaparece, la preparación del gel es mucho más sencilla y el tiempo de análisis suele ser más corto.

8.2.2- Electroforesis Capilar (CE).

La electroforesis capilar se ha desarrollado rápidamente como técnica analítica aplicada a un amplio rango de áreas (Li, 1992) por su alta eficacia en

la separación, sus posibilidades de automatización y su compatibilidad con pequeñas cantidades de muestra. Esta técnica se basa en los fundamentos de la cromatografía y se desarrolla en un finísimo capilar que rellenaremos de un polímero a través del cual se moverán los fragmentos de ADN al aplicarle una diferencia de potencial. La gran ventaja del uso de capilares radica en que permiten una efectiva disipación del calor y por ello se pueden aplicar elevados voltajes en la electroforesis (200-500 V/cm) que se traducen en un tiempo de separación de los fragmentos de ADN mucho más corto y en un elevado poder de resolución. Debido a la extrema delgadez del capilar es imposible rellenarlo de polímero manualmente, pues se necesita una presión que sólo los sistemas automatizados pueden conseguir. Por ello la electroforesis capilar es un proceso que se desarrolla de manera totalmente automatizada (por ejemplo en un equipo ABI Prism 310 Genetic Analyzer de Applied BioSystems, USA) y no es necesario realizar un gel ni pipetear las muestras para cargarlas en el gel. La detección de los fragmentos se puede realizar de múltiples formas, entre ellas con un láser, por lo que en este caso es necesario que el producto amplificado este marcado de forma fluorescente. Hoy en día existen en el mercado varios equipos de electroforesis capilar fluorescentes que se pueden utilizar tanto para analizar fragmentos de ADN de diferentes tamaños como para secuenciar como por ejemplo MegaBace (Pharmacia), CEQ2000 (Beckman) y ABI 310 (Perkin-Elmer) (ver tabla nº 7).

Equipo	Capacidad	Nº de fluoróforos	Sistema de detección
MegaBace	500 pb / 2 horas	1	2 lasers (488 y 532 nm)
CEQ-2000	500 pb / 2 horas	1	2 lasers
ABI-310	500 pb / 30 minutos	4	1 laser

Tabla nº 7: Diferentes equipos de electroforesis capilar y sus características.

A diferencia de la electroforesis convencional, las muestras se procesan de una en una y por ello es imprescindible cargar junto con cada muestra un patrón interno que consiste en varios fragmentos de ADN de tamaño conocido. De esta manera podremos controlar las pequeñas diferencias que se producen en las condiciones de una migración a otra. El análisis por muestra suele ser de 20-30 minutos dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar, lo cual es una desventaja con respecto a los geles convencionales en donde se procesaban varias muestras en 2-3 horas, pero la gran ventaja es que al tratarse de sistemas automatizados, los equipos pueden trabajar solos incluso durante la noche. Además ya se han desarrollado equipos que procesan varias muestras a la vez, hasta 96 muestras (Ej.: MegaBACE 1000 y ABI Prism 3700). Esta técnica se denomina "Capillary Array Electrophoresis" (CAE) y consiste en migrar múltiples capilares en paralelo.

Los primeros trabajos de electroforesis capilar con muestras forenses fueron realizados por McCord y cols. (1993) y demostraron que los alelos de los loci minisatélite D1S80 y SE33 podían separarse de manera eficaz con esta

técnica. Posteriormente también se empezó a utilizar este tipo de electroforesis con polimorfismos microsatélite (Butler y cols., 1994; Williams y cols., 1994).

8.2.3.- Electroforesis Capilar en Microchip.

Esta técnica es una electroforesis capilar “en miniatura”, pues los capilares son mucho más cortos que en la EC convencional, y por ello, los tiempos de migración son más cortos. Con esta tecnología se han analizado tanto fragmentos de restricción (Jacobson y Ramsey, 1996) como STRs (Schmalzing y cols., 1997; Schmalzing y cols., 1999), e incluso se ha desarrollado un sistema integrado de PCR y EC en microchip (Woolley y cols., 1996). También se están desarrollando sistemas CAE en microchips, se trata de un mecanismo de 96 capilares construidos de forma radial y que se ha utilizado para separar fragmentos de restricción en un tiempo de menos de 120 segundos para todas las muestras (Shi y cols., 1999).

8.2.4.- Espectrometría de Masas MALDI-TOF.

Este sistema es el más rápido de todos pues el tamaño de un fragmento de ADN puede obtenerse en fracciones de segundo. El mayor problema que esta técnica presentaba para el análisis de ADN era la fragmentación y la baja ionización de los fragmentos de ADN largos. Hoy en día se ha demostrado que utilizando una química apropiada y rediseñando los primers de la PCR para que se acerquen más a la zona polimórfica en sí, se pueden detectar alelos STR (Becker y cols., 1997; Butler y cols., 1998; Ross y Belgrader, 1997; Taranenko y cols., 1998).

8.3.- TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

8.3.1.- Tipos de Hibridación

Por hibridación de ácidos nucleicos se entiende el proceso por el cual dos cadenas de ADN, de ARN, o una de ADN y otra de ARN, sencillas y de diferente origen, se unen mediante formación de puentes de hidrógeno entre las bases Citosina y Guanina o Adenina y Timina (o Adenina y Uracilo en su caso). La molécula de cadena doble así formada se denomina híbrido. Para que tenga lugar la hibridación entre dos cadenas de ácidos nucleicos es necesario que exista secuencia de bases complementarias entre ambas cadenas. Cuanto mayor sea la proporción de bases complementarias y la longitud de las secuencias complementarias, mayor será la estabilidad del híbrido formado. Todas las técnicas de hibridación se basan en el apareamiento del ácido nucleico a estudiar (por ejemplo un polimorfismo de secuencia) con otra molécula de ADN conocida llamada sonda³. Para la

³ 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.

detección de la hibridación, la sonda ha de estar marcada bien con un isótopo radiactivo (generalmente con ^{32}P) o bien de forma no radiactiva (generalmente con biotina o digoxigenina).

Desde el punto de vista técnico, los métodos de hibridación se pueden dividir en aquellos en los que el ADN a estudiar se hibrida fijado a un papel de nitrocelulosa (NC) o de nylon y aquellos en los que el ADN se hibrida en solución con la sonda. La información que se obtiene con las distintas técnicas es muy diferente (ver tabla nº 8).

TÉCNICA	MATERIAL A HIBRIDAR CON LA SONDA	APLICACIONES
Southern	ADN digerido con enzimas de restricción y fijado a NC o nylon	Detección y cuantificación de un ADN. Mapeo físico.
Northern	ARN fijado a NC o nylon	Detección y cuantificación de un ARN. Tamaño de ARNs.
Slot / Dot blot	ADN o ARN fijado a NC o nylon	Cuantificación de ADN y ARN.
Hibridación de fagos y bacterias "in situ"	ADN de fagos, plásmidos o bacterias fijado a NC o nylon	Detección de secuencias de ADN.
Hibridación de ARN mensajero	ARN en cortes histológicos o células en cultivo	Cuantificación de ARN a nivel celular
Protección a nucleasas	ARN en solución	Detección de ARNm. Identificación de secuencias transcritas de un ADN.
Run-on (off)	ARN marcado "in vivo" (sonda no marcada y fijada a NC)	Medida de la tasa de transcripción de un gen.
Hibridación de genotecas	ADN de clones individuales fijado a NC o nylon	Aislamiento de un clon determinado de una genoteca
PCR	ADN en solución	Amplificación de una secuencia específica de ADN

Tabla nº 8: Distintas técnicas de hibridación con sondas.

En el campo del análisis forense las técnicas de hibridación se han utilizado y se utilizan actualmente a dos niveles:

a) **Sin realizar PCR:** ya vimos en el apartado de cuantificación de este trabajo como se utilizaba el slot-blot para detectar la presencia de ADN humano en las muestras y para cuantificarlo antes de proceder a su amplificación. Además de esta técnica, hasta no hace mucho tiempo, se solía realizar el análisis de los polimorfismos de ADN del tipo VNTRs mediante SLPs ("*single locus probes*") o mediante MLPs ("*multi locus probes*") como describió Jefreys en la década de los 80 (Jefreys y cols., 1985). Estas técnicas consisten en tratar el ADN extraído de las muestras con una enzima de restricción para producir diferentes fragmentos y someter a éstos a una electroforesis en gel de agarosa para separarlos. Posteriormente los fragmentos separados en el gel se transfieren a una membrana de nylon mediante "*southern blotting*" (Southern, 1975), se desnaturalizan y se hibridan con una o varias sondas específicas marcadas. El mayor inconveniente de esta técnica es la necesidad de gran

cantidad de ADN en las muestras de partida para poder realizarla, por lo que se ha ido abandonando a medida que se han desarrollado y mejorado las PCR *multiplex*.

b) **Tras realizar PCR:** la hibridación con sondas se ha utilizado fundamentalmente sin realizar una electroforesis previa, por lo que la mayoría de los polimorfismos así estudiados son polimorfismos de secuencia. La forma de realizar las hibridaciones más extendida consiste en el uso de sondas específicas para cada alelo inmovilizadas en una membrana, técnica denominada "*dot blot*" (Saiki y cols., 1989). Tras la PCR, el ADN amplificado en solución se desnaturaliza y se pone en contacto con las sondas inmovilizadas. Donde se produzca el reconocimiento por complementariedad de bases se producirá la hibridación, que es visualizada mediante diferentes técnicas de detección (reacciones colorimétricas, radiactividad, etc.).

Hoy en día existen en el mercado kits comerciales que proporcionan las sondas y la mayor parte de los reactivos necesarios para detectar bien la presencia de ADN humano en nuestras muestras como ya vimos en el apartado de cuantificación o bien para detectar ciertos polimorfismos de secuencia (DQA1 y Polymarker).

8.3.2.- Chip de Hibridación.

Actualmente se está desarrollando una técnica especial de hibridación llamada secuenciación por hibridación o chip de hibridación (Brown y Botstein, 1999). Se basa en sintetizar distintas sondas de oligonucleótidos (del orden de cientos) para unir las en disposiciones ordenadas ("arrays") a una fina pastilla de nylon o vidrio. Este chip se pone en contacto con el ADN amplificado y marcado fluorescentemente durante la PCR de modo que el patrón y cantidad de fluorescencia suministra información sobre la secuencia de ADN en cuestión. La última generación de este enfoque es la combinación de técnicas fotolitográficas (como la de los chips de silicio para ordenadores) con síntesis química en fase sólida, con lo cual se logran chips con ordenaciones de decenas e incluso centenares y miles de oligos distintos, que pueden usarse para identificar secuencias marcadas fluorescentemente en cuestión de pocos minutos, por medio de un microscopio confocal de fluorescencia totalmente automatizado, que registra los datos.

A modo de estudio piloto sobre sus posibilidades, la empresa Affimetrix ha logrado secuenciar por este método las 16 Kb del ADN mitocondrial humano, con un dispositivo formado por 135.000 oligonucleótidos. Con la tecnología actual se puede llegar a sintetizar en un día 400.000 oligos de 20 bases cada uno, dispuestos en un chip de 1,6 cm², pero el objetivo final es lograr un chip con los cuatro millones de sondas necesarias para secuenciar todo el genoma humano en una sola hibridación.

Como es de esperar, en el campo forense las cosas se complican. En nuestras muestras es imprescindible realizar PCR debido a la escasez de ADN de partida por lo que el reto es desarrollar sistemas PCR *multiplex* de elevado número de marcadores. Aunque dispongamos de técnicas de detección rápidas capaces de diferenciar multitud de regiones del ADN simultáneamente como el chip de hibridación, de nada nos sirve si no somos capaces de amplificar esas

regiones también simultáneamente. No obstante, en la actualidad, algunos laboratorios están realizando un gran esfuerzo por poner a punto estas técnicas con el fin de utilizarlas de rutina este campo, pues hasta ahora, uno de los principales problemas en la analítica genético molecular forense es el tiempo que se tarda en realizar los estudios.

8.4.- SECUENCIACIÓN.

8.4.1.- Secuenciación automática

Dado un fragmento determinado, al secuenciarlo se pretende conocer la disposición u orden en que se encuentran los nucleótidos que lo componen. La mayoría de las técnicas utilizadas en la actualidad en ciencia forense se basan en el denominado "método de la inhibición de la terminación" o método de Sanger (Sanger, 1977) por "**cycle-sequencing**", especialmente útil para secuenciar muestras muy poco concentradas. La técnica consiste en realizar una PCR convencional del fragmento de ADN que se pretende secuenciar y posteriormente someterlo a una nueva replicación, esta vez añadiendo a la reacción un único cebador específico que proporcione el grupo OH (3') libre para permitir el comienzo del crecimiento de la cadena y desoxinucleótidos modificados (normalmente dideoxinucleótidos o ddNTPs que carecen del grupo 3'-OH) y marcados con colores (fluorocromos), además de los reactivos habituales en este tipo de reacciones (enzima polimerasa, desoxinucleótidos normales, tampón adecuado y cloruro magnésico). Con ello se consigue que en el momento en que se incorpora un dideoxinucleótido marcado (dNTP*) durante la replicación, la cadena nueva no puede seguir aumentando su longitud ya que la enzima polimerasa es incapaz de unir un nuevo nucleótido al extremo del ddNTP*, al carecer éste del grupo hidroxilo en 3' necesario para la unión. El cebador utilizado puede ser uno de los ya usados en la primera amplificación o uno nuevo que hibride en alguna zona con el fragmento amplificado, pero siempre situado a unas 20-30 bases de distancia de la la secuencia que se quiere leer. Así se generan hebras de cadena simple que posteriormente podemos separar. Actualmente, para poder distinguir los diversos productos basándose en el último nucleótido incorporado (el ddNTP que impide que la cadena siga elongándose), se utilizan cuatro fluorocromos diferentes según se trate de ddATP (verde), ddCTP (azul), ddGTP (amarillo, en negro en la figura nº 31) o ddTTP (rojo). De esta manera se puede realizar la reacción de secuenciación en un único soporte (tubo Eppendorf).

Cuando estos procesos de replicación se repiten un número muy elevado de veces en cada tubo, por puro azar estadístico, nos vamos a encontrar con que se han formado copias de la cadena de ADN de todas las longitudes posibles, variando unas a otras en sólo un nucleótido. Por ejemplo, como puede observarse en la figura nº 31, la cadena que tiene 13 nucleótidos acaba en ddCTP, la que posee 14 acaba en ddGTP, la que posee 15 acaba en ddTTP y la que tiene 16 nucleótidos acaba en ddATP.

En consecuencia, podemos separar los diversos fragmentos basándonos en su diferente peso molecular - que depende directamente del número de nucleótidos -, sometiéndolos a una diferencia de potencial en un proceso

electroforético en condiciones especiales (geles de secuenciación desnaturalizantes o en un capilar), con lo que obtenemos un perfil típico tras un análisis adecuado, similar al esquematizado en la figura nº 32.

La manera de interpretar el resultado es comenzar por asignar la letra del nucleótido correspondiente al fragmento de ADN más anódico (el más largo), que en nuestro ejemplo (número 17) es una A; seguimos localizando cual es el fragmento que es inmediatamente más corto después del número 17, que en este caso es otra A (número 16); continuando en este orden el número 15 es una T, el 14 una G, y así sucesivamente...de tal modo que se puede llegar a "leer" o asignar secuencias de 200-400 pares de bases, dependiendo de diversas circunstancias, principalmente, la longitud del gel o del capilar.

Estas técnicas de **secuenciación automática** facilitan enormemente el trabajo (Hoopgood y cols., 1992), al presentar dos grandes ventajas:

1.- Permiten la reducción del 75% de las operaciones manuales en el laboratorio, y con ello minimizan la posibilidad de error.

2.- Los datos son recogidos ("leídos") directamente por el aparato secuenciador, quedando almacenados y estando disponibles para ser estudiados por medio del *software* del que dispone el aparato, disminuyendo las probabilidades de error al introducir datos manualmente.

Los dos principales métodos de secuenciación automática utilizan diferentes estrategias para marcar el ADN y consisten en:

1.- Secuenciación automática con **"primers" marcados** fluorescentemente en 5'. Es de uso menos extendido pues las reacciones de secuenciación se siguen preparando en cuatro tubos diferentes aunque la electroforesis se puede realizar en una sola calle. Consiste en marcar el primer de secuenciación con una sonda fluorescente diferente para cada tubo de reacción. El tubo donde se añade ddATP normalmente lleva el primer marcado con la sonda JOE (verde), el de ddCTP lleva la sonda FAM (azul), el de ddGTP lleva la sonda TAMRA (amarillo) y el tubo de ddTTP lleva la sonda ROX (rojo). Durante la electroforesis, los fragmentos de ADN de diferente tamaño pasan a través de un láser de argón que excita las sondas fluorescentes emitiendo una señal de fluorescencia. Dicha señal, una vez amplificada, es detectada a través de un filtro y asignada a la base correspondiente.

2.- Secuenciación automática con **terminadores marcados** fluorescentemente: es la técnica de rutina para secuenciar productos de no más de 500 pb. Su uso es más extendido porque permite llevar a cabo las cuatro reacciones de secuenciación en un solo tubo, en el que se añaden los cuatro ddNTPs marcados fluorescentemente. Para estas reacciones se ha diseñado una Taq polimerasa específica llamada Taq FS ("fluorescente sequencing"), modificada genéticamente para funcionar mejor en secuenciaciones automáticas. La mejora consiste en la reducción de la actividad exonucleasa 5'-3' con lo que los resultados son más limpios, presentan menos ruido de fondo y apenas falsos terminadores. Además esta enzima incorpora los ddNTPs marcados de manera más eficiente, con lo cual son necesarios menos ddNTPs-fluorescentes y menos ADN molde para conseguir la misma señal.

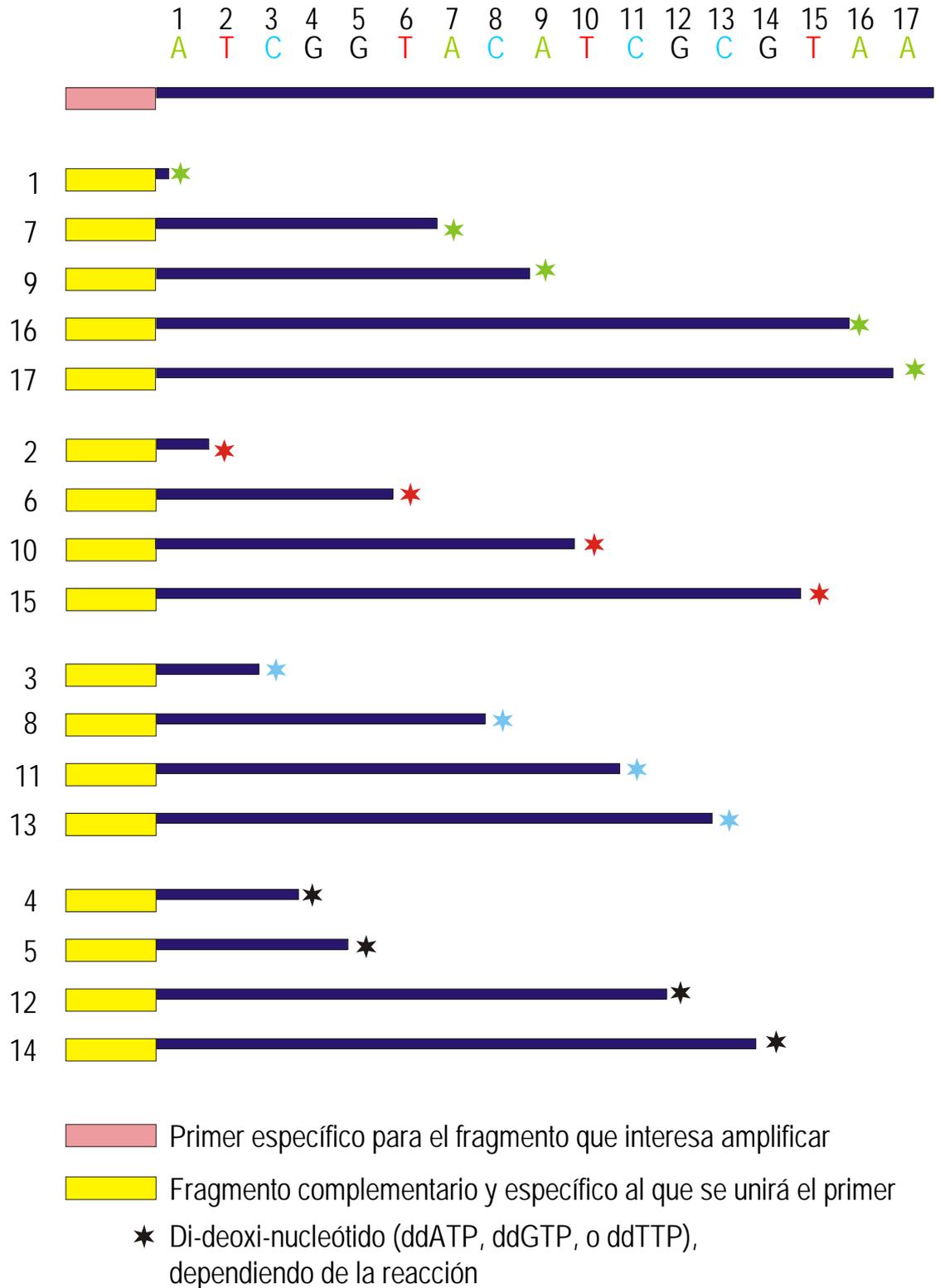


Figura nº 31: Esquema de una reacción de secuenciación automática (basado en Lorente JA).

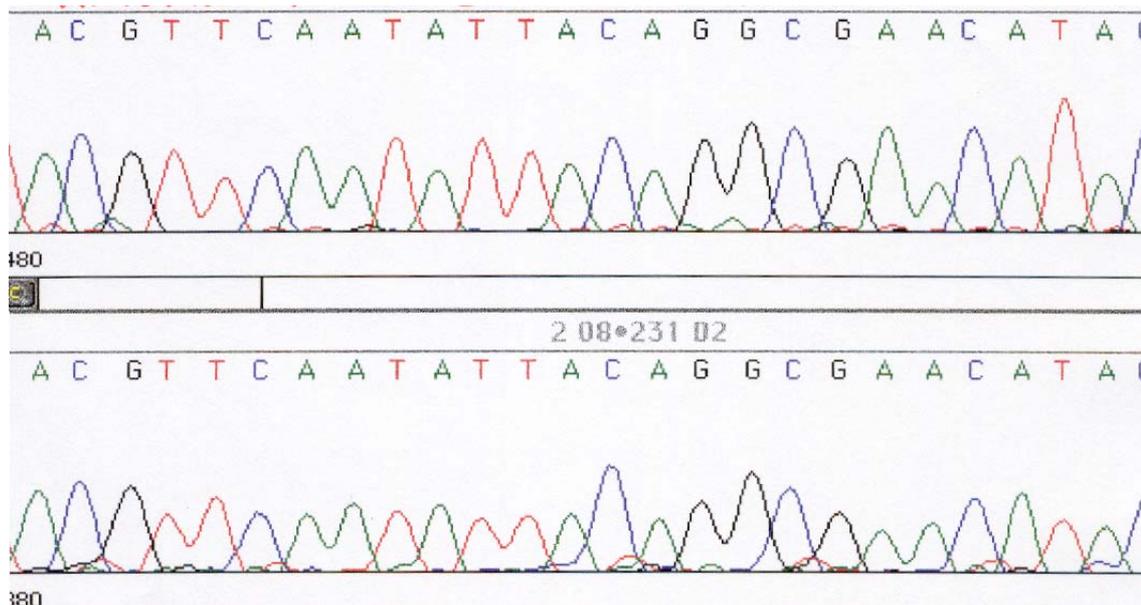


Figura nº 32: Secuenciación: electro las dos hebras de un fragmento de ADN mitocondrial.

Uno de los principales problemas de la detección fluorescente es que existe solapamiento en los espectros de emisión de fluorescencia de los cuatro fluorocromos, lo cual se traduce en la posibilidad de causar errores en la asignación de bases. Por ello, actualmente se están desarrollando nuevos fluorocromos (rodaminados, dicloro-rodaminados, “Big-Dye”) que dan mejor resolución espectral. Con ello se quiere conseguir menor ruido de fondo, una señal de fluorescencia más limpia, una mejora en la asignación de bases y una mayor sensibilidad que permita reacciones en menor volumen, con menor número de ciclos y con menor cantidad de ADN molde necesario.

Existen en el mercado multitud de equipos de secuenciación automática fluorescente como Alf express (Pharmacia), Seq 4x4 (Pharmacia), MegaBace (Pharmacia), Basestation (Millipore), CEQ2000 (Beckman), ABI 310, ABI 373 y ABI 377 (Applied BioSystems) (ver tabla nº 9).

Secuenciador	Matriz	Capacidad	Carriles por muestra	Nº de fluoróforos	Sistema de detección
Alf express	Gel	450-750 pb	4	1	1 laser
Seq 4x4	Gel	300 pb / 40 min.	4	1	1 laser (675 nm)
MegaBace	Capilar	500 pb / 2 horas	4	1	2 lasers (488 y 532 nm)
CEQ2000	Capilar	500 pb / 2 horas	4	1	2 lasers
ABI-310	Capilar	500 pb / 30 min.	1	4	1 laser
ABI-377	Gel	500 pb / 8 horas	1	4	1 laser

Tabla nº 9.- Equipos de secuenciación automática y sus principales características.

8.4.2.- Minisequenciación fluorescente en fase sólida.

La utilidad de este método consiste en la detección de cambios en la secuencia de ADN que suponen la sustitución de una sola base o pequeñas inserciones o deleciones. Originalmente fue diseñado con metodología de detección no fluorescente (Syvänen y cols., 1990; Jalanko y cols., 1992), pero el crecimiento de las tecnologías de secuenciación automática ha permitido aumentar la sensibilidad de la técnica mediante el marcaje fluorescente. Por ello, hoy en día puede aplicarse al estudio de muestras de índole forense para analizar polimorfismos tipo SNP y como herramienta de screening para diferenciar mitotipos antes de secuenciar completamente el D-loop mitocondrial (Tully y cols., 1996; Morley y cols., 1999).

La técnica comprende dos fases, una de amplificación y otra de secuenciación. La primera de ellas consiste en amplificar el fragmento de ADN molde con uno de los primers marcado con biotina en su extremo 5'. El producto así amplificado se introduce en una matriz sólida que contiene estreptavidina capaz de producir una reacción enzimática con la biotina. De esta manera el producto amplificado queda capturado e inmovilizado y tras la elución de la hebra de ADN no marcada y del exceso de primers bajo condiciones alcalinas, queda disponible el ADN molde para su secuenciación.

En la segunda fase se elige un primer que hibride con el molde justo una base antes de donde se encuentra el polimorfismo. Se elonga dicho primer en presencia de Taq polimerasa y nucleótidos marcados con fluorescencia y modificados de tal manera que sólo se incorpore una única base, la complementaria al polimorfismo. La lectura se realiza en un secuenciador automático capaz de diferenciar el tipo de nucleótido incorporado según el color de la fluorescencia emitida.

El método permite la identificación de sustituciones de nucleótidos en muestras de individuos homo y heterocigotos. Un individuo homocigoto generará un solo tipo de señal correspondiente al nucleótido presente mientras que un individuo heterocigoto producirá dos tipos de señales correspondientes a los dos nucleótidos presentes en su ADN.

Las grandes ventajas de esta nueva tecnología son: (i) la posibilidad de desarrollar reacciones multiplex tanto en la fase de amplificación como en la fase de secuenciación, utilizando en esta última fase primers de diferente longitud (por ejemplo con colas de poli-T en su extremo 5') que originen productos de diferente tamaño susceptibles de ser separados mediante electroforesis y (ii) la posibilidad de tipar fragmentos de ADN muy degradados mediante la elección de "*primers*" que amplifiquen una pequeña región que contenga el sitio polimórfico.

9.- PRÁCTICA FORENSE.

Para finalizar la parte teórica de este trabajo nos parece conveniente hacer referencia a cómo se utilizan todos los conocimientos y técnicas descritas en la rutina de los laboratorios forenses.

Las muestras forenses de referencia indubitadas de individuos vivos (víctimas o sospechosos) no dan problemas a la hora de realizar el análisis genético bien se trate de sangre, saliva, pelos arrancados etc., y cualquiera de los métodos de extracción de ADN descritos en la bibliografía puede ser válido para obtener un resultado exitoso. Sin embargo, las evidencias con carácter dubitado que aparecen en el lugar de los hechos pueden sufrir una serie de modificaciones que dependerán no sólo de las condiciones ambientales a las cuales se vean sometidas, sino del tiempo transcurrido, de la cantidad de muestra, del soporte en el cual se encuentran, del lugar de donde procede y del tipo de muestra biológica. El número de factores distintos que acompañan a cada muestra hace que muchas veces resulte realmente difícil estandarizar el tratamiento que "a priori" se ha de dar a cada muestra. Pensamos que es imposible reproducir en el laboratorio todos los factores que pueden intervenir desde el momento en que se produce el delito y por ello sólo si el analista posee la suficiente experiencia y rigurosidad estará garantizado el éxito en el estudio.

Nos parece fundamental apuntar cuál es la secuencia en el tiempo de las técnicas que se utilizan y explicar por qué se elige un tipo de análisis y no otro. Podemos diferenciar tres etapas sucesivas principales en el análisis de una muestra forense: (i) determinación de la naturaleza de la muestra, (ii) determinación del organismo de procedencia y (iii) individualización de la muestra.

9.1.- DETERMINACIÓN DE LA NATURALEZA DE LA MUESTRA.

Como ya hemos visto en el primer apartado de este escrito la apariencia de una mancha de sangre o de esperma varía mucho en función del tiempo transcurrido desde que se produjo y de las condiciones ambientales en las que ha permanecido. Por eso, es imprescindible determinar si una mancha con apariencia de sangre efectivamente lo es o si un estrecho filamento con apariencia de pelo es realmente un pelo o es una fibra. Para ello existen múltiples técnicas de análisis que podemos agrupar en dos tipos:

a) Pruebas de orientación: se trata de técnicas que nos revelan la posible naturaleza de la mancha pero no nos la aseguran. Como ejemplos pondremos la reacción de Adler a la Bencidina⁴ para el caso de las manchas de sangre y el test de la fosfatasa ácida⁵ para el caso de las manchas de esperma (Gisbert Calabuig, 1991). Son muy útiles si resultan negativas puesto que esto significa que podemos descartar que la mancha en cuestión es de sangre o de esperma, pero si resultan positivas las manchas pueden ser o no ser sangre o esperma, pues existen otras sustancias y fluidos distintos a éstos

⁴ Reacción colorimétrica que pone de manifiesto la presencia de las enzimas peroxidases que aparecen en muchos tipos de restos orgánicos.

⁵ Reacción colorimétrica que pone de manifiesto la presencia de fosfatasa ácida que aparece en muchos restos orgánicos y es muy abundante en el semen.

que resultan positivos cuando aplicamos estos tipos de test. Las pruebas de orientación son muy sencillas de realizar, son de bajo coste, rápidas y evitan mucho trabajo en vano.

b) Pruebas de certeza: se trata de técnicas que nos aseguran la naturaleza de la muestra. Por ejemplo los tests cristalográficos de Teichman (ver fig. nº 33) o Takayama para muestras de sangre⁶, la visualización al microscopio de espermatozoides en las muestras de semen o el estudio microscópico de las muestras de pelos (Gisbert Calabuig, 1991). En caso de que sospechemos que estamos ante una muestra de semen de un individuo azoospermico o vasectomizado (reacciones colorimétricas muy fuertes y ausencia de espermatozoides al microscopio) podemos realizar una técnica para determinación de la presencia de PSA⁷ (antígeno específico de próstata) mediante anticuerpos monoclonales.



Figura nº33.- Cristales de Teichman.- izquierda: en una muestra en buen estado de conservación; derecha : en una muestra de carácter forense.

9.2.- DETERMINACIÓN DEL ORGANISMO DE PROCEDENCIA.

Una vez que hemos identificado el tipo de muestra que hemos de analizar es interesante saber si se trata de una muestra humana o no. En el caso de que se trate de una muestra de origen animal normalmente los análisis terminarán en este punto pues no tiene interés criminalístico (excepto en casos de delitos ecológicos y de caza furtiva) y si se trata de una muestra de origen

⁶ Estas técnicas ponen de manifiesto la presencia de hemoglobina en las muestras a estudiar, por lo que si son positivas, podremos asegurar que se trata de una muestra de sangre.

⁷ Glicoproteína producida exclusivamente por las células epiteliales de la próstata y en pequeñas cantidades por otras glándulas.

humano se proseguirán los análisis destinados a individualizar la muestra estudiada.

Las técnicas utilizadas para determinar si una muestra de sangre es de origen humano o no consisten en enfrentar un macerado de la muestra problema (antígeno) con un antisuero antihumano (anticuerpo) para demostrar la reacción antígeno-anticuerpo (Gisbert Calabuig, 1991). El proceso puede llevarse a cabo bien en tubo de ensayo (reacción de Uhlenhut⁸ y reacción de Coombs⁹) o bien en un medio gelificado (test de Outchterlony¹⁰) como el esquematizado en la figura nº 34. Si la muestra es de origen animal y tiene interés, es posible determinar de qué tipo de animal se trata enfrentándola con una batería de antisueros de distintos animales.

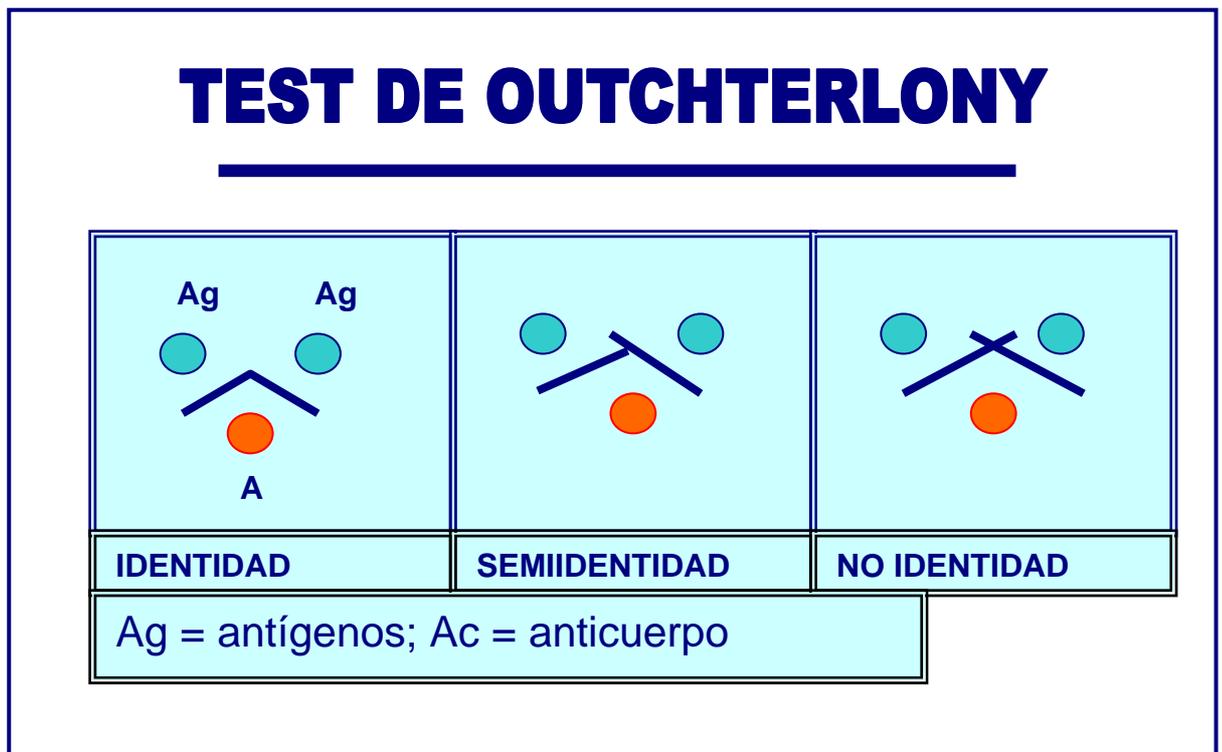


Figura nº 34.- Test de Ouchterlony.- A: antisuero humano total; Ag: antígenos (control y muestra problema). La presencia de una banda de precipitación entre el pocillo del antisuero humano y el problema revela que entre ambos hay una correspondencia antígeno-anticuerpo. Una reacción de identidad de especie se caracteriza porque las bandas de precipitación se unen, empalmándose perfectamente; si se trata de una reacción de semi-identidad, el empalme no es perfecto, sino que sobresale un espolón; si no existe identidad, las dos bandas se cruzan.

⁸ Consiste en el enfrentamiento de la muestra problema con inmunoglobulinas antihumanas. Si se trata de una muestra humana aparecerá un anillo de precipitación en el tubo de ensayo.

⁹ Consiste en añadir anticuerpos humanos bloqueantes que impiden la aglutinación a nuestra muestra problema y posteriormente se añade antiglobulina que aglutinan los anticuerpos bloqueantes si estos se han quedado fijados a nuestra muestra, es decir, si la muestra es humana.

¹⁰ Se trata de enfrentar de forma radial un macerado de la muestra problema y un testigo humano con suero antihumano total en un gel de agarosa. Si la muestra es humana se formará un arco perfecto de precipitación y si es animal forma un espolón en ángulo porque el antisuero sólo reconoce una fracción de las proteínas presentes.

Estas técnicas son sencillas de realizar y tienen bajo coste, sin embargo presentan el inconveniente de basarse en el estudio de las proteínas presentes en la muestra y es posible que dichos compuestos se hayan perdido si la muestra es antigua o ha sido sometida a malas condiciones de conservación. Por eso, hoy en día existe la posibilidad de realizar el estudio del origen de una muestra mediante técnicas de ADN. Una de las regiones que más se utilizan para ello es el gen del citocromo b localizado en el ADN mitocondrial. Las regiones flanqueantes del gen presentan secuencias muy conservadas dentro los vertebrados (secuencias muy parecidas de unos vertebrados a otros); esto permite la realización de la reacción PCR con un único par de cebadores y según del organismo de que se trate se formará un producto de amplificación u otro (Simon, 1991; Kocher y cols., 1992; Vincent y cols., 2000).

En el caso de las muestras de pelos se utilizan técnicas microscópicas básicas para diferenciar su origen animal o humano, ya que morfológicamente son diferenciables unos de otros (Gisbert Calabuig, 1991).

Lo mismo ocurre con los restos óseos y dentarios, sus características morfológicas a nivel macroscópico son suficientes para diferenciar si se trata de restos humanos o no, salvo en algunos casos de individuos inmaduros (Buikstra y Ubelaker, 1994).

9.3.- INDIVIDUALIZACIÓN DE LA MUESTRA.

Ya hemos visto que, actualmente, para determinar a qué individuo pertenece una muestra biológica, se recurre al estudio de sus polimorfismos de ADN y ya hemos descrito todas las fases analíticas que se han de realizar (extracción, cuantificación, amplificación y tipaje), pero creemos conveniente apuntar la problemática del día a día del laboratorio en las diferentes etapas del análisis de estos polimorfismos.

9.3.1.- EXTRACCIÓN

De todos los tipos de muestras biológicas que se analizan diariamente en el laboratorio forense, quizá sean las de **sangre** las más agradecidas. Sin embargo algunas veces también dan problemas. Como describimos en el capítulo de recogida de muestras, la sangre podemos hallarla bien en estado líquido o en forma de mancha. La sangre líquida bien conservada no ofrece ningún tipo de problema, pero no es raro que al laboratorio llegue sangre putrefacta bien porque se ha estropeado durante el transporte o bien porque pertenece a un cadáver en el cual se ha iniciado la descomposición. Para evitar el primer problema ya apuntamos la conveniencia de realizar una mancha sobre una gasa antes de proceder al transporte de la muestra y para el segundo no queda más remedio que tratar de buscar otra muestra para el análisis, bien sea un tejido blando, uñas, o un resto óseo, dependiendo del estado de conservación del cuerpo.

En cuanto a las manchas de sangre sobre superficies absorbentes diremos que las que se hallan sobre papel (periódico, servilleta, pañuelo de papel, celofán, cartulina, billetes) son las que mejor rinden en la extracción de ADN, a excepción de las que se encuentran sobre papel vegetal pues a pesar

de que aparentemente la sangre se desprende en forma de costra (como si se tratara de una superficie no absorbente), las células nucleadas quedan adheridas al soporte (Sanz y Prieto, 1999). Las manchas de sangre sobre telas varían en su rendimiento en función del tipo de tela, siendo las asentadas sobre tela vaquera las más problemáticas debido a los tratamientos químicos, tintes y restos de suciedad que suelen acumular estas prendas. Quizá las manchas sobre cueros, maderas tratadas, restos vegetales y tierras sean de las más críticas pues estos materiales tienen diferentes grados de absorción y en ellos se encuentran presentes gran cantidad de inhibidores de la PCR como los taninos.

Las manchas sobre superficies no absorbentes (cristal, metal, plástico) son más fácilmente analizables porque el soporte no interfiere. La forma habitual de recoger la sangre que asienta en este tipo de muestras es mediante raspado o mediante hisopo impregnado en agua o solución tampón. Ambas formas son válidas pero sí cabe destacar que la toma de muestras mediante raspado con el fin de la obtención de escamas de sangre es el más adecuado pues hemos observado que las muestras recogidas así dan excelentes resultados en la extracción y análisis posterior de ADN, a diferencia de lo que puede ocurrir con los hisopos donde además de la muestra se recogen todos los restos de suciedad que puedan estar presentes en el soporte. Desgraciadamente no es siempre posible tomar las muestras de esta manera ya que para ello es necesario que la mancha no sea demasiado escasa, pues se perdería durante el raspado.

Sin embargo, la recogida de muestra mediante hisopo es muy eficaz cuando el resto de sangre es escaso o está muy diluido pues ello permite la concentración de la muestra en una pequeña superficie de algodón. Además, al tratarse de muestras poco concentradas el secado de las manchas habrá sido rápido por lo que no ha dado tiempo al crecimiento de microorganismos ni a que las enzimas de degradación del ADN actúen debido a la ausencia de agua, lo cual permite un elevado grado de éxito en la extracción de ADN.

Por último queremos hacer mención especial a un tipo de muestra de sangre muy común en el laboratorio, los escasos restos de sangre que aparecen en las jeringuillas hipodérmicas cuando se produce una muerte por sobredosis. Dichas muestras son susceptibles de dos tipos de análisis, el químico para determinación de sustancia estupefaciente y el biológico para confirmar la identidad de la sangre; se plantea el problema de qué tipo de analítica realizar cuando el resto es escaso, pero nuestra experiencia nos dice que se puede empezar por el estudio químico y continuar con el biológico a partir de los extractos con metanol que se han preparado para el análisis de drogas. Utilizando el sedimento de dichos extractos directamente en el proceso de extracción tras el secado en estufa a 37°C con el fin de evaporar el exceso de metanol antes de proceder a la extracción se obtienen excelentes resultados en el tipaje de ADN.

Las muestras de **saliva** no suelen presentar problemas en la extracción de ADN. Si se trata de un filtro de cigarrillo, un sello, un chicle o una prenda (por ejemplo la zona coincidente con la boca en un pasamontañas utilizado en un atraco) recomendamos recortar estas muestras en pequeños fragmentos previamente a la extracción y si la saliva se encuentra asentada en soportes más engorrosos como un vaso, una botella o un hueso de fruta bastará con recogerla

mediante un hisopo estéril impregnado en agua bidestilada o tampón SSC 1X (Cloruro sódico 150 mM, Citrato sódico 15mM, pH 7.0).

En las muestras de **esperma** de los casos de violación, el principal problema es que además de los espermatozoides del agresor se suele encontrar presente otro tipo celular procedente de la víctima, las células del epitelio vaginal. Por ello, a la hora de tipar estas muestras nos encontraremos con una mezcla de perfiles genéticos. Este problema hasta ahora se ha reducido mediante la separación de los tipos celulares (espermatozoides y células epiteliales) durante la extracción de ADN en lisis diferencial (Gill y cols., 1985). El método se basa en las diferencias estructurales que presentan ambos tipos de células. Pero el procedimiento no es siempre exitoso pues en múltiples ocasiones no se logra la separación completa. Por otro lado resulta arriesgado realizar una extracción diferencial en muestras que contienen escasa cantidad de espermatozoides, pues éstos pueden llegar a perderse (Wiegand y cols., 1992).

La extracción de ADN a partir de muestras de **pelos** es más delicada que a partir de los restos biológicos anteriores. Estas muestras requieren un análisis microscópico previo a la extracción con el fin de determinar el tipo de análisis que es posible en ellos (estudios de ADN nuclear o de ADN mitocondrial) además de otras características importantes. Con el análisis microscópico se determinan los siguientes puntos, además de la naturaleza y procedencia de la muestra:

- Si se trata de pelos completos (con bulbo) o de fragmentos de pelos (sin bulbo). En el caso de fragmentos de pelos los estudios a realizar son los de ADN mitocondrial como veremos en apartados posteriores. En el caso de los pelos con bulbo se puede determinar en que fase vital se encuentra éste. En los pelos con bulbo telogénico se suele realizar análisis de ADN mitocondrial, en los pelos con raíz anagénica se realiza un análisis de ADN nuclear y en los pelos con bulbo catagénico recomendamos intentar un análisis de ADN nuclear y si éste falla pasar a estudios de ADN mitocondrial. Recientemente se ha descrito la posibilidad de realizar análisis de ADN nuclear en los pelos telogénicos gracias al rediseño de los primers utilizados en la reacción PCR (Hellmann y cols., 2001). Con los nuevos primers se consigue una reducción del tamaño de los loci analizados y con ello un mayor porcentaje de éxito en muestras críticas.

- En el caso de los fragmentos de pelo se puede intentar determinar cual es el extremo proximal (más rico en células) y cual el distal. Estos dos extremos pueden diferenciarse si se trata de pelos que no han sido cortados hace tiempo, pues el extremo distal suele estar desflechado o romo. En los bellos, el extremo distal tiene forma de cola de ratón.

- Visualizar el grado de suciedad que presentan los pelos y si aparecen restos de posible sangre adheridos a los mismos.

Una vez observadas estas características es conveniente realizar una limpieza de los pelos previa a la extracción. Dicha limpieza consiste en un lavado con etanol 70% en los pelos moderadamente sucios a través de una torunda de algodón; en las muestras de pelo con abundantes restos de suciedad la limpieza se realizará con detergente suave (jabón líquido de manos

o Trizma), aclarado con agua y lavado final con etanol al 70%, todo mediante torunda de algodón.

Son casos especiales los pelos manchados de sangre. En estas muestras se ha de proceder a la separación de ambos tipos de restos biológicos para su análisis por separado, pues puede tratarse de muestras pertenecientes a diferentes personas. Dicha separación se realiza pasando una torunda de algodón impregnada en tampón SSC 1X (ya descrito anteriormente) por la superficie del pelo. Tras su limpieza es recomendable volver a realizar una visualización al microscopio óptico con el fin de comprobar que quedan completamente limpios y sin restos de posible sangre.

En cuanto al método de extracción de ADN utilizado para todos estos tipos de muestras diremos que todos los métodos presentan ventajas y desventajas. Con la extracción orgánica seguida de diálisis/concentración se suelen obtener excelentes resultados pues se logra aislar ADN más o menos puro y libre de inhibidores, pero el protocolo es más largo e implica la manipulación de compuestos tóxicos como el fenol. Los métodos no orgánicos son más rápidos y fáciles de realizar pero presentan el inconveniente de que se parte del extracto celular total, sin el uso de detergentes que faciliten la separación del ADN de las proteínas.

En muestras de pelos estudiadas mediante extracción orgánica es imprescindible la adición de proteinasa K y ditioneitol (DTT) en la digestión para eliminar la queratina. Esta proteína es rica en puentes disulfuro y el DTT es un agente reductor que destruye estas uniones entre aminoácidos. Es recomendable observar si el pelo ha desaparecido completamente como resultado de la digestión y si esto no ocurre añadir más proteinasa y Ditioneitol, si bien es verdad que algunos pelos (sobre todo los de raza negroide) son resistentes a la digestión química y no queda más remedio que proceder a su trituración mecánica previamente a la extracción de ADN.

En muestras muy críticas en cuanto a cantidad se obtienen buenos resultados con la extracción con F/C/I-Centricon si se realiza un último paso tras la purificación consistente en añadir 10-20 μL de TE^{-4} (Tris-ClH 2,5 mM, EDTA sal disódica dihidratada 0,25 mM, pH 8.0) al filtro Centricon (o Microcon), vortear e invertir los tubos, todo ello con el fin recuperar el posible ADN que pudiera permanecer adherido al filtro.

Nos parece fundamental en todas las extracciones de ADN procesar en paralelo un tubo a modo de control negativo que contenga todos reactivos utilizados durante la extracción a excepción de la muestra para detectar posibles contaminaciones con ADN extraño a la muestra en los reactivos utilizados, así como no procesar un número elevado de tubos en cada extracción para evitar posibles errores. Además de estas precauciones en los laboratorios forenses rutinariamente se realizan las extracciones de ADN de las muestras dubitadas e indubitadas por separado.

En cuanto a las muestras de **uñas** diremos que se trata de una muestra muy agradecida pues suele dar resultados positivos en la mayoría de los casos. Es habitual en el estudio de los cadáveres intentar la identificación a través de métodos no genéticos, mucho más rápidos y económicos. Uno de estos métodos es la necrorreseña, basado en el estudio de los dibujos formados por las crestas digitales, ya que son perennes, inmutables, diversiformes,

clasificables e imprimibles (Lubian, 1975; Barberá y cols., 1993). En algunas ocasiones es necesario para realizar este estudio, regenerar el dibujo papilar por medio de hidratación progresiva del pulpejo introduciendo el dedo en una solución de amoníaco. Si finalmente no es posible reconstruir las crestas digitales se puede recurrir a la identificación genética a partir de las uñas aún cuando éstas se hayan visto sometidas a la acción del amoníaco. La extracción de ADN a partir de uñas es bastante sencilla y se puede seguir un protocolo convencional de Fenol/Cloroformo/Isoamílico o bien dar un tratamiento previo a la uña consistente en lavados con urea para hidratarla (Pötsch y cols., 1994).

Son casos especiales los **restos óseos y dentarios**. Existen muchos protocolos de extracción de ADN a partir de este tipo de material, y es parte del estudio experimental de este trabajo la realización de una comparación de los más utilizados.

9.3.2.- CUANTIFICACIÓN

Una vez extraído y purificado el ADN es conveniente cuantificarlo a grosso modo mediante minigel de agarosa para observar el estado de degradación y posteriormente de forma más fina mediante hibridación con sonda. Llama la atención las diferencias que a veces existen entre las cuantificaciones realizadas con ambos métodos. Esto se debe a dos motivos principalmente. Por un lado la cuantificación en minigel es una técnica de cuantificación aproximada y de menor sensibilidad, lo cual hace que se produzcan fácilmente errores debidos a las variaciones de las condiciones de un experimento a otro o incluso errores en la lectura por parte del operador. Por otro lado, en los minigeles de agarosa se cuantifica ADN total (humano y no humano) y no debemos olvidar que muchas de las muestras analizadas pueden contener ADN bacteriano o fúngico debido al estado de descomposición en que se encuentran.

También hemos de apuntar que existen muestras especiales en las que presumimos que son restos biológicos humanos por las circunstancias del caso y que resultan negativas en la cuantificación de ADN humano. En ellas nos puede quedar la duda de que la muestra contenga cantidades de ADN menores a las detectables con los métodos de cuantificación y por ello puede forzarse la amplificación de algún marcador para comprobar que efectivamente el extracto estaba libre de ADN totalmente.

9.3.3.- AMPLIFICACIÓN Y TIPADO

En este apartado cabe resumir brevemente el esquema de actuación en cuanto a elección de los polimorfismos a estudiar según las características de cada muestra.

Como norma general diremos que siempre que sea posible se realizará el análisis de polimorfismos de ADN nuclear, pues son los que más información nos darán en cuanto a la identidad de la muestra. La decisión de seleccionar una región u otra del ADN genómico está basada, en parte, en los resultados previos existentes que demuestren la eficacia de la amplificación de tales

moldes (Rogan y cols., 1990). Después de una extracción de ADN en muestras que se encuentran en muy mal estado de conservación, se obtienen fragmentos de sólo 100-200 pares de bases debido a su estado de degradación, con el agravante de que muchas veces estas muestras van acompañadas de ADN bacteriano (Hagelberg y cols., 1991a y 1991c; Jeffreys y cols., 1992; Bowcock y cols., 1994; Gill y cols., 1994). Por el contrario las muestras de tejido fresco proporcionan fragmentos de ADN de más de 10.000 pares de bases.

De todos los polimorfismos nucleares, los más discriminativos son los del tipo minisatélite pero presentan el problema de que se requiere una alta calidad en el ADN que va a ser estudiado debido a su gran tamaño. Como hemos apuntado, en muestras forenses lo habitual es encontrarnos con ADN degradado y resultará de gran dificultad el análisis de este tipo de marcadores. Por ello se recurre al estudio de polimorfismos del tipo microsatélite que si bien son menos informativos que los anteriores, con el estudio de una batería de los mismos se consigue un poder de discriminación más que aceptable para identificar muestras problema.

No está descartado que en el futuro los polimorfismos elegidos sean los del tipo SNPs, pues pueden ser tipados en ADN degradado mediante la elección de primers que amplifiquen una pequeña región que contenga el sitio polimórfico. Sin embargo, ya hemos visto que son menos polimórficos que los STRs, por lo que sería necesario el análisis de un gran número de ellos para alcanzar un poder de discriminación válido para diferenciar muestras. Con el desarrollo de las nuevas tecnologías del tipo biochip, este futuro está cada vez más cercano.

Pero existen situaciones en las que es recomendable el análisis de otros tipos de polimorfismos como son los polimorfismos de ADN mitocondrial y polimorfismos ligados al cromosoma Y:

a) **ADN mitocondrial:** La aplicación de técnicas de secuenciación para estudiar los polimorfismos del ADNmt encuentra precisamente su justificación en los siguientes supuestos:

1.- Cuando existe una gran degradación de las muestras enviadas al laboratorio por las malas condiciones de conservación en que permanecieron hasta que fueron halladas o por la antigüedad que tienen. En este caso el ADN mitocondrial se encontrará en mejor estado que el nuclear debido a su mayor número de copias por célula y de no obtener resultados concluyentes en el análisis del ADN nuclear de este tipo de muestras, podemos pasar a obtener resultados positivos en el análisis de su ADN mitocondrial. Tal es el caso de restos óseos y dientes antiguos o sometidos a condiciones extremas.

2.- Cuando la cantidad de muestra de que se dispone es mínima (pelos sin bulbo, heces). Un pelo con bulbo caduco o un fragmento de pelo contendrán una cantidad de ADN nuclear tan escasa que en principio los análisis de estas muestras mediante ADN nuclear resultará negativo. Por ello, de rutina este tipo de muestras se procesan directamente mediante analítica mitocondrial (Wilson y cols., 1995a; Hopwood y cols., 1996).

3.- En la identificación de restos biológicos y el establecimiento de una relación familiar cuando no se dispone de los progenitores y no queda más remedio que realizar una comparación con familiares más lejanos (Gill y cols.,

1994). Si se trata de familiares vía materna tendrán exactamente el mismo ADN mitocondrial aunque se trate de familiares lejanos. Un estudio de ADN nuclear en estos casos sería poco informativo ya que cuanto más alejada sea su relación familiar, menos alelos compartirán.

4.- Cuando existe un sospechoso en un hecho delictivo pero no se dispone de muestra indubitada del mismo, se puede recurrir al estudio del ADN mitocondrial de un familiar relacionado matrilinealmente para excluirlo.

Existen muestras que “a priori” es difícil determinar si contendrán suficiente cantidad de ADN nuclear para su estudio (algunos restos óseos, pelos en estado catagénico). En estos casos es recomendable realizar la extracción de ADN encaminada a un posible estudio de ADN mitocondrial desde el principio, es decir, en un lugar específico de extracción, con reactivos y pipetas de uso exclusivo, etc., para evitar posibles contaminaciones como ya hemos descrito anteriormente. Una vez extraído el ADN se toma una alícuota del mismo para intentar una analítica mediante ADN nuclear y si ésta resulta negativa se pasa a realizar el estudio de los polimorfismos mitocondriales.

El principal problema que hoy en día presenta el análisis de muestras forenses mediante ADNmt es la interpretación de las heteroplasmas. Aunque la heteroplasma se ha usado como un factor identificador, como en el caso del Zar Nicolás II y su hermano (Gill y cols., 1994), en la mayoría de los casos hace la identificación más problemática (Sullivan y cols., 1997). Existen cinco situaciones posibles a tener en cuenta (Salas, 1999):

- No existe heteroplasma ni en las muestras dubitadas ni en la indubitada del sospechoso: en este caso no hay problema de interpretación.
- Se observa la misma heteroplasma en las muestras dubitadas y en la indubitada: si el resto de la secuencia coincide, la presencia de la heteroplasma en ambos tipos de muestra puede ayudar a confirmar la coincidencia.
- No se observa heteroplasma en las muestras dubitadas pero sí en la indubitada: se necesitarían evidencias adicionales que ayudaran a concluir si se trata de una coincidencia o una exclusión (por ejemplo, polimorfismos fuera de secuencia o análisis de HV3).
- Se observa heteroplasma en las muestras dubitadas pero no en la indubitada: se necesitan más evidencias que ayudaran a concluir una coincidencia o una exclusión (por ejemplo, análisis de otras muestras indubitadas del mismo individuo procedentes de distintos tejidos).

En la identificación genética de cadáveres a través de familiares maternos podemos encontrarnos con relativa frecuencia que las secuencias mitocondriales de unos y otros pueden ser diferentes (heteroplasma en el linaje), por lo que hemos de tener esto muy en cuenta para evitar una falsa exclusión, por ejemplo observando cuidadosamente la secuencia de todas las muestras para detectar bajos niveles de heteroplasma que indicarían la segregación de las variantes de ADNmt dentro del linaje.

b) **Cromosoma Y**: Existen varios casos especiales en los cuales el análisis de los polimorfismos Y pueden ser de gran utilidad:

b.1) Casos de paternidad:

b.1.1.- Casos de paternidad en los que no se dispone de material biológico de la madre: Dado que los polimorfismos del cromosoma Y sólo se heredan vía paterna, nos es indiferente disponer de muestra biológica de la madre para realizar este tipo de estudios. Nos bastará con disponer de la muestra del padre y compararla con la del presunto hijo para comprobar si ambas presentan idénticos polimorfismos Y.

b.1.2.- Casos de paternidad en los que no existe presunto padre (Pena y cols., 1994): Otros parientes del hijo putativo como los hijos de tíos paternos pueden ser analizados mediante marcadores del cromosoma Y. Si los cromosomas "Ys" de esos familiares no son idénticos al del hijo en cuestión, estaremos ante una exclusión, aunque también es posible que la "no-paternidad" ocurriera en la generación previa (es decir, que el padre ausente no fuera en realidad hermano por parte de padre de los tíos paternos del hijo putativo).

b.2) Casos de mezclas:

b.2.1.- Agresiones sexuales en las que el semen del sospechoso se encuentra mezclado con células de la víctima: Cuando no es posible realizar una extracción diferencial de ADN, el estudio del cromosoma Y permite analizar el haplotipo del agresor de forma sencilla. Los polimorfismos del cromosoma Y permiten una detección más sensible de la presencia de ADN de un individuo masculino aún cuando éste se encuentre inmerso en una gran cantidad de ADN femenino. Con loci autosómicos esto no ocurre pues se amplifica preferentemente el fenotipo femenino si la cantidad de células epiteliales femeninas es muy superior al número de espermatozoides (Skinker y cols., 1997). La explicación de todo esto la encontramos en que la alineación de los primers es un proceso complejo durante los primeros ciclos de la PCR, ya que los primers tienen que "escanear" el ADN genómico para encontrar los sitios de unión específicos (Ruano y cols., 1991). El producto amplificado durante estos primeros ciclos es el molde preferido para las síntesis posteriores. Si la secuencia diana deseada se encuentra presente en escasa cantidad respecto al total de ADN, la frecuencia de "colisión" entre los primers y los sitios de unión se ve enormemente reducida. En muestras con mezclas esto puede dar lugar a una amplificación fallida de los alelos que se encuentran en menor cantidad durante los primeros ciclos.

Debido a que la mayoría de los delitos sexuales se componen de un agresor varón y una víctima femenina, es interesante usar primers específicos del cromosoma Y para detectar pequeñas cantidades del ADN masculino que puede encontrarse inmerso en el mayoritario ADN femenino. Además, el uso de polimorfismos de ADN del cromosoma Y nos permite incluir o excluir a un sospechoso cómodamente.

Como conclusión diremos que en muestras que contengan una mezcla de escaso ADN de varón y abundante ADN de mujer (más de una proporción de 1:2000) los polimorfismos STR específicos del cromosoma Y se tipan sin

problemas (mejor que un STR autosómico) porque no existe competición por parte del ADN femenino en el anillamiento de los primers (Prinz y cols., 1997).

b.2.2.- Delitos sexuales en las que el agresor es un individuo azoospermico: Los individuos azoospermicos tienen ausencia de espermatozoides en el eyaculado debido a defectos congénitos, o a la práctica de vasectomía o bien debido a factores ambientales (Sigman, 1992). Los espermatozoides son la mayor fuente de ADN en las muestras de semen, por lo que un individuo azoospermico tiene mucho menos ADN seminal para el análisis. La cantidad de ADN / mL en el eyaculado de un individuo espermico es aproximadamente de 450 μ gr en los espermatozoides y de 30 μ gr. en los leucocitos y células epiteliales (Davidsodhn, 1991). Por ello, en un individuo azoospermico, el contenido de ADN es aproximadamente de sólo el 6.3% del contenido en un individuo espermico. Por las mismas razones que en el caso anterior, es posible la detección de ADN de las células epiteliales y los leucocitos en eyaculados de individuos vasectomizados aunque se encuentre mezclado con ADN de la víctima, pues los primers no compiten en la fase de anillamiento.

b.2.3.- Agresiones sexuales múltiples: el uso de los microsatélites del cromosoma Y en estos casos permite determinar el número mínimo de agresores, aunque el haplotipo individual de cada uno no puede llegar a deducirse.

b.2.4.- Otros tipos de mezclas: En mezclas de sangre-sangre, o de sangre-saliva, o de sangre-pelos donde no se puede aplicar lisis diferencial, el cromosoma Y es una herramienta de trabajo que puede aportarnos valiosa información.

b.3) Como herramienta de "screening":

b.3.1.- En casos de agresión sexual: los polimorfismos Y pueden servirnos para relacionar rápidamente éstos casos (bases de datos) y excluir sospechosos de manera rápida antes de profundizar en loci autosómicos.

b.3.2.- En grandes catástrofes: Cuando en una catástrofe se producen gran número de cadáveres puede ser interesante clasificarlos según sus polimorfismos Y para poder discriminar qué cadáveres tendremos que cotejar con cada familia antes de realizar los estudios de ADN nuclear autosómico. Esto resulta muy útil cuando los individuos vivos de cotejo con las víctimas son los hermanos de éstas por ejemplo.

10.- APLICACIONES A LA ANTROPOLOGÍA Y ARQUEOLOGÍA.

Las moléculas preservadas en restos biológicos antiguos han sido de gran interés para estudiosos en los entornos antropológico y arqueológico. Así, existen multitud de trabajos sobre proteínas, lípidos y con menor frecuencia carbohidratos antiguos. Sin embargo, la biomolécula más analizada ha sido el ADN por ser la que más extensa información puede aportar y la que mejor se conserva con el paso del tiempo. Las técnicas y metodología expuestas en este trabajo son por tanto aplicables también al análisis ADN antiguo, pero se ha de tener presente siempre la elevada probabilidad de contaminación con ADN moderno y la dificultad de verificar los resultados. Por tanto, para ser un estudioso de estas moléculas es muy importante conocer a fondo la inestabilidad del compuesto que estamos estudiando (Lindahl, 1993; Tuross, 1994), cómo se comportan las técnicas hasta ahora descritas cuando las aplicamos a muestras tan críticas (Ruano y cols., 1989; Pääbo, 1990; Cooper, 1992; Hummel y cols., 1992; Goodyear y cols., 1994; Handt y cols., 1994), y qué medidas podemos tomar para evitar, o por lo menos detectar la contaminación (Cone y Fairfax, 1993; Schmidt y cols., 1995).

La aptitud que una muestra antigua tiene para ser susceptible de análisis genético depende del tiempo transcurrido y en mayor medida de las condiciones ambientales a las que ha estado sometida. Suponiendo una concentración de sales similar a la fisiológica, un pH neutro y una temperatura de 15°C, parece razonable pensar que el ADN habrá desaparecido transcurridos 100.000 años, pero casos excepcionales como las bajas temperaturas, la desecación rápida o las altas concentraciones salinas hacen que muestras más antiguas puedan ser estudiadas con éxito relativo. Los restos humanos que mejores resultados han aportado en cuanto al análisis de ADN son los huesos largos (fémur, húmero) y los dientes (molares). Actualmente es posible realizar un análisis previo al genético que nos permita saber de forma aproximada el estado de conservación de este tipo de muestras; así, el estado de racemización de los aminoácidos presentes en la muestra ha sido uno de los métodos más utilizados para discriminar entre varios restos y evitar la destrucción de los que no van dar resultados en la analítica de ADN. En cuanto a los restos animales son de gran interés los coprolitos (material fecal), pues además de aportar datos genéticos de la especie de procedencia también han servido para el estudio de la dieta alimenticia de organismos antiguos (Kohn y cols., 1995).

Si atendemos al tipo de organismos antiguos hasta ahora estudiados existe un amplio abanico que incluye:

- 1.- Restos vegetales: se ha logrado describir secuencias de ADN de plantas momificadas (Rogers y Bendich, 1985; Rollo y cols., 1991) y de plantas fósiles de hace varios millones de años conservadas excepcionalmente (Poinar y cols., 1993). Los estudios realizados en estas muestras fósiles se encaminan generalmente al análisis de la historia evolutiva de las especies (Goloubinoff y cols., 1993) o a la investigación de los orígenes y propagación de la agricultura (Brown y cols., 1994).

2.- Restos de origen animal: los resultados más espectaculares obtenidos en el estudio de animales fósiles se han producido cuando las condiciones de conservación han sido ideales; así, hoy en día ya se han determinado secuencias de algunos fragmentos de ADN de animales extintos como el mamut lanudo encontrado congelado en Siberia (Johnson y cols., 1985). Todo ello permite el estudio y la comprensión de las relaciones evolutivas entre especies ya extinguidas y entre éstas y las actuales (Higuchi y cols., 1984; Thomas y cols., 1989; Cooper y cols., 1992).

3.- Restos humanos: sin duda los antiguos humanos son el grupo que más inquietudes ha generado entre los investigadores de estas disciplinas y por ello existen multitud de trabajos cuya finalidad es la caracterización genética de nuestros ancestros. Desgraciadamente, la posibilidad de contaminación con ADN moderno en restos humanos antiguos es mayor que para otras especies, pues los propios manipuladores de las muestras (arqueólogos, antropólogos, analistas) son candidatos a ser la fuente de contaminación por poseer secuencias de ADN complementarias a los "primers" que se utilizarán en las reacciones de PCR. Sin embargo, este problema no ha mermado la curiosidad de los antropólogos moleculares y se han lanzado al estudio del ADN antiguo persiguiendo diversos objetivos:

- A nivel individual se ha pretendido la determinación del sexo de individuos jóvenes que no muestran todavía características físicas claramente clasificables o la reconstrucción del esqueleto de un individuo cuando los restos se encuentran esparcidos y es difícil la asignación de cada pieza a cada individuo.
- A nivel intrapoblacional se persigue el establecimiento de relaciones familiares entre individuos que han aparecido enterrados juntos, la determinación de los rangos sociales y reconstrucción de la organización social de poblaciones antiguas, así como la caracterización genética de las poblaciones incluidas mutaciones que puedan generar enfermedades.
- A nivel interpoblacional se han realizado diferentes tipos de estudios: comparación de secuencias de ADN de poblaciones diferentes para estimar el grado de parentesco entre dichas secuencias y por tanto entre poblaciones o entre yacimientos; cálculo del tiempo transcurrido desde que una especie divergió de un antepasado común; estudio de antiguas expansiones, contracciones demográficas y migraciones; análisis del posible origen racial y de la historia evolutiva humana.

La mayoría de los trabajos publicados sobre ADN humano antiguo se centran en el estudio del ADN mitocondrial (Doran y cols., 1986; Hagelberg y cols., 1994; Lalueza y cols., 1997) fundamentalmente por dos motivos: mayor probabilidad de obtención de resultados por el elevado número de copias de partida con respecto al ADN nuclear como ya hemos visto en otros apartados de este trabajo y por el tipo de herencia que presenta, que al no sufrir recombinación, las variaciones se deben únicamente a mutaciones. De todas las investigaciones realizadas, quizá la más espectacular sea la determinación de parte del genoma mitocondrial de un individuo Neandertal (Krings y cols., 1997; Krings y cols., 1999).

Son menos numerosas las publicaciones que presentan resultados del estudio de ADN nuclear en restos antiguos y existe actualmente controversia entre la comunidad científica sobre estos trabajos, pues se duda de su autenticidad principalmente porque se cuestiona la posibilidad de que se conserven copias de ADN nuclear cuando ha pasado largo tiempo. Por ello, es recomendable acatar criterios de autenticación de las secuencias o fragmentos de ADN obtenidos de las muestras antiguas. Uno de los principales criterios es la reproducibilidad de los resultados preferentemente en otro laboratorio distinto al primero que analizó los restos. Así, estudios de gran impacto realizados a partir de termitas incluidas en ámbar o de plantas fósiles datadas en el Mioceno (hace 5-24 millones de años) no han podido ser reproducidos, y por eso hoy se consideran contaminaciones. Pero podemos destacar estudios en restos no muy antiguos, como los trabajos realizados por Lassen y cols. (1996) sobre la determinación del sexo de individuos inmaduros de 200 a 7500 años de antigüedad, o los realizados por Susan Hummel y cols. en 1993 y 1999 sobre el estudio de secuencias repetidas en el cromosoma Y en ADN antiguo y el tipado en una sola reacción de nueve polimorfismos STR y el loci amelogenina de restos humanos de hace unos pocos meses hasta 3000 años. Otros científicos se han centrado en el estudio de otros tipos de polimorfismos como el que presenta el sistema HLA (Lawlor y cols., 1991), o fragmentos de ADN implicados en enfermedades como la fibrosis quística (Ramos y cols., 1995).

Finalmente señalar, que también es de interés para arqueólogos y paleontólogos la detección microorganismos como hongos a partir de distintas fuentes como insectos, utensilios de los antiguos humanos e incluso fragmentos de plantas aislados de prendas de vestir (Ubaldi y cols., 1996). Son también varios los autores que se han interesado por el análisis de bacterias y otros patógenos en restos antiguos y para ello han aplicado principalmente la metodología PCR (Spigelmann y Lemma, 1993; Baron y cols., 1996).

III.- OBJETIVOS

III.- OBJETIVOS.

No pretendemos ni mucho menos encontrar la fórmula mágica para hacer que las muestras forenses problemáticas se conviertan en las más fáciles de analizar en el Laboratorio. Este objetivo quizá sea inalcanzable para nosotros. Simplemente nos conformaríamos con poder obtener una evaluación de las estrategias a seguir con este tipo de muestras para poder concluir cuáles son las más favorables y las que dan mejores resultados. Queremos decir con esto que para nosotros es también importante el resultado negativo: si tras diseñar un experimento de mejora de la calidad de los análisis en muestras críticas no se obtiene dicha mejora, estaremos evitando una pérdida de tiempo a otros biólogos anunciándoles que dicho camino no es el mejor a seguir.

Nuestro punto de partida es la hipótesis de que a través de alguna de las estrategias de análisis que proponemos se pueden mejorar los resultados en el estudio de las muestras biológicas críticas, ya sean de carácter forense o antropológico. Los principales problemas que trataremos de evitar son los siguientes:

El ADN genómico que se logra aislar a partir de muestras en mal estado o muy antiguas se encuentra la mayoría de las veces fragmentado y es muy escaso.

Los extractos de ADN de este tipo de muestras suelen contener sustancias que inhiben la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las contaminaciones con ADN moderno en este tipo de muestras pueden dar como resultado falsos positivos en el análisis.

Evaluaremos diversas estrategias de análisis actuando fundamentalmente a dos niveles:

A) **Optimizando la recogida de muestras y la extracción de ADN:** una de las fases más importantes en el análisis de muestras forenses es la fase inicial de recogida de muestras y posterior extracción de ADN pues muchas veces la obtención o no de resultados positivos depende de cómo se realicen dichos apartados. Compararemos los diferentes métodos de extracción descritos para muestras con escasa cantidad de ADN, con el fin de poder discriminar cual de ellos es el que ofrece mayor porcentaje de éxito y así poder estandarizar un protocolo de actuación ante el análisis de una muestra crítica. También introduciremos algunas modificaciones en los distintos métodos de extracción y evaluaremos si los resultados en la analítica sufren alguna mejoría.

B) **Optimizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** El objetivo de este apartado es también probar distintas posibilidades de análisis que a nuestro juicio pueden mejorar los resultados. Concretamente nos centraremos en:

B.1.- **Doble PCR:** es posible que en muestras críticas no sea suficiente la realización de una única reacción de PCR pues la cantidad de ADN molde de

partida (sólo unas pocas copias) no es suficiente. Suponemos que si sometemos a este tipo de muestras a una segunda amplificación a partir de un producto ya amplificado, quizá se generen suficientes copias como para poderlas detectar por medio de las técnicas habituales de tipaje.

B.2.- Eliminación de inhibidores de la PCR: para eliminar inhibidores se han descrito diferentes métodos como la realización de diluciones seriadas de los extractos de ADN hasta alcanzar una dilución en la cual los inhibidores no afecten a la enzima Taq polimerasa. Esto no es siempre posible en muestras críticas pues además de diluir el inhibidor también se diluye el ADN de partida y éste a veces es muy escaso. También son comunes los métodos de purificación de ADN tras la extracción mediante el uso de filtros que retienen solutos grandes como el ADN y eliminan los solutos pequeños que pueden inhibir la reacción. Otros métodos de extracción-purificación de ADN como la extracción con resina quelante Chelex se basan en la retención de moléculas cargadas negativamente (como el ADN) y la eliminación del resto de moléculas. Creemos que la combinación de estas dos técnicas (purificación mediante filtros y mediante Chelex) puede mejorar sustancialmente la reacción de PCR pues aplicando las dos a una misma muestra se eliminan solutos no deseados según su peso y según su carga.

B.3.- Pre-amplificación inespecífica sin cebadores: aplicaremos los estudios iniciados por Golenberg y cols. (1996) sobre muestras degradadas artificialmente al análisis de muestras críticas reales. Dichos estudios consisten en realizar unos pocos ciclos de PCR con todos sus componentes excepto los cebadores (pre-amplificación inespecífica), previos a la auténtica PCR que proporciona el producto amplificado deseado (amplificación específica). Creemos que los resultados obtenidos por estos autores son alentadores y aplicables a nuestro tipo de muestras por lo que valoraremos si esta estrategia de análisis es válida en muestras degradadas reales.

En cada una de las fases de este estudio pondremos especial atención a los problemas de contaminación centrándonos fundamentalmente en:

- El tratamiento riguroso en la manipulación de las muestras y el material de análisis.
- La aplicación de distintos métodos para detectar los fenómenos de contaminación si los hubiera.

IV.- PARTE EXPERIMENTAL

IV.- PARTE EXPERIMENTAL

1.- OBJETIVO A.: COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN RESTOS ÓSEOS.

1.1.- INTRODUCCIÓN

En los casos de identificación cadavérica en los que la única muestra disponible es un resto óseo, una de las fases más críticas de la analítica es la extracción de ADN, pues de ella dependerá el éxito o fracaso del estudio. En este apartado realizaremos una comparación de cuatro métodos de extracción de ADN diferentes a partir de hueso realizados sobre restos cadavéricos de casos forenses reales: Glass-Milk (kit comercial), Acetato Sódico (Cattaneo y cols., 1995), F/C/I-Centricon (Hochmeister y cols., 1995) y F/C/I-Centricon-Resina de sílice (Krings y cols., 1997). Se valorará la cantidad de ADN obtenido así como la aptitud del mismo para obtener resultados en la reacción PCR (ver figura nº 35).

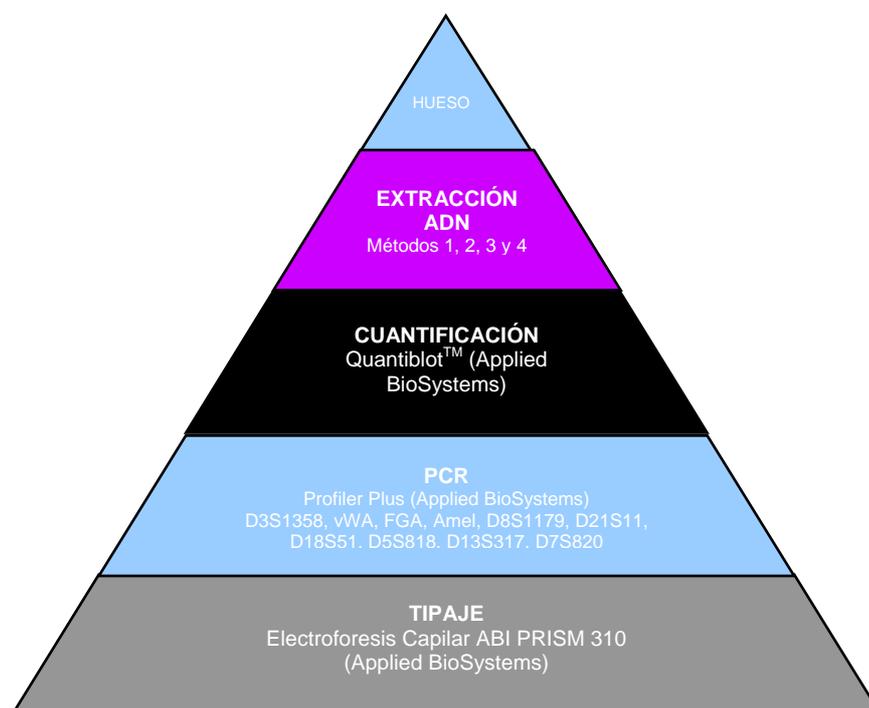


Figura nº 35.- Esquema de la secuencia de las técnicas practicadas.

1.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1.- Tipos de muestras analizadas

Se han estudiado cuatro fémures de cuatro casos forenses (A, C, D y E), dos fémures recuperados de un enterramiento debido a una epidemia de cólera en 1834 (G y H), y dos húmeros también pertenecientes a dos casos forenses (B y F). Las características de cada muestra se describen en la tabla nº 10.

Muestra nº	Tipo de resto	Estado	Antigüedad	Lugar
A (290)	Fémur	Esqueletizado	4.5 años	Descampado en Madrid
B (22)	Húmero	Carbonizado	2 días	Descampado costa de Alicante
C (116)	Fémur	Esqueletizado	6 meses (Junio a Noviembre)	Zona montañosa Zamora
D (637)	Fémur	Avanzada putrefacción	15 días del mes de Junio	Rompeolas Puerto Barcelona
E (187)	Fémur	Semiesqueletizado	6 meses (Agosto a Enero)	Local abandonado en Playa de Las Américas
F (374)	Húmero	Esqueletizado	4 años	Zona húmeda de Valencia
G (11bb3)	Fémur	Esqueletizado	166 años	Cementerio Alcalá la Real (Jaén)
H (12cb2)	Fémur	Esqueletizado	166 años	Cementerio Alcalá la Real (Jaén)

Tabla nº 10.- Características de los casos estudiados.

1.2.2.- Preparación de las muestras

La contaminación en este tipo de muestras puede ser un problema serio. Por ello es conveniente también proceder a una descontaminación como paso previo a la extracción. En el caso de restos óseos está descrito el uso de ácido (por ejemplo HCl 0.15M) que, sin embargo, presenta el inconveniente de poder destruir el ADN endógeno de la muestra si es que éste le es accesible. El ácido actúa eliminando del ADN las bases púricas (despurinización) y tornando el hueso quebradizo en los puntos donde las moléculas de ribosa quedan al aire (Sambrook y cols., 1989). En nuestro caso, el tratamiento descontaminante que se realizó consistió en:

1.- En caso de presencia de partes blandas adheridas al hueso éstas se eliminaron mediante la introducción del resto óseo en una solución de sosa al 6 % en caliente, un tiempo dependiente de la cantidad de restos blandos presentes. Se controló el proceso en todo momento para evitar pérdidas de materia ósea y se consideró finalizado cuando las partes blandas se habían despegado por completo de la matriz ósea.

2.- Una vez limpio de partes blandas se procedió al lijado de la parte exterior del hueso y posteriormente se cortó en rodajas de aproximadamente 0.5 cm de grosor mediante una sierra mecánica.

3.- Posteriormente se volvió a limpiar el hueso, esta vez tanto externa como internamente mediante lija de piedra o broca mecánicas (Dremel), para eliminar restos de trabéculas de médula ósea seca y en su caso restos de tierra de la parte externa. Cuando el hueso estuvo perfectamente limpio de se procedió a su machacado mediante un martillo y un taco amortiguado con varias capas de papel de filtro, hasta conseguir pequeños fragmentos (Fotografía nº 10).

4.- Los pequeños fragmentos se introdujeron en un tubo junto con un impactador metálico y se procedió a su molido en un molinillo "Freezer mill" (Glen Creston) a baja temperatura (con nitrógeno líquido) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.- El polvo de hueso así obtenido fue utilizado para las extracciones de ADN. La cantidad de polvo de hueso utilizado como sustrato para cada tipo de extracción fue la descrita en cada protocolo: 0.4-0.5 gr (Glass-Milk), 1,5 gr (Acetato Sódico), 5 gr (F/C/I-Centricon) y 0,4 gr (F/C/I-Centricon-Resina de sílice). En uno de los casos estudiados mediante extracción orgánica con F/C/I-Centricon se realizó una prueba partiendo sólo de 1 gr de polvo de hueso. Todas las extracciones se realizaron procesando en paralelo un tubo a modo de control negativo que contenía todos reactivos utilizados durante la extracción a excepción de la muestra y no se procesaron más de 8 tubos en cada extracción. En algunos casos fue posible el cotejo con muestras indubitadas de los familiares de las víctimas y en otros sólo se pudo comprobar la coincidencia del tipaje de sexo con las características antropológicas de los cadáveres debido a su antigüedad.



Fotografía nº10.- Preparación de las muestras.

1.2.3. – Descripción de los métodos de extracción de ADN utilizados

Método 1.- Extracción inorgánica con Glass Milk (ver fig. nº 36): se realizó utilizando el kit “Isoresin™ Fast Kit” para ADN antiguo de la casa Master Diagnóstica. Dicha extracción se fundamenta en macerar el polvo de hueso con una solución que contiene un detergente, un tampón adecuado para preservar el ADN, proteinasa K para empezar a romper las células, y tiocianato de guanidina, todo ello a una temperatura adecuada. De esta manera el ADN va quedando libre, fuera de las células. Se añadió una resina de sílice cargada oportunamente para retener el ADN. En un ambiente de concentración de sales y pH adecuados, dicha resina capta sólo el ADN y deja en suspensión proteínas, restos de membrana, orgánulos, etc. Después se somete la muestra a varios lavados, a través de un filtro con una solución, que lleva una concentración de sales adecuada para que el ADN no se separe de la resina pero se eliminen todos los restos de proteínas y otros componentes que pudieran haber quedado atrapados entre al matriz silíceo. Finalmente se eluyó el ADN tratando la muestra con agua bidestilada o tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA sal disódica dihidratada 1 mM, pH 8.0) de manera que ahora el medio tiene un pH y una concentración de sales adecuada para que el ADN se separe de la resina, quedando libre en solución acuosa. De los varios protocolos a seguir que suministra el kit, se eligió el recomendado por uno de los usuarios, que brevemente consistía en:

1.- Se introdujeron de 0.4-0.5 gr de polvo de hueso en un tubo de 15 ml y se añadieron 5 ml de EDTA sal disódica dihidratada 0.5M pH 8.0, 200 µL. de proteinasa-K (20 mgr./mL.) para empezar a romper las células y 200 µL. de Dodecil Sulfato Sódico (SDS) al 10%. Se incubó la mezcla en un baño con agitación a 37°C durante 12-14 horas.

2.- Posteriormente se añadió a cada tubo 1 mL de “Solución Dehibernación A”, suministrada por el kit y consistente en Tiocianato de Guanidina. Se incubaron las muestras en el mismo baño anterior, esta vez a 60° C durante 2-4 horas.

3.- Se centrifugaron los tubos durante 2 minutos a 3.000 r.p.m. y se traspasó el sobrenadante a otro tubo de 15 ml, descartándose el precipitado. Se añadieron 1.2 mL de “Solución Fast DNA milk” consistente en la resina de sílice captadora de ADN y 3 mL de la anterior “Solución Dehibernación A”. Esta mezcla se incubó en baño con agitación a 37°C durante 2 horas.

4.- Se centrifugaron los tubos a 4000 r.p.m. durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Al precipitado se le añadieron 500 µL. de “Solución Salton-Wash-1” suministrada por el kit y se agitó para resuspender el precipitado de resina. Posteriormente se traspasó a un filtro “Isoresin Fast™” y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 r.p.m.

5.- Se descartó el filtrado del tubo colector y se añadieron 500 µL. de “Solución Salton Wash-2” suministrada por el kit al filtro. Se centrifugó durante 1 minuto a 13000 r.p.m.

6.- Se descartó la fase líquida del tubo colector y se añadieron 300 µL. de Acetona-Etanol 1:1 al filtro. Se centrifugó durante 1 minuto a 13000 r.p.m.

7.- Se descartó el filtrado del tubo colector y se añadieron 500 µL de “Solución de alcohol de lavado diluido” suministrada por el kit al filtro. Se centrifugó durante 1 minuto a 13000 r.p.m.

8.- Se descartó el filtrado del tubo colector y se centrifugaron los tubos durante 2 minutos a 13000 r.p.m. sin añadir nada al filtro para secar por completo la resina.

9.- Se colocaron los filtros en tubos colectores nuevos perfectamente rotulados y se añadieron 50 μ L. de "Solución de elución libre de ADN" suministrada por el kit. Se agitaron los tubos en vórtex durante sólo 2 segundos para no dañar los filtros y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 r.p.m. Se repitió esta última operación, quedando finalmente 100 μ L. de ADN en solución.

Método 2.- Extracción mediante Acetato Sódico (Cattaneo y cols., 1995) y posterior purificación con Centricon-100:

1.- Se pesaron 1.5 gr de polvo de hueso en un tubo de polipropileno y se añadieron 3 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 10mM, EDTA sal disódica dihidratada 10mM, NaCl 100mM, SDS al 2%, pH 8.0) y 25 μ L de proteinasa-K (20 mgr./mL.). Se incubó la mezcla durante toda la noche en baño a 42°C.

2.- Se añadió 1 ml de Acetato Sódico saturado y se agitó el tubo manualmente durante 30 segundos. Se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 minutos.

3.- Se decantó el sobrenadante (que contiene el ADN) a otro tubo y se le añadieron 4 ml de Isopropanol al 100%. Se pusieron los tubos en un rotor durante al menos 10 minutos para precipitar el ADN.

4.- Se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, conservándose el "*pellet*" de ADN en el fondo del tubo. Éste se resuspendió en 250 μ L. de Etanol al 70% y se transfirió a un tubo Eppendorf.

5.- Se centrifugó a 13500 r.p.m. durante 10 minutos y se secó el "*pellet*" en una estufa a 37°C. Finalmente se reconstituyó en 60 μ L. de agua bidestilada autoclavada.

6.- Posteriormente se purificó el ADN extraído mediante 1-3 lavados en tubos Centricon-100 (Amicon) con TE⁻⁴ (Tris-ClH 2,5 mM, EDTA sal disódica dihidratada 0,25 mM, pH 8.0).

Método 3.- La extracción orgánica mediante Fenol/Cloroformo/ alcohol Isoamílico se realizó siguiendo protocolo de Hochmeister (Hochmeister y cols., 1995) con ligeras modificaciones:

1.- Se introdujeron 5 gr de polvo de hueso en un tubo Falcon de 50 ml y se añadieron 40 ml de EDTA sal disódica dihidratada 0.5M a pH 8.0. Se tuvo en agitación a 4 °C durante 24 horas para descalcificar la muestra. Posteriormente se centrifugó la muestra a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante.

2.- Se lavó el polvo de hueso con 40 ml de tampón de extracción (EDTA sal disódica dihidratada 0.5M, sarcosyl al 0.5%, pH 8.0) y se centrifugó la muestra a 3500 r.p.m. durante 15 minutos descartándose el sobrenadante.

3.- La extracción de ADN se realizó añadiendo tampón de extracción (EDTA sal disódica dihidratada 0.5M, sarcosyl al 0.5%, pH 8.0) hasta un volumen final de 7 mL. Se añadieron 100 μ L. de proteinasa-K (20 mgr./mL.) y se incubó en baño a 37°C durante 12 horas.

4.- Se extrajo la solución 2 o 3 veces de manera convencional con Fenol/Cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y la fase acuosa se concentró repartida en varios tubos Centricon-100 (Amicon, USA) mediante tres lavados con

TE⁴. Finalmente se mezclaron las soluciones concentradas en uno de los tubos Centricon-100 para realizar 3 lavados con agua bidestilada autoclavada hasta obtener un volumen de 100-150 μ L.

Método 4.- La extracción **orgánica mediante F/C/I** y posterior purificación mediante Centricon y Resina de Sílice se realizó siguiendo protocolo de Krings y cols. (1997) con ligeras modificaciones:

- 1.- Se incubaron 0,4 gr de polvo de hueso en 1 mL de EDTA (pH 8.0) y sarcosyl al 5% en una rueda rotatoria a temperatura ambiente durante 40 horas.
- 2.- Se añadieron 10 μ L de proteinasa K (10 mgr/mL) y se incubó a 37°C durante otras 40 horas.
- 3.- Se centrifugó para separar los restos de tejido y el sobrenadante fue extraído con F/C/I según Hochmeister y cols. (1995).
- 4.- La fase acuosa se concentró mediante filtros Centricon-100 (Amicon, USA) y se incubó con 40 μ L de suspensión de sílice en 1mL tampón (Tiocianato de Guanidina 5M, Tris-ClH 0.1 M, pH 7.4) durante 15 minutos en una rueda rotatoria a temperatura ambiente según Hoss y Pääbo (1993).
- 5.- Se centrifugó para precipitar la sílica y se lavó un par de veces con 1 mL de Etanol al 70% y una vez con 1 mL de Acetona. Se dejó secar en estufa a 56°C, y se eluyó el ADN en dos alícuotas de 65 μ L con Tris-EDTA (pH 8.0) a 56°C.

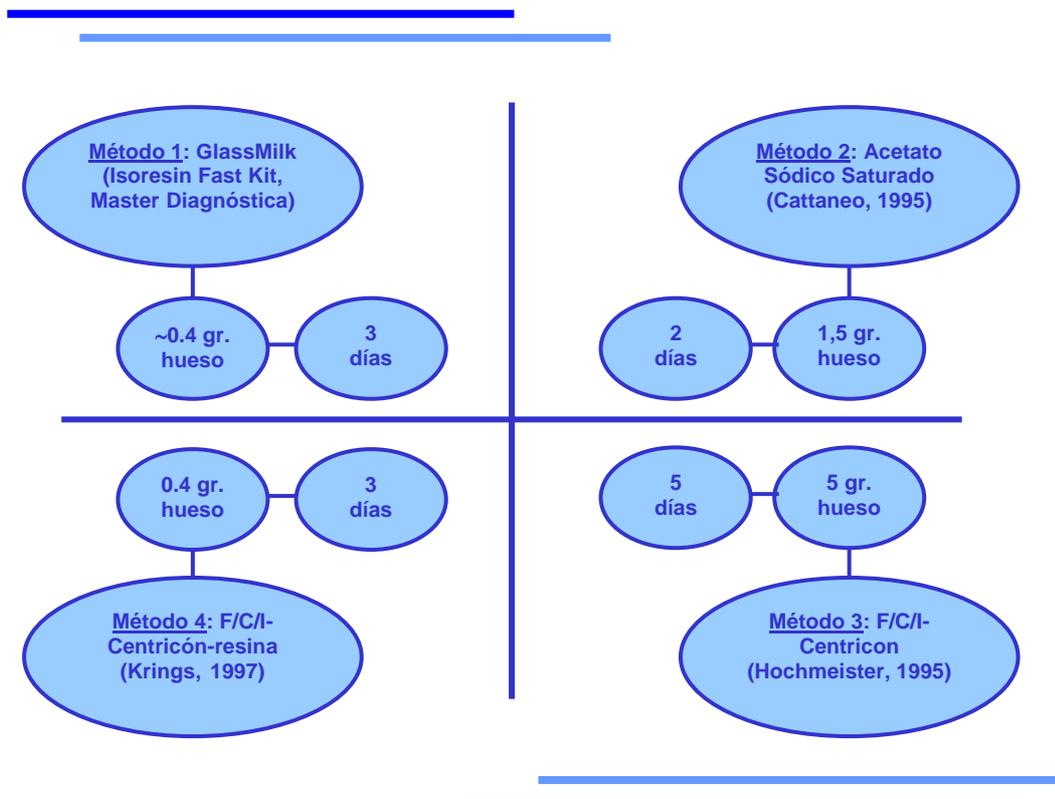


Figura nº 36.- Esquema de los cuatro métodos de extracción utilizados.

1.2.4.- Detección y cuantificación del ADN.

La detección de la presencia de ADN humano en las muestras objeto de estudio se realizó mediante la técnica de slot-blot con una sonda marcada complementaria a la secuencia de ADN D17Z1 alfa satélite específica de primates superiores. Dicha sonda tiene una longitud de 40 pares de bases. La técnica consiste en la hibridación de la sonda marcada con biotina con las muestras de ADN inmovilizadas en una membrana de nylon. Para ello se utilizó el kit comercial "Human DNA quantitation kit. Quantiblot" (Applied BioSystems, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando detección quimioluminescente. La cantidad de ADN que tiene cada muestra se determina mediante la comparación de la intensidad del marcaje con ADNs de cantidad conocida suministrados por el kit.

1.2.5.- Amplificación del ADN en reacciones "multiplex".

Se ha utilizado una reacción multiplex para amplificar loci de ADN nuclear, concretamente el decaplex "AmpliType Profiler Plus kit" (Applied BioSystems, USA) que contiene: D3S1358, vWF, FGA, Amelogenina, D8S1179, D21S11, D18S51, D13S317, D5S818 y D7S820. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador "GeneAmp 2400" (Applied BioSystems, USA). Se han seguido las recomendaciones del fabricante del kit con la excepción de que las amplificaciones se llevaron a cabo con la mitad del volumen especificado.

1.2.6.- Análisis del producto amplificado.

Para el análisis de estos marcadores se realizó una electroforesis capilar en un equipo ABI 310 (Applied BioSystems, USA), con un capilar de 47 cm x 50 μm (Applied BioSystems, USA) relleno de polímero POP-4TM (Applied BioSystems, USA). Los datos en bruto se recogieron con el software GeneScan Analysis 2.1 (Applied BioSystems, USA). La asignación de los alelos se realizó mediante comparación con la escalera alélica suministrada por el kit: D3S1358 (alelos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19), vWA (alelos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21), FGA (alelos 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29 y 30), amelogenina (alelos X e Y), D8S1179 (alelos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19), D21S11 (alelos 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36 y 38), D18S51 (alelos 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26), D5S818 (alelos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16), D13S317 (alelos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15) y D7S820 (alelos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15).

1.3.- RESULTADOS

La cantidad de ADN resultante para cada método de extracción se resume en la tabla nº 11 y los resultados del fenotipado en la tabla nº 12. En la tabla nº 13 se resume el porcentaje de éxito en la obtención de ADN y su tipado con cada método.

En cada método de extracción hemos respetado los gramos de partida descritos por sus autores, por ello, para valorar la cantidad de ADN total

extraída hemos tenido en cuenta la cantidad de muestra de la que se partió, aunque la comparación no puede realizarse cuando los resultados obtenidos son negativos. Por otro lado, también hemos realizado reacciones de PCR con el ADN extraído, con el fin de valorar si dicho ADN se encontraba libre de contaminantes y sustancias inhibitoras. Todos los controles negativos que se procesaron junto con las muestras dieron resultados negativos en cantidad de ADN y en la amplificación. En cada resto óseo, los resultados del fenotipado a partir de extractos de ADN obtenidos con los distintos protocolos siempre fueron coincidentes. En la mayoría de los casos se pudo comprobar la veracidad de los resultados porque se disponía de muestras indubitadas de los familiares de las víctimas. En los restos óseos más antiguos (G y H) se pudo comprobar la coincidencia sólo con el tipaje del sexo mediante amelogenina, comparando los resultados genéticos con las características antropológicas de los cadáveres.

En uno de los huesos (A) con todos los tipos de extracción se obtuvieron resultados tanto en la obtención de ADN (de 67.5 η gr a 136.4 η gr por gramo de hueso) como en su amplificación (todos los loci positivos).

Método 1: a pesar de haber obtenido resultados positivos en la cuantificación de ADN en 4 de los 8 casos extraídos mediante glass-milk (50% de éxito), sólo se pudo tipar satisfactoriamente uno de ellos (12,5%), por lo que pensamos que en estos extractos hay inhibidores de la PCR. En dos de las muestras se intentó la amplificación de ADN mitocondrial resultando también negativa.

Método 2: el protocolo descrito por Cattaneo presenta las ventajas de partir de poca muestra (1.5 gr) y de ser el más rápido, más económico y más fácil de llevar a cabo, si bien se pudieron obtener resultados tanto en la detección de ADN como en la amplificación en 5 de los 8 casos (62,5%); no se obtuvieron resultados en los casos más críticos: F, G y H.

Métodos 3 y 4: las extracciones según protocolos de Hochmeister y de Krings con F/C/I sólo dieron ADN detectable en 3 (42,8%) y 2 (28,6%) de siete casos respectivamente; sin embargo, los resultados en el tipaje fueron satisfactorios para al menos algún locus en los siete casos (los loci más pequeños amplificaron con mayor éxito que los más grandes). Creemos que esto se debe a que la cantidad de ADN extraído es mínima y por ello no detectable a veces con el método de cuantificación utilizado (Handt y cols., 1994), pero los extractos resultantes están libres de contaminantes. Cabe destacar que de estos dos métodos el primero parte de 5 gr y el segundo de 0,4 gr, si bien es más largo y tedioso el segundo de ellos. En uno de los casos se realizó una prueba partiendo de 1 gr en lugar de 5 y los resultados fueron igualmente satisfactorios.

Muestra	Tipo Extracción	Gr. de partida	Volumen obtenido	Concentración ADN	Cantidad total ADN	Cantidad por gr.
A (Fémur)	1	0.55	100 µL	0.75 ηgr/µL	75 ηgr	136.4 ηgr
	2	1.45	200 µL	0.75 ηgr/µL	150 ηgr	103.5 ηgr
	3	5	150 µL	4 ηgr/µL	600 ηgr	120 ηgr
	3	1	220 µL	0.425 ηgr/µL	93.5 ηgr	93.5 ηgr
	4	0.45	130 µL	0.215 ηgr/µL	28 ηgr	62.2 ηgr
B (Húmero)	1	0.8	100 µL	0.125 ηgr/µL	12.5 ηgr	15.6 ηgr
	2	1.44	160 µL	0.062 ηgr/µL	10 ηgr	7 ηgr
	3	4.5	125 µL	0.047 ηgr/µL	5.9 ηgr	1.3 ηgr
C (Fémur)	1	0.77	100 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	2	1.5	200 µL	0.015 ηgr/µL	3 ηgr	2 ηgr
	3	5	100 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	4	0.4	130 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
D (Fémur)	1	0.73	100 µL	0.094 ηgr/µL	9.4 ηgr	12.9 ηgr
	2	1.5	215 µL	0.094 ηgr/µL	20.2 ηgr	13.5 ηgr
	4	0.4	130 µL	0.015 ηgr/µL	2 ηgr	5 ηgr
E (Fémur)	1	0.67	100 µL	0.047 ηgr/µL	4.7 ηgr	7 ηgr
	2	1.44	115 µL	0.047 ηgr/µL	5.4 ηgr	3.75 ηgr
	3	4	125 µL	0.047 ηgr/µL	5.9 ηgr	1.5 ηgr
	4	0.4	130 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
F (Húmero)	1	0.5	100 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	2	1.48	240 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	3	5	150 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	4	0.45	130 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
G (Fémur)	1	0.5	100 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	2	1.5	100 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	3	5	140 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	4	0.4	130 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
H (Fémur)	1	0.46	100 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	2	1.5	120 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	3	5	140 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr
	4	0.45	130 µL	No ADN	0 ηgr	0 ηgr

Tabla nº 11.- Resultados en la detección de ADN y cantidad de ADN extraído. Tipos de extracción de ADN utilizados: Método 1: GlassMilk kit; Método 2: Acetato Sódico Saturado (Cattaneo y cols., 1995); Método 3: F/C/I-Centricon (Hochmeister y cols., 1995); Método 4: F/C/I-Centricon-Resina (Krings y cols., 1997).

Muestra	Tipo de Extracción	Profiler Plus
A	1	Todos los loci positivos
	2	Todos los loci positivos
	3	Todos los loci positivos
	4	Todos los loci positivos
B	1	Todos los loci negativos
	2	Todos los loci positivos
	3	Todos los loci positivos
C	1	Todos los loci negativos
	2	Todos los loci positivos menos D18S51
	3	Todos los loci positivos
	4	Todos los loci positivos menos FGA, D21S11, D18S51 y D7S820
D	1	Todos los loci negativos
	2	Todos los loci positivos menos D21S11, D18S51, D13S317 y D7S820
	4	Todos los loci positivos
E	1	Todos los loci negativos
	2	Todos los loci positivos
	3	Todos los loci positivos
	4	Todos los loci positivos menos D18S51
F	1	Todos los loci negativos
	2	Todos los loci negativos
	3	Todos los loci positivos menos D21S11, D18S51, D13S317 y D7S820
	4	Todos los loci negativos menos D3S1358 y Amelogenina
G	1	Todos los loci negativos
	2	Todos los loci negativos
	3	Todos los loci negativos menos Amelogenina y D8S1179
	4	Todos los loci negativos menos D3S1358, Amelogenina, D8S1179 y D5S818
H	1	Todos los loci negativos
	2	Todos los loci negativos
	3	Todos los loci positivos menos D18S51 y D7S820
	4	Todos los loci negativos menos D3S1358, vWA, Amelogenina, D8S1179 y D5S818

Tabla nº 12.- Resultados del tipaje. Tipos de extracción de ADN utilizados: Método 1: GlassMilk kit; Método 2: Acetato Sódico Saturado (Cattaneo y cols., 1995); Método 3: F/C/I-Centricon (Hochmeister y cols., 1995); Método 4: F/C/I-Centricon-Resina (Krings y cols., 1997).

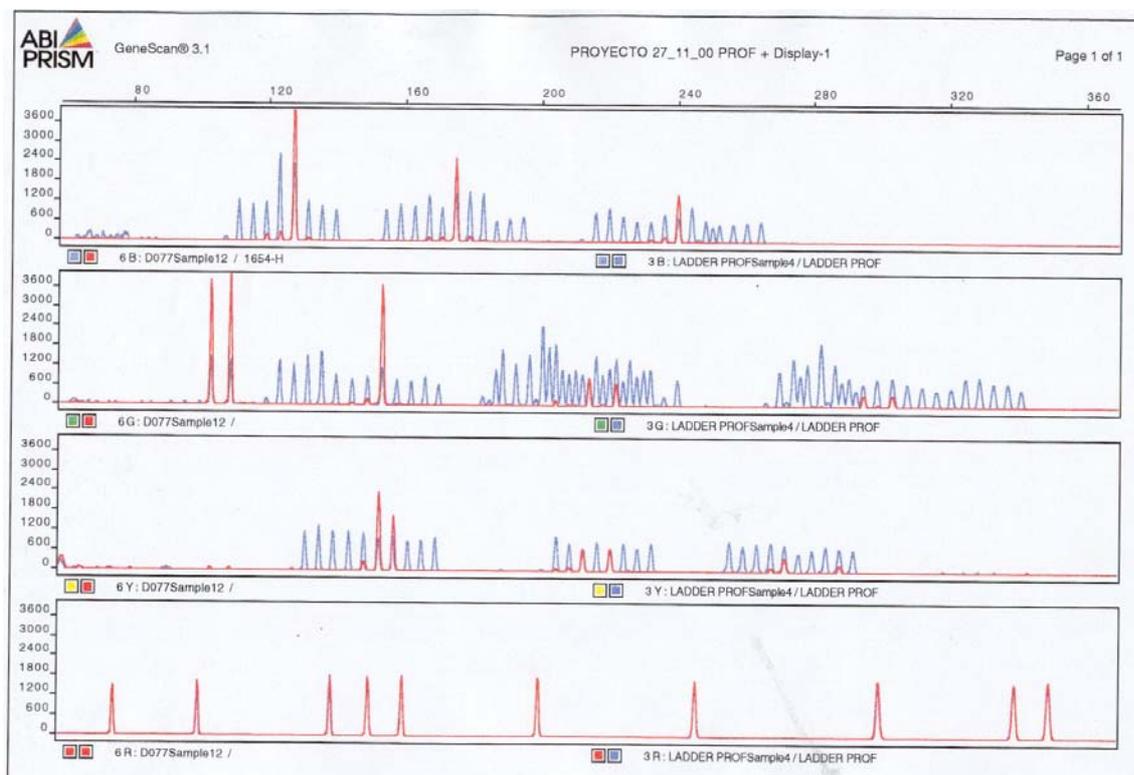
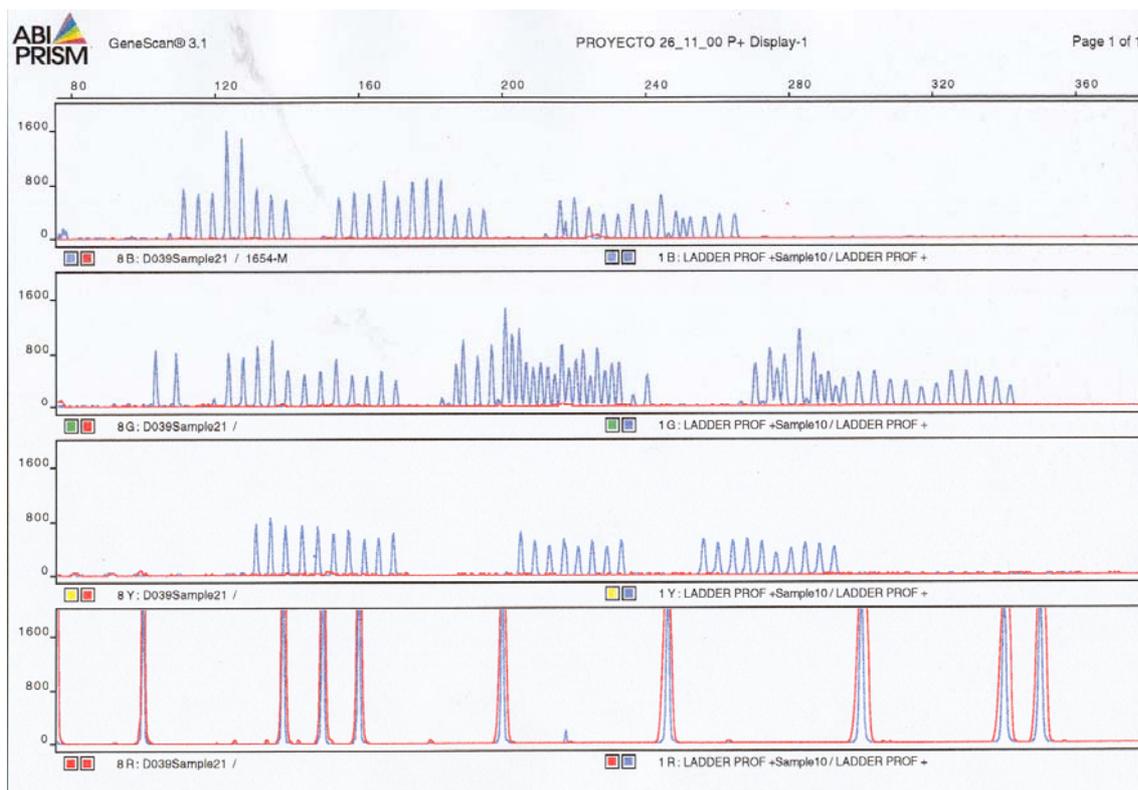


Figura nº 37.- Electroferogramas de la muestra E. Arriba: extracción mediante método 1 (GlassMilk kit) en el cual se observan todos los loci negativos (picos azules: ladder; picos rojos del cuarto panel: estándar de tamaño). Abajo: extracción mediante el método 3 (F/C/I-Centricon, Hochmeister y cols., 1995 con modificaciones) donde puede observarse que todos los loci amplifican (picos rojos en primer, segundo y tercer panel: alelos resultantes; picos azules: ladder; picos rojos cuarto panel: estándar de tamaño).

Tipo de Extracción	% éxito en obtención ADN humano	% éxito en amplificación de al menos un marcador
1	50	12,5
2	62,5	62,5
3	42,8	100
4	42,8	100

Tabla nº 13.- Porcentaje de éxito en la obtención de ADN humano y en el tipaje (éste último apartado calculado sobre muestras totales independientemente de si se detectó o no se detectó ADN en la cuantificación). Tipos de extracción de ADN utilizados: Método 1: GlassMilk kit; Método 2: Acetato Sódico Saturado (Cattaneo y cols., 1995); Método 3: F/C/I-Centricon (Hochmeister y cols., 1995); Método 4: F/C/I-Centricon-Resina (Krings y cols., 1997)

1.4.- CONCLUSIONES

Los métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos que mejores resultados han ofrecido en cuanto a tipado son los descritos por Hochmeister (F/C/I-Centricon) y Krings (F/C/I-Centricon-resina de sílice) y creemos que en muestras críticas deben ser los utilizados. Sin embargo, en los casos en los que se requiera procesar gran número de muestras (identificación de cadáveres en grandes catástrofes o genocidios por ejemplo), el método de extracción de ADN a elegir primeramente en la identificación genética de rutina podría ser la precipitación con acetato sódico (Cattaneo y cols., 1997) añadiendo una fase de purificación posterior a la extracción. Este método se realiza a partir de una cantidad de muestra relativamente pequeña, es sencillo, de bajo coste y muy rápido (dos días) (Prieto y cols., 2000).

Hemos comprobado en este análisis que al intentar amplificar una batería de marcadores, los de menor tamaño siempre dan mejores resultados que los marcadores más grandes. Esto es lógico, ya que es menos probable que una región corta de ADN esté dañada en todas sus copias, que lo esté una región grande. Como han descrito otros autores, existe una relación inversa entre la eficacia de las amplificaciones vía PCR y la longitud de los productos de amplificación. La detección de alelos de loci cuyo tamaño es muy largo requiere mayor cantidad de ADN molde de alto peso molecular que la detección de alelos de loci más pequeños (Takahashi y cols., 1997). Pääbo (1989) observó que las amplificaciones PCR de fragmentos 12S de restos de tejidos blandos de animales ya extinguidos, estaban generalmente limitadas a menos de 150 pares de bases de longitud.

Para conseguir optimizar los resultados en muestras que contienen ADN degradado podemos elegir moldes que sean fragmentos pequeños de ADN. Por ello, si lo que realmente nos interesa es estudiar una región de mayor longitud, 400 pares de bases por ejemplo, siempre podremos recurrir al estudio de dicha región amplificándola por partes. Podemos realizar amplificaciones con cinco pares de cebadores y así ir amplificando regiones que se solapen y que juntas formen el fragmento de 400 pares de bases que nos interesa.

2.- OBJETIVO B.: OPTIMIZACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN EN EXTRACTOS DE ADN CRÍTICOS.

2.1.- INTRODUCCIÓN

En este apartado pretendemos probar la eficacia de tres posibles estrategias a seguir para conseguir la amplificación en extractos de ADN críticos:

Objetivo B.1.: Doble PCR: suponemos que algunos extractos de ADN procedentes de muestras críticas pueden contener cantidades de ADN tan mínimas que no sean suficientes para poder detectarlas tras una reacción de amplificación. Por ello someteremos un grupo de extractos de ADN procedente de muestras antropológicas a dos reacciones de PCR consecutivas con el fin de verificar si con ello mejoran los resultados y el poco ADN que puedan contener es copiado múltiples veces y finalmente puede ser tipado.

Objetivo B.2.: Purificaciones: Existen algunas muestras forenses en las que se detecta ADN de origen humano y sin embargo no producen resultado alguno en el tipaje, es decir, en la reacción de PCR. Esto nos hace pensar en la presencia de sustancias inhibidoras de la enzima Taq polimerasa que se han co-extraído junto con el ADN de la muestra problema, o en su elevada degradación. En este apartado pretendemos probar distintas técnicas que nos ayuden a retirar o inactivar estas sustancias inhibidoras.

Objetivo B.3.: Preamplificación sin cebadores: En muestras que contengan ADN muy degradado estudiaremos la posibilidad de mejorar los resultados de la PCR basándonos en un tratamiento previo que permita que se generen nuevas copias de ADN molde a partir de alguna copia que pueda permanecer intacta o a partir de la reorganización de fragmentos de ADN solapantes.

2.2.- DOBLE PCR

Es fácil pensar, cuando se trabaja con muestras forenses de escaso contenido en ADN, que la manera más rápida de aumentar la cantidad de dicho ADN es realizar dos reacciones de amplificación consecutivas. Cuando no logramos detectar ningún producto de amplificación tras la realización de una PCR podemos pensar que se debe a varias causas: por la presencia de inhibidores en la muestra, porque no exista ninguna copia intacta del fragmento de ADN a amplificar en nuestra muestra, o porque las copias presentes en la muestra son tan escasas que aunque se ha producido amplificación la señal es tan débil que no somos capaces de detectarla.

Si nos encontramos ante el último caso podemos tomar una alícuota de nuestra primera reacción de amplificación y someterla de nuevo a otra reacción de amplificación del mismo fragmento. En la primera PCR se habrán formado

algunas copias que pueden servir de ADN molde para la segunda reacción PCR.

Somos conscientes de los **peligros de contaminación** que podemos encontrarnos al realizar dobles PCRs. Este tipo de análisis es un arma de doble filo, pues teóricamente a partir de una sola molécula de ADN molde se pueden obtener resultados (Saiki y cols., 1988; Li y cols., 1988); si existen pequeñas cantidades de ADN contaminante en las muestras, también serán copiadas exponencialmente y nos pueden dar falsos positivos. Las mayores fuentes de contaminación con producto amplificado se producen vía aerosoles generados durante el procesamiento de las muestras, como la apertura de los tubos de microcentrífuga, el pipeteo, la expulsión de las puntas de pipeta, etc. Para evitar en lo posible dichas contaminaciones, tomaremos algunas **precauciones** además de las ya descritas en el capítulo 4 dedicado a la reacción en cadena de la polimerasa:

- Máxima **meticulosidad** en la manipulación de las muestras (centrifugación rápida de los tubos antes de abrirlos, cambio de guantes frecuentemente teniendo cuidado de tapar también las muñecas, abrir y cerrar los tubos cuidadosamente, añadir los reactivos de amplificación al tubo antes de añadir el ADN y taparlo antes de añadir ADN al siguiente tubo, etc.)

- **Irradiación con luz UV** del material utilizado y reactivos donde esto sea posible para inactivar el posible ADN contaminante presente (Cone y Fairfax, 1993).

- **Separación física de zona pre y post PCR.** En la zona pre-PCR se pesarán los reactivos, se prepararán los tampones, se extraerá el ADN, se realizarán los “stocks” para la PCR y se preparará la propia reacción PCR; se habilitará una zona intermedia para realizar la segunda reacción de PCR a partir de los productos recién amplificados y por último, en la zona post-PCR se procesarán los productos doblemente amplificados para su fenotipado.

- Preparación de las reacciones siempre en **campana de seguridad** biológica.

- Uso de **juego de pipetas exclusivo** para ADN extraído y juego de pipetas exclusivo para ADN amplificado. Uso de puntas de pipeta con filtro para todas las soluciones.

- **Alicuotar** los reactivos para evitar usarlos un repetido número de veces.

- Uso de **controles negativos** sin ADN molde en todas las reacciones, tanto en la extracción de ADN como en la amplificación del mismo. La contaminación será evidente si se logra algún tipo de amplificación en estos controles negativos en los que no hemos añadido ADN molde o cuando se obtienen más de dos alelos en las muestras analizadas donde sólo esperábamos obtener un único genotipo.

Por otra parte, para sacar el máximo partido a muestras que contienen escasa cantidad de ADN molde hemos elegido el estudio de varios sistemas genéticos en una sola reacción PCR (**reacción “multiplex”**). De esta manera nos ahorramos el gasto de ADN que supone realizar distintas amplificaciones PCR en distintos tubos de reacción.

Utilizaremos para ello el kit comercial de la casa Applied BioSystems (USA) “Polymarker”, capaz de tipar cinco loci diferentes como se representa en la figura nº 38 (ver Polymarker en el apartado “Tipos de polimorfismos”). Las ventajas de utilizar kits comerciales se basan en la seguridad en la preparación y la calidad de los reactivos, y en que se disminuye la cantidad de veces que hay que pipetear dichos reactivos. De hecho, en el kit elegido vienen premezclados los productos necesarios para realizar la amplificación (tampón de amplificación, dNTPs, Taq polimerasa, Cl₂Mg) y sólo hay que añadir los cebadores (seis pares de cebadores ya preparados) y nuestro ADN. De esta forma se evitan errores en el pipeteo y se reducen las posibilidades de contaminación.

Las reacciones de amplificación dobles han sido utilizadas por otros autores para el estudio de muestras de ADN muy antiguo como Hauswirth y cols. (1991), que estudiaron restos humanos de hace 8000 años o Horai y cols. en 1989. Pero no se han intentado estos análisis dobles amplificando varios loci a la vez como en nuestro caso.

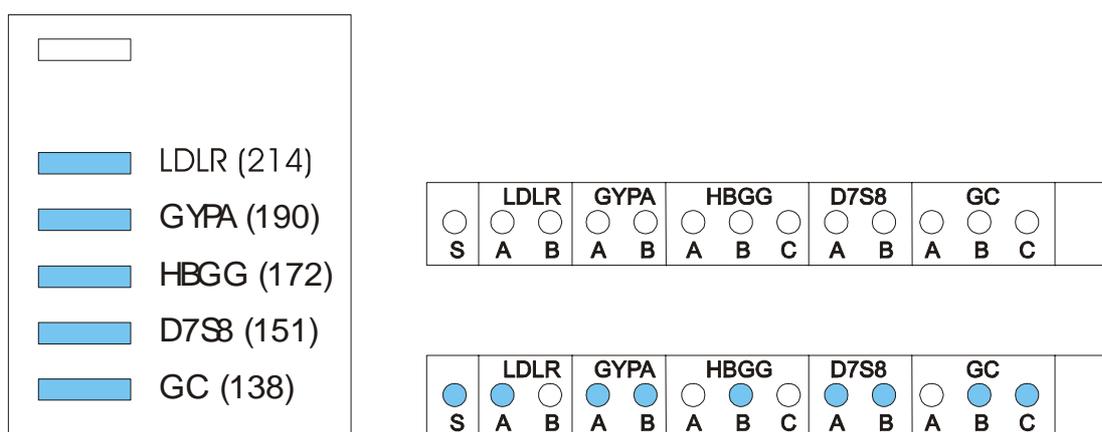


Figura nº 38.- Multiplex Polymarker. Izquierda: esquema de gel que muestra la separación del producto amplificado por tamaños. Los loci incluidos en el kit son: LDLR (214 pb), GYPA (190 pb), HBGG (172 pb), D7S8 (151 pb) y Gc (138 pb). Dercha: esquema de las tiras de tipado del producto amplificado mediante hibridación (dot-blot reverso). La tira superior representa el estado inicial antes de la hibridación y la inferior una vez hibridada: S: señal (control positivo del funcionamiento de la hibridación); LDLR: genotipo AA; GYPA: genotipo AB; HBGG: genotipo BB; D7S8: genotipo AB; GC: genotipo BC).

2.2.1.- MATERIALES Y METODOS

2.2.1.1.- Tipos de muestras analizadas:

Para este tipo de análisis se han elegido muestras (dientes) del País Vasco y Navarra (España) pertenecientes a tres Períodos. Los extractos de ADN de dichas muestras fueron cedidos amablemente por la Sección de Antropología del Departamento de Biología Animal de la Facultad de Biología (Universidad de Barcelona). Incluían las siguientes poblaciones:

a) Doce muestras de **Atxuri** (Vizcaya). Períodos **Neolítico y Calcolítico** (5000-3600 años a. C.). A este grupo de muestras las denominamos con el prefijo AT.

b) Dos muestras de **Urbiola** (Navarra). **Edad de Bronce** temprana (3700 años a.C.). Este grupo de muestras se denominó con el prefijo UR-.

c) Cuatro muestras de **Garai** (Vizcaya). **Siglos XI a XIII** d.C. Este grupo de muestras se denominó con el prefijo GA-.

Sólo se estudiaron dientes que estuvieran especialmente bien conservados. Aún así, esperábamos que el ADN que pudiera haber presente en este tipo de muestras tan antiguas sería escaso y estaría altamente degradado, de manera que cumpliría las condiciones fundamentales para nuestros estudios.

La limpieza de este tipo de restos se realizó en el Departamento de Biología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona siguiendo la propuesta hecha por Ginther (Ginther y cols. 1992) con ligeras modificaciones:

1.- Se sumergieron los dientes en ácido clorhídrico al 15% durante diez minutos para retirar la suciedad y los depósitos de carbonato.

2.- Posteriormente, se sumergieron en etanol al 70% durante treinta minutos y en agua destilada durante otros treinta para retirar los residuos ácidos.

3.- Finalmente, se irradiaron los dientes con luz UV a 254 nm durante 10-15 minutos para eliminar el posible ADN exógeno a la muestra.

4.- Las muestras fueron convertidas en fino polvo mediante un molinillo refrigerado con nitrógeno líquido (Speex Industries Inc.) y el polvo resultante fue almacenado en tubos de plástico estériles (Corning 50 mL) a una temperatura de -20°C . Los tubos y los impactadotes del molinillo se limpiaron con etanol y agua destilada y se sometieron a luz ultravioleta durante diez minutos para su esterilización.

2.2.1.2.- Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó, igualmente en la Universidad de Barcelona, de manera orgánica mediante F/C/I y posterior purificación y concentración mediante Centricon-30 siguiendo protocolo descrito por Hagelberg (Hagelberg y cols., 1994b):

1.- Las muestras convertidas en polvo se lavaron mediante la adición de EDTA 0.5M a pH 8.0 y posteriormente se centrifugaron. Se descartó la fase acuosa y el lavado se repitió dos o tres veces para retirar la coloración marrón de posibles contaminantes de la muestra.

2.- Cada muestra se incubó con 10 mL de tampón de lisis que contenía 8.5 mL de EDTA 0.5M pH 8.0-8.5, 1 mL de SDS al 5%, 0.5 mL de Tris 1M y 100 μL de proteinasa K (10 mgr./ mL) a 37°C con agitación durante toda la noche.

3.- Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y el sobrenadante se almacenó en otros tubos estériles para la extracción convencional con fenol / cloroformo (1:1).

4.- Las muestras resultantes se concentraron y purificaron mediante ultrafiltración con Centricon-30 (Amicon Inc.), añadiendo 10 mL de agua destilada en cada una de las 5 centrifugaciones consecutivas a 4000 r.p.m. durante 30 minutos. El volumen final obtenido fue de 100-500 μ L.

2.2.1.3.- Protocolo de Amplificación y Tipaje.

Para las reacciones de amplificación se ha utilizado el kit comercial "Amplitype[®] PM PCR amplification and typing kit" (Perkin Elmer, USA), que incluye en una sola reacción los loci: DQA1 (sistema HLA), LDLR (Receptor de lipoproteínas de baja densidad), GYPA (Glicoforina A), HBGG (Gamma-hemoglobina G), D7S8 pb y Globulina Gc (Componente específico de grupo). Todo el protocolo de amplificación se realizó en un ambiente estéril y de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se prepararon las reacciones PCR en un volumen final de 50 μ L que contenían 9 μ L de ADN extraído de los dientes, 20 μ L de mix de reacción proporcionada por el fabricante del kit, 20 μ L de solución de cebadores y 1 μ L de albúmina bovina (BSA) a una concentración final de 160 mg/mL. Las muestras se introdujeron en un termociclador 480 (Perkin Elmer, USA) y se aplicó el siguiente programa durante 32 ciclos:

Desnaturalización: 1 minuto a 94°C

Apareamiento: 1 minuto a 60°C

Extensión: 1 minuto a 72°C.

Los resultados de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis submarina (100V/60min.) en gel de agarosa al 4% (NuSieve 3: Seakem 1). Posteriormente se realizó una **segunda amplificación** de la misma manera que la anterior en cuanto a composición pero añadiendo como ADN molde 4 μ L del anterior producto PCR mezclados con 5 μ L de agua destilada. El programa de amplificación usado en el termociclador fue el mismo que el anterior pero solo desarrollado durante 30 ciclos.

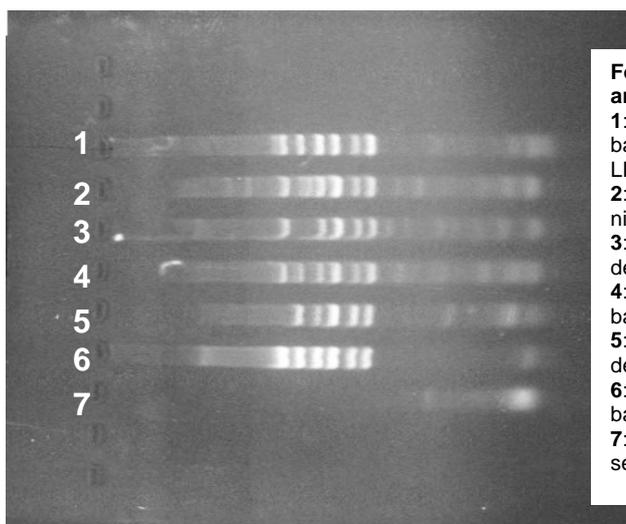
Los productos de reacción definitivos fueron visualizados igualmente mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 4 %. Posteriormente se realizó el tipaje mediante Dot Blot inverso con el kit comercial anteriormente mencionado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con ello se consiguen tipar los marcadores LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y Gc, ya que el kit no incluye las sondas necesarias para el marcador DQA1. Como control positivo para todas las amplificaciones se usó el control DNA1 suministrado por el fabricante. Como control negativo se usó agua bidestilada. La segunda reacción de PCR y el tipaje se llevó a cabo al menos dos veces en cada muestra.

2.2.2.- RESULTADOS

Las amplificaciones estándar del kit Polymarker producen una escalera de seis bandas clarísimas en gel de agarosa. Tras la primera amplificación no se observó señal en el minigel de agarosa en ninguna muestra salvo la

reseñada como UR-95 (que ya en la primera amplificación daba resultados clarísimos) y en las utilizadas como control positivo.

Tras la segunda amplificación y en el caso de las muestras antiguas estudiadas se obtuvieron bandas claras en por lo menos tres de los seis loci. Los sistemas dañados o no amplificados no producían señal en el gel y por ello tampoco la producían en el sitio correspondiente de la tira de tipaje. En el caso del ADN fresco utilizado como control positivo se observaba una elevadísima señal en el gel de agarosa así como en la tira de tipaje (Fotografías nº 11, nº 12, nº 13 y nº 14).

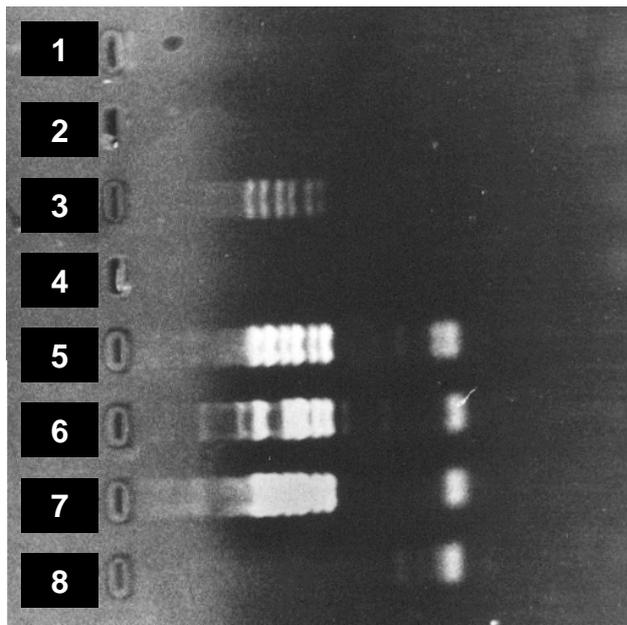


Fotografía nº 11.- Minigel tras segunda amplificación:

- 1: muestra AT119, donde pueden observarse las seis bandas correspondientes a los seis loci (DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y Globulina GC).
- 2: muestra UR71, donde puede observarse la falta de nitidez a la altura del locus LDLR.
- 3: muestra AT124, donde puede observarse ausencia de amplificación en LDLR.
- 4: muestra UR98, donde pueden observarse las seis bandas pero con distinta intensidad.
- 5: muestra AT122, donde puede observarse ausencia de amplificación en el locus DQA1.
- 6: control positivo, donde pueden observarse las seis bandas con gran intensidad.
- 7: control negativo, donde puede observarse que no se ha producido amplificación.

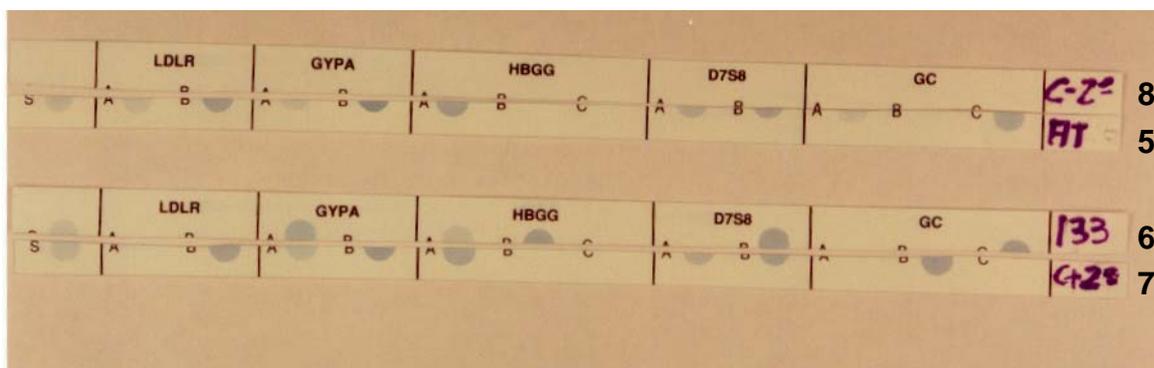


Fotografía nº 12.- Fenotipaje tras la segunda amplificación.- 1: muestra AT119, donde puede observarse señal en los cinco loci (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y Globulina GC). 2: muestra UR71, donde puede observarse una gran diferencia en la intensidad de los alelos del locus LDLR. 3: muestra AT124, donde puede observarse ausencia de señal en LDLR. 4: muestra UR98, donde pueden observarse señal en los cinco loci. 5: muestra AT122, donde puede observarse señal en los cinco loci, pero ausencia de señal en el control interno. 6: control positivo, donde pueden observarse señal en todos los loci. 7: control negativo, donde puede observarse ausencia de señal en todos los loci.



Fotografía nº 13.- Minigel tras primera y segunda amplificación:

1: muestra AT117 tras 1ª amplificación, donde puede observarse ausencia de las seis bandas .
 2: muestra GA133 tras 1ª PCR, donde puede observarse la falta de amplificación de todos los loci.
 3: control positivo tras 1ª PCR, donde pueden observarse las seis bandas correspondientes a los seis loci amplificados.
 4: control negativo tras 1ª PCR, donde puede observarse que no se ha producido amplificación.
 5: muestra AT117 tras 2ª PCR, donde puede observarse amplificación en los seis loci.
 6: muestra GA133 tras 2ª PCR, donde puede observarse ausencia de amplificación en el locus LDLR.
 7: control positivo tras 2ª PCR, donde puede observarse amplificación en los seis loci con gran intensidad.
 8: control negativo tras 2ª PCR, donde puede observarse que no se ha producido amplificación.



Fotografía nº 14.- Tipaje tras la segunda amplificación.- 5: muestra AT117, donde puede observarse señal en los cinco loci (LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 y Globulina GC). 6: muestra GA133, donde puede observarse ausencia de señal en LDLR. 7: control positivo, donde pueden observarse señal en todos los loci. 8: control negativo, donde puede observarse ausencia de señal en todos los loci.

En la tabla nº 14 podemos ver un resumen de los resultados de las dobles PCRs; se realizaron varias reacciones en cada muestra:

MUESTRA	RESULTADOS EN MINIGEL DE LA SEGUNDA PCR						CONTROL NEGATIVO
	DQA1	LDLR	GYPA	HBGG	D7S8	GC	
AT-117	+	+	+	+	+	+	-
	+	-	+	+	+	+	-
	+	-	+	+	+	+	-
AT-118	+	+	+	+	+	+	D7S8
	+	+	+	+	+	+	GC
AT-119	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	-
AT-120	+	+	+	+	+	+	-
	+	-	+	+	+	+	-
	-	-	+	+	+	+	-
AT-121	+	+	+	+	+	+	D7S8
	+	+	+	+	+	+	GC
AT-122	+	+	+	+	+	+	GYPA
	-	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	-	+	+	GC
AT-123	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	GC
AT-124	-	-	+	-	+	+	GYPA
	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	GC
AT-125	+	-	+	+	+	+	-
	-	-	-	+	+	+	-
	-	-	-	+	+	+	-
AT-126	+	+	+	+	+	+	D7S8
	+	+	+	+	+	+	GC
GA-132	+	+	+	+	+	+	-
	-	+	+	+	+	+	GC
	+	+	+	+	+	+	GC
GA-133	+	-	+	+	+	+	-
	-	-	-	+	+	+	-
	+	-	+	+	+	+	-
GA-136	+	+	+	+	+	+	GYPA
	+	+	+	+	+	+	GC
GA-138	-	+	-	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	GC
	+	+	+	+	+	+	GC
UR-71	+	+	+	+	+	+	-
	-	+	-	+	+	+	-
	-	+	-	+	+	+	-
UR-85	+	+	+	+	+	+	GYPA
	+	-	+	+	+	+	GC
UR-95	+	+	+	+	+	+	GYPA
	+	+	+	+	+	+	GC
	+	+	+	+	+	+	GC
UR-98	+	+	+	+	+	+	-
	-	-	+	+	+	+	-
	-	-	+	+	+	+	-

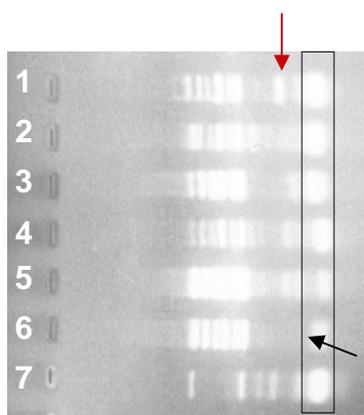
Tabla nº 14.- Resultados de las amplificaciones en el minigel de agarosa. El signo + significa que se obtuvo señal a la altura del marcador; el signo - significa que no se obtuvo señal alguna. En la columna del control negativo se especifican los marcadores en los cuales aparecía señal.

El dot blot inverso produjo varios tipos de resultados (ver tabla nº 15). De acuerdo con el protocolo del fabricante, sólo fueron consideradas para el estudio las tiras con hibridación en el punto control (señal). Algunos de los controles negativos que se veían contaminados en el minigel de agarosa (Fotografía nº 15) no daban señal en el punto control de la tira, aunque sí la daban en el marcador contaminado (Fotografía nº 16). La muestra AT-95 fue amplificada y tipada ya en la primera reacción PCR y mostraba un patrón invariable de hibridación en tres repeticiones. Otras muestras mostraban variación en los fenotipos cuando se repetían, probablemente debido al efecto “jumping PCR” o a hibridaciones inespecíficas.

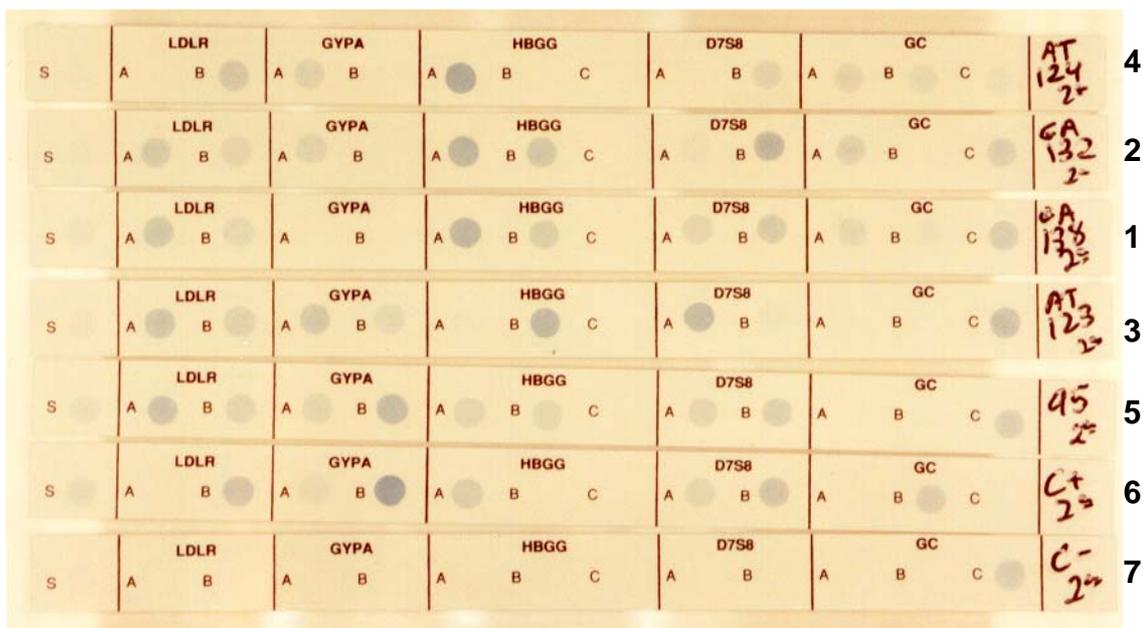
Solo logramos tipar 10 de las 18 muestras analizadas que se repitieron y por lo menos uno de los cinco marcadores fue tipado con resultados iguales en cada repetición.

MUESTRA	LOCI TIPADOS	RESULTADO
UR-95	TODOS en la 1ª PCR	AB, AB, AB, AB, CC
AT-118	GYPA, HBGG	AB, AB
AT-119	D7S8, GC	AA, AC
AT-121	LDLR, GYPA, HBGG	AB, AB, AB
AT-123	LDLR	AB
AT-124	HBGG, D7S8	AA, BB
AT-126	LDLR	BB
GA-132	GYPA	AA, AA, AA
GA-136	LDLR, HBGG, D7S8	AB, AB, AB
GA-138	D7S8	AB

Tabla nº 15.- Resultados del tipaje mediante Dot Blot inverso.



Fotografía nº 15.- Minigel tras segunda amplificación: en el recuadro aparecen los primers sobrantes de la amplificación. 1: muestra GA138, donde puede observarse amplificación de todos los loci y formación de productos inespecíficos (flecha roja). 2: muestra GA132, donde puede observarse amplificación de todos los loci y formación de productos inespecíficos. 3: muestra AT123, donde pueden observarse las seis bandas y formación de productos inespecíficos. 4: muestra AT124, donde pueden observarse las seis bandas y formación de productos inespecíficos. 5: muestra 95, donde puede observarse amplificación en los seis loci con gran intensidad, ya que esta muestra daba señal incluso en la 1ª PCR. También aparecen amplificados inespecíficos. 6: control positivo, donde puede observarse amplificación en los seis loci con gran intensidad y sin formación de productos inespecíficos de menor tamaño que el locus más pequeño (flecha negra) . 7: control negativo, donde puede observarse contaminación en los loci DQA1 y Gc, así como una elevada formación de productos inespecíficos.



Fotografía nº 16.- Tipaje tras segunda amplificación: 1: muestra GA138, donde puede observarse amplificación de todos los loci y señal (S) muy tenue. 2: muestra GA132, donde puede observarse amplificación de todos los loci y señal muy tenue. 3: muestra AT123, donde puede observarse amplificación en todos los loci. 4: muestra AT124, donde puede observarse amplificación en todos los loci pero aparecen tres alelos en GC (posiblemente producto inespecífico o contaminación) y ausencia de señal en S. 5: muestra 95, donde puede observarse amplificación en los seis loci. 6: control positivo, donde puede observarse amplificación en los seis loci. 7: control negativo, donde puede observarse contaminación en el locus GC, así como ausencia de señal en S.

2.2.3.- DISCUSIÓN

Como conclusión diremos que creemos que los resultados obtenidos se han de valorar con enorme precaución y por ello no realizaremos una valoración en cuanto al porcentaje de éxito. Nos hemos encontrado con gran variedad de resultados, que en general, no son buenos fundamentalmente por dos hechos:

1º) Hemos detectado señal para algún marcador en la segunda PCR de algunos controles negativos. En estos casos no se han tenido en cuenta los resultados de la amplificación para dicho locus en el resto de muestras amplificadas a la vez que el mencionado control negativo.

2º) Algunas muestras no dieron resultados reproducibles en el tipaje, resultando cada vez un tipaje distinto en las diferentes repeticiones.

A pesar de las precauciones que se tomaron para minimizar al máximo la posibilidad de contaminación con ADN exógeno a las muestras, esto no se ha conseguido. Podemos ver que en algunas de las segundas amplificaciones aparece alguna banda en el minigel de agarosa en el control negativo o blanco. En las amplificaciones donde ha ocurrido esto no se han tenido en cuenta los resultados de las demás muestras. Al tipar los controles negativos contaminados en algún locus vimos que el resultado no coincidía con el genotipo de quien realizó el análisis. Aún así sospechamos que en los loci sin señal en el control negativo no está descartada la contaminación, ya que se obtienen resultados en los loci de mayor tamaño en muchos casos (LDLR,

GYPA), hecho que no es compatible con la hipótesis de que estas muestras son críticas y contendrán sólo fragmentos de ADN molde de pequeño tamaño.

Podemos observar que a veces una misma muestra ha dado resultados diferentes en el tipaje. Creemos que esto puede ser debido a un mecanismo denominado “**jumping PCR**” (Pääbo y cols., 1990b; Lawlor y cols., 1991; DeSalle y cols., 1993). Se trata de la formación de productos quiméricos como resultado de la extensión incompleta de las cadenas durante la PCR. La presencia de secuencias quiméricas sugiere que el ADN substrato se encuentra dañado, como es de esperar en este tipo de muestras (Lawlor y cols., 1991). Cuando el ADN no se encuentra degradado posee ambos sitios de unión a los pares de primers y la PCR se desarrolla de forma exponencial sin problemas (ver fig. nº 39A). Por el contrario, la amplificación de segmentos degradados de dos alelos homólogos por ejemplo (A y B) es poco eficaz durante los ciclos iniciales. En la figura nº 39B podemos observar que los alelos A y B poseen solo uno de los dos sitios de unión a los primers requeridos y serán amplificados en progresión aritmética, como productos de hebra simple. Si existe alguna región del alelo A que solape con el alelo B, se pueden formar alelos quiméricos no reales que amplifiquen de manera exponencial, pues ya están disponibles los dos sitios de unión a los primers (Prieto y cols., 1995; Prieto y cols., 1996).

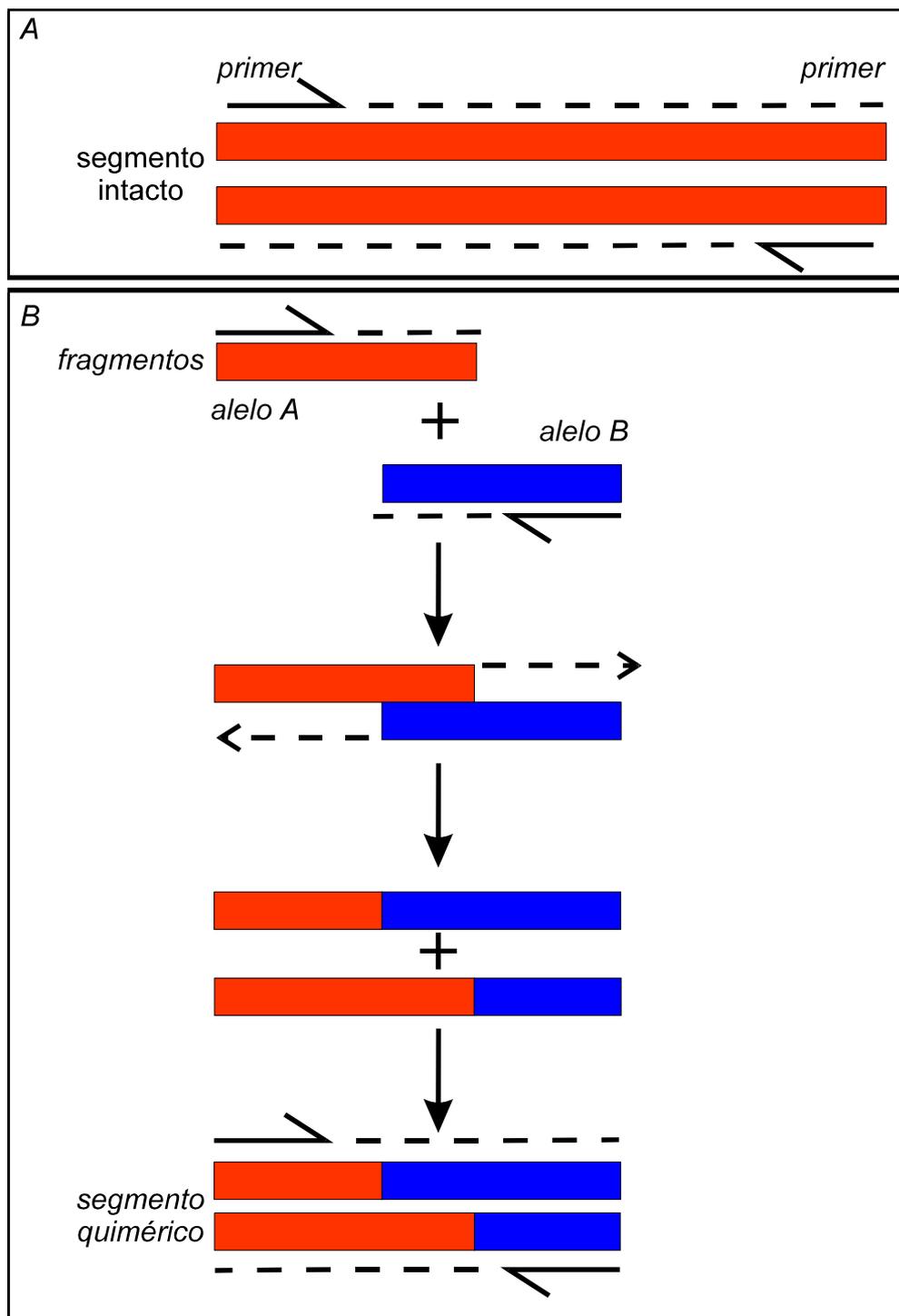


Figura nº 39.- "Jumping PCR". A: amplificación de un segmento de ADN intacto. B: amplificación de fragmentos de ADN degradados.

2.3.- DOBLES PURIFICACIONES.

Existen fundamentalmente dos tipos de inhibición enzimática, la competitiva y la no competitiva. En la primera, la sustancia inhibidora compite con el sustrato por la unión al centro activo de la enzima; y en la segunda el inhibidor no se une al centro activo sino más bien a algún otro grupo situado sobre la molécula de la enzima, que es esencial para su función (Lehninger, 1981). Ambos tipos de inhibiciones son dependientes de la concentración de la sustancia inhibidora. Si la concentración de tales sustancias es demasiado baja, no se inactivarán todas las moléculas de enzima presentes en la mezcla de reacción pues no hay suficientes moléculas inhibidoras para ello. En nuestra experiencia en el campo forense hemos comprobado múltiples veces que la realización de diluciones (en extractos en los que hemos detectado ADN (mediante QuantiBlot) pero que luego no amplifican) puede mejorar los resultados si la ausencia de amplificación se debe a la presencia de inhibidores. Sin embargo, también nos encontramos a veces ante muestras en las cuales a pesar de haber intentado la amplificación de loci con diferentes diluciones, los resultados son negativos.

Como hemos visto en la parte teórica de este trabajo existen muchos tipos de inhibidores de la Taq polimerasa, algunos de elevado tamaño molecular (proteínas como la hemoglobina o el colágeno) y otros mucho más pequeños (afidicolina, ácido fosfonoacético y ácido fosfonofórmico), así como inhibidores cargados tanto positiva como negativamente. Cuando extraemos el ADN de una muestra forense, en principio desconocemos si existen sustancias inhibidoras que nos interferirán en la reacción de PCR y mucho menos sabemos las características de este tipo de sustancias.

Queremos probar dos estrategias diferentes basadas en la combinación de los métodos de purificación, para eliminar o inactivar las posibles sustancias inhibidoras que se extraen junto con el ADN en las muestras forenses. Cuando purificamos un extracto de ADN por medio de filtros del tipo Centricon o Microcon (Amicon, USA) estamos realizando una separación de sustancias según su tamaño, de tal forma que eliminamos los solutos de menor peso y retenemos los de mayor peso (en nuestro caso el ADN). Cuando la extracción o la purificación la realizamos mediante resinas quelantes como el Chelex, la separación la estamos realizando según la carga de los solutos, de tal manera que retenemos los solutos cargados negativamente (el ADN) y eliminamos los que a cierto pH están cargados positivamente.

Para demostrarlo hemos querido combinar los dos tipos de purificación en estas muestras, de tal manera que las muestras que purificamos mediante ultrafiltración (bien con filtros Centricon o Microcon) y que no dieron resultado alguno en la amplificación, las purificaremos mediante Chelex para ver si la analítica mejora. También realizaremos la operación inversa, es decir, las muestras extraídas mediante Chelex que dieron resultado negativo en la PCR, las purificaremos con Centricon para observar si con este tratamiento se obtiene un producto de amplificación en la PCR.

2.3.1.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1.1-Tipos de muestras analizadas.

Se han analizado dos tipos de extractos de ADN:

Grupo 1: 9 muestras de diferente origen (cuatro muestras de sangre asentadas sobre tierra, dos muestras de sangre asentada en cuero y tres muestras de saliva asentada sobre filtros de cigarrillo que habían sido pisados) extraídas mediante F/C/I y posterior purificación mediante filtros Centricon-100 o Microcon-100 (Amicon, USA) en las cuales no se obtenían resultados positivos en la reacción de PCR.

Grupo 2: 9 muestras de diferente origen (cuatro muestras de sangre asentada en madera, dos muestras de sangre asentada en suelo de calle, una muestra de sangre asentada entre mango y hoja de un cuchillo, 2 muestras sangre asentadas sobre tela vaquera) extraídas mediante resina quelante Chelex-100 en las cuales no se obtenían resultados positivos en la reacción de PCR.

2.3.1.2.- Protocolos de purificación.

a.- Con las muestras del **grupo 1** se realizó una purificación con la resina quelante Chelex-100 según el siguiente protocolo:

- 1.- Se tomaron 38 μ L del extracto de ADN obtenido mediante F/C/I-Centricon o Microcon y se introdujeron en un tubo Eppendorf.
- 2.- Se añadieron 13 μ L de resina Chelex-100 al 20% y se agitó.
- 3.- La mezcla se incubó en baño a 37°C durante una hora.
- 4.- Posteriormente se incubó en un baño a ebullición durante 8 minutos.
- 5.- Se vorteoó y se centrifugo durante 4 minutos a 13500 r.p.m.
- 6.- Se tomaron 10 μ L del sobrenadante para realizar la reacción de PCR.

b.- Con las muestras del **grupo 2** se realizó una purificación con filtros Centricon-100 según el siguiente protocolo:

- 1.- Se tomaron 100-150 μ L de ADN extraído mediante resina Chelex-100 y se añadieron a un tubo Centricon-100. Se completó el volumen hasta 2 mL con tampón TE⁻⁴ (Tris-ClH 2,5 mM, EDTA sal disódica dihidratada 0,25 mM, pH 8.0).
- 2.- Se centrifugaron los tubos a 1500 r.p.m. durante 20 minutos. Se descartó el filtrado y el proceso se repitió dos veces más.
- 3.- Finalmente se invirtieron los tubos para recuperar el ADN concentrado y purificado y se centrifugaron a 750 r.p.m. durante tres minutos. La solución resultante se sometió a la reacción de PCR.

2.3.1.3.- Amplificación del ADN en reacciones multiplex.

Se ha utilizado una reacción multiplex para amplificar loci de ADN nuclear, concretamente el “*quadplex*” CTTv. Se trata de la amplificación simultánea de los marcadores HUMTH01, HUMTPOX, HUMCSF1PO y HUMvWF. Para ello se ha utilizado uno de los kits comerciales “Gene Print™ Fluorescent STR Multiplexes” de Promega Corp. (Madison, WI) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Con este kit se obtienen tamaños de producto amplificado de: 139-167 pb para vWA, 179-203 pb para TH01, 224-252 pb para TPOX y 295-327 pb para CSF1PO.

2.4.1.4.- Análisis del producto amplificado.

El tipaje de los loci amplificados en la reacción multiplex CTTv se realizó mediante electroforesis capilar en un equipo ABI 310 (Applied BioSystems, USA), con un capilar de 47 cm x 50 µm (Applied BioSystems, USA) relleno de polímero POP-4™ (Applied BioSystems, USA). Los datos en bruto se recogieron con el software GeneScan Analysis 2.1 (Applied BioSystems, USA). La asignación de los alelos se realizó mediante comparación con la escalera alélica suministrada por el kit de amplificación de Promega mencionado en el apartado anterior (alelos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 para vWA; alelos 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 para TH01; alelos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 para TPOX; y alelos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 para CSF1PO).

2.3.2.- RESULTADOS

Muestras del grupo 1: Centricon/Microcon-Chelex: en este grupo de muestras 5 de ellas pasaron de dar resultados negativos a positivos en la amplificación (55,5 %), 3 no variaron antes y después del tratamiento y sólo una (muestra 2) empeoró tras el tratamiento (ver tabla nº 16 y Fig nº 40).

Muestras del grupo 2: Chelex-Centricon: en este otro grupo de muestras 6 de ellas pasaron de dar resultados negativos a positivos en la amplificación de todos o algunos de los loci analizados (66,7%), y el resto no presentó variación. Ninguna de ellas empeoró tras el tratamiento (ver tabla nº 17).

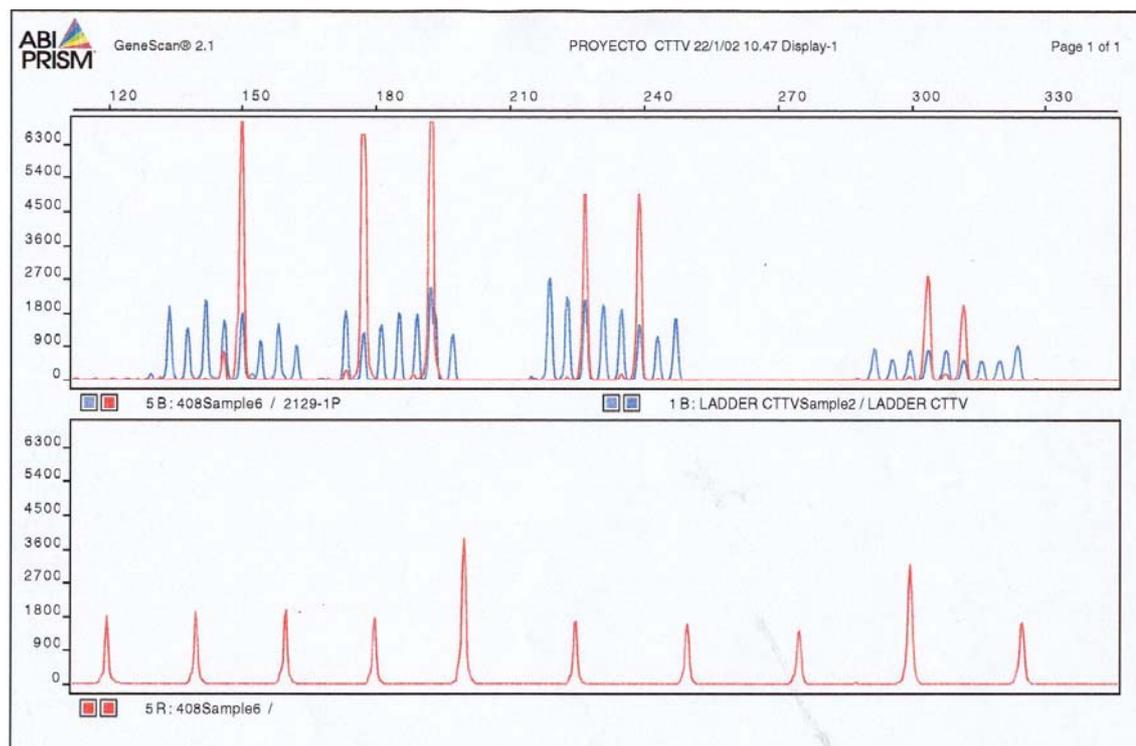
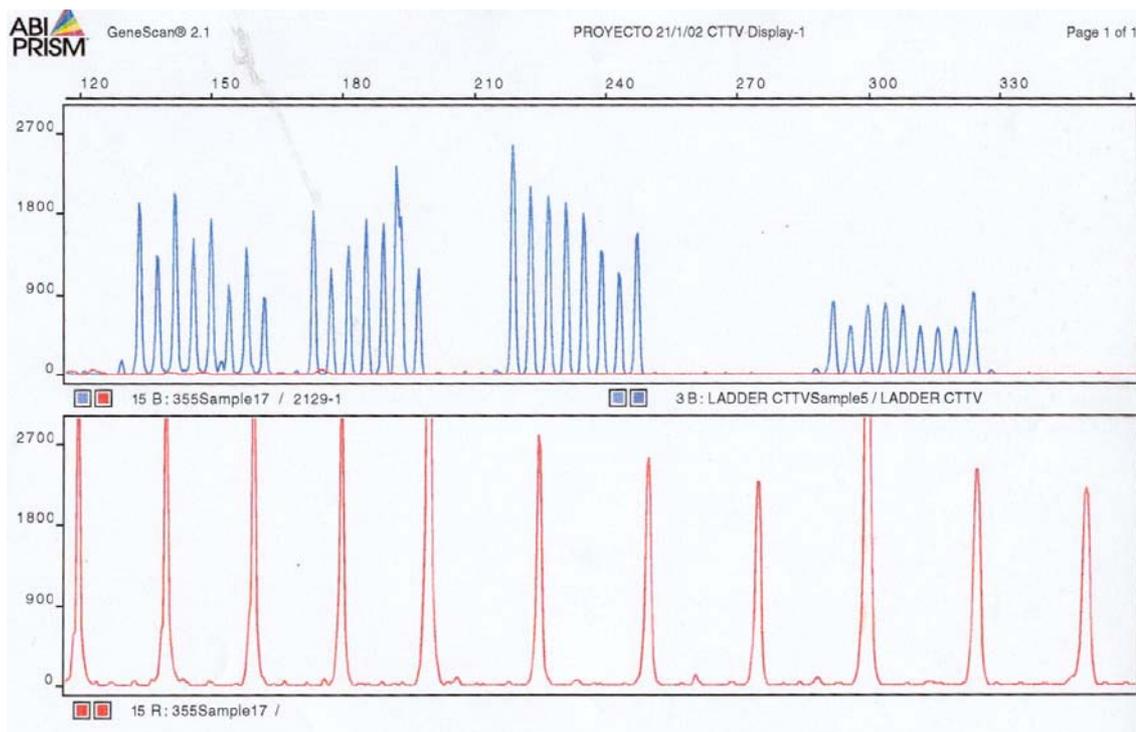


Figura nº 40.- Electroferogramas de los loci vWA, TH01, TPOX y CSF1PO (de izquierda a derecha).- Arriba: muestra forense extraída mediante Fenol/Cloroformo/Isoamílico-Centricon. Abajo: misma muestra tratada posteriormente con resina quelante Chelex 100.

MUESTRA	[ADN] en $\eta\text{g}/\mu\text{L}$	CTTv sólo Centricon o Microcon	CTTv Centricon o Microcon + Chelex
1	0.1	-	+
2	0.1	+ débil	-
3	0.1	-	-
4	0.1	-	+
5	0.05	-	+
6	0.031	-	-
7	0.0625	-	-
8	0.1	-	+
9	0.0625	-	+

Tabla nº 16.- Resultados en muestras forenses extraídas mediante Fenol/Cloroformo/Isoamílico-Centricon y posteriormente tratadas con resina quelante Chelex 100.

MUESTRA	[ADN] en $\eta\text{g}/\mu\text{L}$	CTTv sólo Chelex	CTTv Chelex + Centricon
1	0.031	-	-
2	0.1	-	-
3	0.0625	-	+
4	Menos de 0.015	-	Todos positivos menos CSF1PO
5	0.0625	-	+
6	Menos de 0.031	-	-
7	0.031	-	+
8	Menos de 0.015	-	+
9	0.05	-	+

Tabla nº 17.- Resultados en muestras forenses extraídas mediante resina quelante Chelex 100 y posteriormente purificadas con Centricon-100.

2.3.3.- CONCLUSIONES

Es difícil saber a priori si un extracto de ADN contiene sustancias inhibitoras o no, pues sólo en los casos en los que aparece una fluorescencia azulada bajo la luz U.V. al realizar un minigel de cuantificación o cuando el extracto presenta color, sospechamos su presencia. También podemos pensar en una posible inhibición en muestras de las cuales en principio esperamos obtener escasa cantidad de ADN y al purificarlas mediante Centricon observamos que la filtración se alarga porque al extracto le cuesta atravesar el filtro. Sin embargo, el hecho de detectar ADN en el extracto mediante métodos de cuantificación muy específicos como QuantiBlot y no obtener producto amplificado tras la reacción de PCR puede ser un claro indicativo de la presencia de estas sustancias.

En este apartado hemos podido comprobar que la combinación de diferentes métodos de purificación (según carga y según tamaño) en muestras forenses que presentan sustancias inhibidoras puede ser uno de los protocolos a seguir para el éxito en la amplificación.

2.4.- PREAMPLIFICACIÓN INESPECÍFICA.

2.4.1.- INTRODUCCIÓN.

Como hemos visto, el ADN de muestras degradadas o muy antiguas se encuentra siempre muy fragmentado debido a los procesos de autólisis, la degradación bacteriana y la despurinización espontánea (Bär y cols., 1988; Lindahl y Andersson, 1972; Lindahl y Nyberg, 1972). Esta fragmentación reduce de forma severa la eficacia de la PCR (Akane y cols., 1993; Fisher y cols., 1993), hecho que se refleja en: (i) la elección forzosa de pequeños fragmentos de ADN para copiar en la PCR y (ii) la cantidad de producto amplificado es bastante menor que el obtenido en reacciones similares con ADN en perfecto estado.

En 1996, Golenberg y cols. han realizado estudios de “reparación” de ADN mediante polimerización. En dichos estudios partían de extractos de ADN de calidad y cantidad óptimas y los trataban con una enzima del tipo de las endonucleasas para fragmentar dicho ADN. Posteriormente intentaban recomponer el ADN roto sometiendo las muestras a unos cuantos ciclos inespecíficos (sin cebadores) de PCR previos a la reacción de PCR específica (con cebadores que limitan el fragmento concreto de ADN a estudiar). Los resultados de estos autores han sido alentadores para nosotros pues a partir de ADN fragmentado con el cual los resultados positivos obtenidos eran nulos, han logrado resultados positivos. Bien es verdad que el tipo de rotura en el ADN que han realizado no es la misma que la que se genera en la naturaleza con el paso del tiempo o las condiciones adversas pero creemos que es un punto de partida para poder realizar este tipo de estrategias en muestras forenses reales.

En este apartado intentaremos incrementar la eficacia de la PCR en muestras reales que contengan ADN degradado mediante una preamplificación inespecífica de pocos ciclos, es decir sin añadir cebadores a la mezcla de reacción, pero conservando los demás reactivos habituales. De esta manera pueden ocurrir dos cosas:

1.- Si en nuestra muestra existe alguna copia de ADN molde del fragmento que queremos amplificar que todavía se encuentre intacta, los fragmentos de las copias que se encuentren degradadas pueden funcionar a modo de cebadores uniéndose por complementariedad a dicha copia intacta. En la figura nº 41 se esquematiza este proceso.

2.- Si en la muestra se encuentra totalmente degradado el ADN molde, los propios fragmentos pequeños de ADN de la muestra actuarán de cebadores y se unirán a otras copias complementarias también degradadas pero que encajen unas con otras como si formaran un puzzle. En la figura nº 42 se muestra este modelo de actuación.

Para realizar esta valoración estudiaremos un fragmento del gen de la **amelogenina** utilizado para el diagnóstico de sexo. En el caso de los varones se observarán dos bandas de ADN, una perteneciente al cromosoma Y de 112 pares de bases de longitud y otra perteneciente al cromosoma X de 106 pares de bases de longitud. En el caso de las mujeres solo aparecerá la banda de 106 pares de bases de longitud.

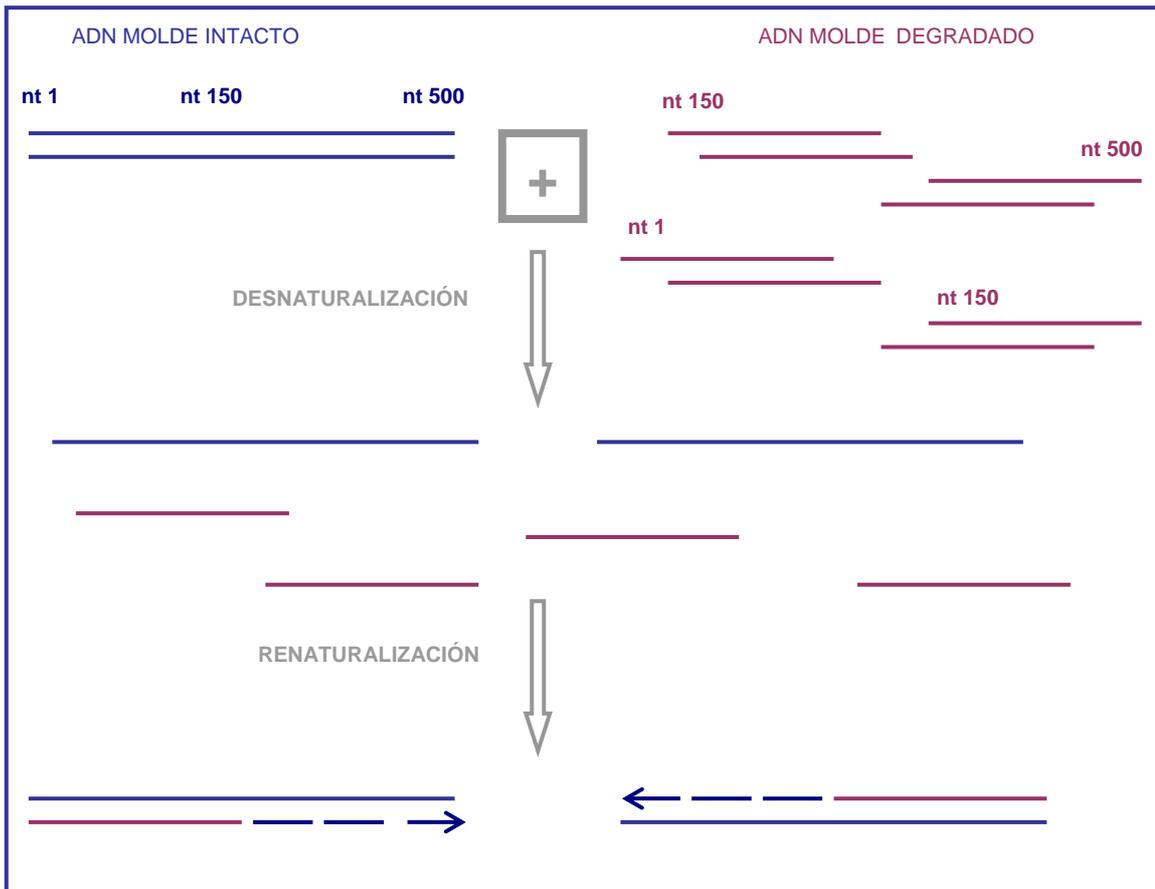


Figura nº 41 .- Presencia de alguna copia de ADN molde intacta. Los fragmentos de las copias degradadas pueden realizar las funciones de cebadores y así generar más copias intactas del ADN a copiar en la PCR específica.

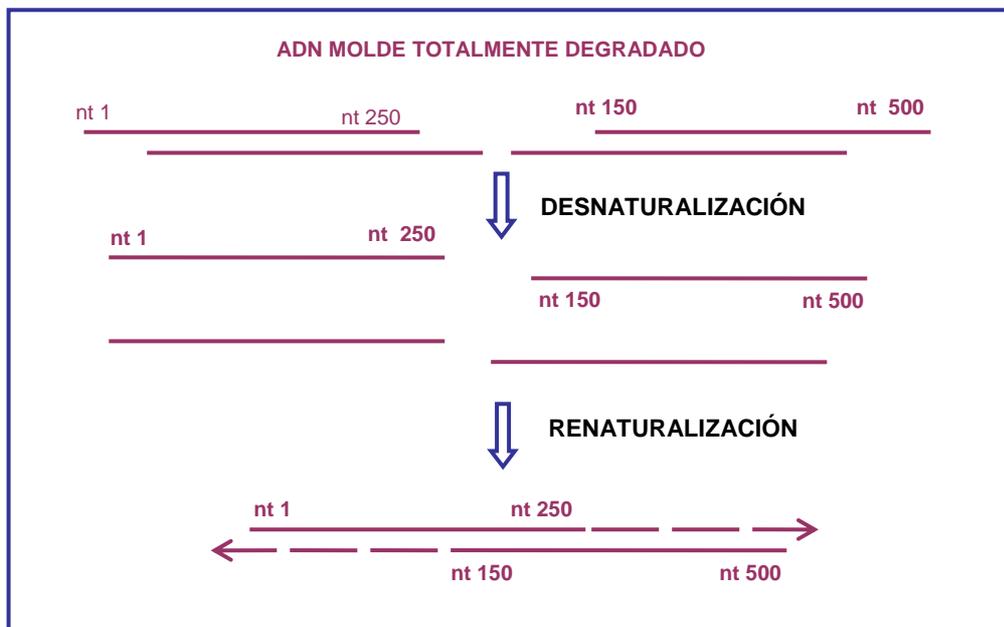


Figura nº 42.- ADN molde totalmente degradado. No hay ninguna copia intacta de la diana a amplificar pero sí fragmentos solapantes que pueden funcionar a modo de cebadores y así producir alguna copia completa de la diana que nos interesa. Podemos observar que a partir de dos fragmentos cortos obtenemos fragmentos más largos aunque no exista ninguna copia de ellos presente en la muestra.

2.4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.2.1- Tipos de muestras analizadas.

Hemos utilizado para este análisis cuatro tipos de muestras:

- a) Muestras de sangre líquida de sexo conocido que se encontraban en perfectas condiciones y que, tras proceder a la extracción de ADN, degradamos mediante **digestión total** con la enzima de restricción Hinf I.
- b) Muestras de sangre líquida de sexo conocido que se encontraban en perfectas condiciones y que **abandonamos a temperatura ambiente y sin oscuridad** durante un período de tiempo de 100 días.
- c) **Manchas de sangre** (de sexo conocido) **o esperma** almacenadas a temperatura ambiente en oscuridad durante un período de 12 años.
- d) Muestras de sangre líquida de sexo conocido de casos forenses reales almacenadas a **4°C durante 1-2 años**.

Cada una de las extracciones de estas muestras se realizó con un control negativo y además se añadió otro control negativo más en las reacciones de PCR.

2.4.2.2.- Extracción de ADN.

En el caso de muestras de **sangre líquida** se utilizaron 150 μL para cada extracción. Se añadieron 400 μL de solución tampón de lisis (Tris 10 mM., EDTA disódica 19 mM., ClNa 0.1 M., SDS al 20%, pH 8.0) y 20 μL de proteinasa K (10 mgr./mL.). Dicha mezcla se incubó toda la noche en un baño a 37 °C.

En el caso de las **manchas** de sangre y esperma se recortó y troceó aproximadamente 1cm². de cada una y se sometió al mismo proceso de incubación que las muestras de sangre líquida, pero añadiendo 20 μL de ditioneitol (DTT) 1M a la mezcla en el caso de las manchas de esperma.

Posteriormente, y tras eliminar los fragmentos de tela mediante centrifugación en el caso de las manchas, se realizó una extracción de ácidos nucleicos mediante protocolo convencional de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) en todos los tipos de muestra (Sambrook y cols., 1989). Para purificar y concentrar el ADN extraído se utilizó ultrafiltración con tubos Centricon-100 o Microcon-100 (Amicon, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las extracciones se realizaron incluyendo un **control negativo** en el cual se sustituyó la muestra por agua bidestilada autoclavada.

2.5.2.3.- Digestión y Cuantificación del ADN de las muestras del grupo a.

Se tomaron entre 40-50 μL . del ADN recién extraído y se procedió a una digestión parcial del mismo añadiendo 5 Unidades de enzima Hinf I (Promega), 1.5 μL . de tampón 1X (Tris-acetato 33mM pH 7.9, Acetato potásico 66mM, Acetato magnésico 10 mM, DTT 0.5 mM) y el 10% del volumen final de la reacción de tampón 10X. Se incubaron los tubos en un baño a 37 °C durante 2 horas.

El ADN así digerido se cuantificó en un fluorímetro (Hofer TKO 100) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez cuantificado se realizaron diluciones y se utilizaron 2 μgr de cada muestra para proceder a la digestión

total, añadiendo 8 Unidades de enzima Hinf I a la que anteriormente se le añadió solución tampón de concentración final 0.5X. El proceso se realizó en un baño a 37°C durante 4 horas.

Tras este tratamiento de digestión total del ADN presente en las muestras se visualizaron los resultados mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 0.1% comprobándose que las muestras no presentaban banda de ADN de alto peso molecular, sino simplemente una cola (“smear”) de ADN totalmente degradado.

2.4.2.4.- Cuantificación del ADN de las muestras de los grupos b, c y d.

Para valorar la cantidad aproximada y calidad del ADN extraído en estos grupos de muestras se procedió de dos maneras:

A) Se realizó una **electroforesis submarina** en gel de agarosa al 0.1% con Bromuro de Etidio. El resultado se visualizó bajo luz ultravioleta y se valoraron los resultados por comparación con patrones de ADN de cantidad conocida. Con este tipo de análisis se logra determinar de forma aproximada la cantidad de ADN extraído de la muestra y se visualiza el grado de conservación de dicho ADN. Este análisis también se realizó en los controles negativos de la extracción.

B) Además se utilizó el kit de la casa Perkin- Elmer (USA) “**Quantiblot Human DNA Quantitation kit**” siguiendo protocolo recomendado por el fabricante, tanto en las muestras como en los controles negativos. Se trata de un método quimioluminescente de fijación del ADN extraído a una membrana y posterior hibridación con una sonda específica de primates, como ya se ha descrito en otros apartados de este trabajo. Con este tipo de análisis se logra una cuantificación más exacta de la cantidad de ADN que hemos logrado extraer y se asegura que dicho ADN sea de procedencia humana.

2.4.2.5.- Primera amplificación y tipado del ADN de las muestras.

Se realizaron amplificaciones previas para comprobar la escasa eficacia de la PCR en muestras muy degradadas y para elegir posteriormente las muestras susceptibles de preamplificar sin cebadores.

El mix de reacción consistía en 16.1 µL. de ADN de concentraciones variables según las muestras (como máximo 0.1 ηgr./ µL.) al que se le añadieron Tris-HCl 10 mM pH 8.3, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, gelatina 0.01%, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq polimerasa, 0.2 µM de cada primer y BSA 160 mgr/mL, todo ello llevado a un volumen final de reacción de 25 µL. Se utilizó un par de cebadores que delimitaban los fragmentos de ADN de 106 y 112 pares de bases anteriormente citados. La secuencia de los mismos fue la descrita por Sullivan y cols. (1993):

A: 5'- CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3'

B: 5'- ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3'

Las condiciones de amplificación consistían en 34 ciclos compuestos por: desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación de los cebadores a 60°C durante 15 segundos y extensión de las hebras a 72°C durante 15 segundos. Se añadió un ciclo a 72°C durante 8 minutos de extensión final, en un termociclador modelo 2400 de la casa Perkin-Elmer (USA). De forma rutinaria, junto con las muestras se amplificaron: un control negativo con todos los reactivos excepto el ADN y dos controles positivos de ADN pertenecientes a un varón y a una mujer. Además también se incluyeron los controles negativos de la extracción.

Para visualizar los productos de amplificación X (106 pb) e Y (112 pb) se utilizaron geles horizontales de poliacrilamida de medidas 50 x 40 x 0.4 mm. La concentración total de acrilamida (T) fue del 12% y la de piperazina (PDA) fue del 3% en tampón Tris-Bórico-EDTA (Tris-Bórico 44.5 mM, EDTA 1 mM, pH 9.0). La mezcla para cada gel se añadía sobre Gel Bond (FMC, Rockland) y constaba de: solución de acrilamida/piperazina y 0.2 µL. de glicerol en 1.5 mL del mismo tampón TBE. La electroforesis se llevó a cabo con tiras de agarosa al 2% en el mismo tampón que el gel, usando un equipo Phast-System (Pharmacia). Las condiciones de desarrollo de la electroforesis fueron:

1.- 160V.	3.0mA	2.0W	15°C	10Vh
2.- 430V.	8.0mA	3.0W	15°C	150Vh

Cargamos 0,8 µL. de producto amplificado en pequeños pocillos (0.2 x 0.2 mm.) realizados en el gel durante la polimerización, junto con los controles positivos y negativo. Tras la electroforesis se realizó una tinción de plata convencional con ligeras modificaciones para visualizar los fragmentos de ADN (Heukeshoven y Dernick, 1985).

2.4.2.6.- Preamplificación sin cebadores del ADN degradado y escaso.

Tras la lectura de la PCR anterior se eligieron las muestras que resultaron negativas (ausencia de bandas de ADN de 112 y/o 106 pares de bases) y las que daban una señal débil en el gel para realizar la preamplificación sin cebadores. Para ello sometimos a dichas muestras a **10 ciclos** de PCR con todos sus componentes a excepción de los cebadores. El mix de reacción consistía en: tampón 1X (Tris-ClH 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, gelatina 0.01%), 200 µM de cada dNTP, 1.25 U de Taq polimerasa, MgCl₂ 2 mM, BSA 160 mgr/mL y 16.75 µL. de ADN, todo ello en un volumen final de 25 µL.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 2400 bajo las siguientes condiciones: desnaturalización previa durante 3 minutos a 94 °C seguida de diez ciclos que consistían en una fase de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, una fase de apareamiento de los propios fragmentos de ADN de la muestra a 50 °C durante 30 segundos y una fase de elongación a 72 °C durante 90 segundos.

Todas las preamplificaciones se llevaron a cabo junto con controles negativos que no contenían ADN y con controles positivos que no presentaban el ADN degradado y que contenían concentraciones de dicho ADN óptimas

para los análisis. Como siempre, también se incluyeron los controles negativos de la extracción.

2.4.2.7.- Segundo análisis PCR para comprobar el efecto de la preamplificación sin cebadores.

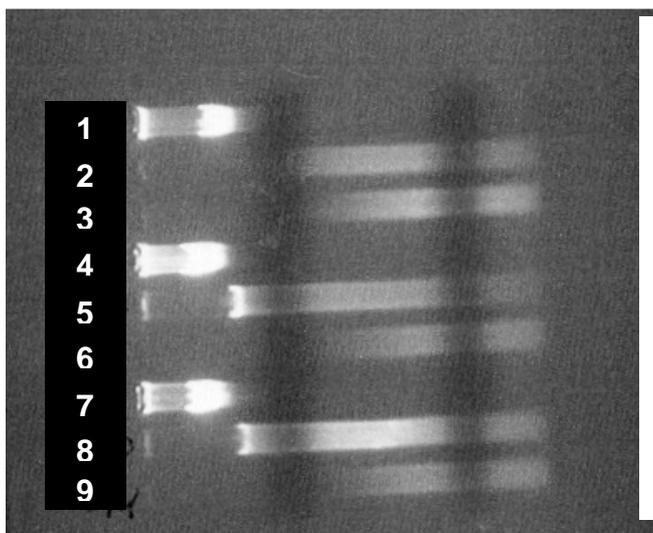
Las mismas muestras que hemos comprobado que efectivamente no daban resultados en la primera amplificación de los fragmentos del gen de la amelogenina y que posteriormente hemos sometido a preamplificación sin cebadores, las estudiaremos ahora con una nueva reacción de PCR de los mismos fragmentos de amelogenina para comprobar si los resultados han mejorado tras el pretratamiento.

Para ello seguimos el mismo protocolo descrito en el apartado 2.4.2.5, pero usando como ADN molde, el ADN sometido a preamplificación sin cebadores. Dicho ADN lo amplificamos para la determinación de sexo a partir de 16,1 μ L. de ADN pretratado. Como en ocasiones anteriores, se procesaron paralelamente controles negativos a los cuales se les añadieron todos los reactivos a excepción de ADN, controles positivos de ADN de cantidad conocida pertenecientes a varones y mujeres, y los **controles negativos de la extracción**.

2.4.3.- RESULTADOS

2.4.3.1.- Muestras del Grupo a (ADN digerido a partir de sangre líquida).

Los resultados obtenidos con este tipo de muestras han sido totalmente satisfactorios. Partimos de muestras de sexo conocido y las sometimos a digestión total con la enzima de restricción Hinf I. Comprobamos que la digestión se había producido mediante la electroforesis submarina en gel de agarosa y observamos que no aparecían bandas de ADN de alto peso molecular, sino “colas” de ADN fragmentado (Fotografía nº 17).



Fotografía nº 17.- Degradación muestras del grupo a.

Las líneas nº 1, 4 y 7 corresponden a ADN extraído de sangre líquida sin digerir con Hinf I y por eso en el gel de agarosa aparece una banda de ADN de alto peso molecular.

Las líneas nº 2, 5 y 8 corresponden al mismo ADN extraído a partir de sangre líquida digerido parcialmente con la enzima de restricción Hinf I; puede observarse que aparece un “smear” de degradación debido a la actuación de la enzima aunque en algunas muestras todavía está presente cierta cantidad de ADN de alto peso molecular, ya que la digestión no ha sido total.

Las líneas nº 3, 6 y 9 corresponden al mismo ADN digerido totalmente con Hinf I; podemos ver que en estas muestras no aparece banda alguna de ADN de alto peso molecular debido a la actuación de la enzima de restricción.

Los fragmentos de amelogenina que estamos estudiando presentan una diana para dicha enzima (ver fig. nº 43), por lo que el ADN molde queda roto en dos fragmentos tras tratarlo con la enzima. Tras este tratamiento la amplificación de los fragmentos de amelogenina resultó ser negativo pues no aparecía ninguna banda en el gel de poliacrilamida. Sometimos esas mismas muestras a 10 ciclos de preamplificación sin cebadores específicos y posteriormente volvimos a intentar la amplificación de los fragmentos de amelogenina comprobando que la reacción daba excelentes resultados. Las muestras pertenecientes a varones presentaban una banda de 106 pb y otra de 112 pb, y las pertenecientes a mujeres presentaban una sola banda de 106 pb (Fotografía nº 18). Los controles negativos presentaban ausencia de banda y positivos presentaban una o dos bandas según se tratara de mujeres o de varones. En la tabla nº 18 se muestran los resultados resumidos.

MUESTRAS	BANDA DE 106 PB.	BANDA DE 112 PB.
ADN de mujeres tratado con Hinf I	No	No
ADN de varones tratado con Hinf I	No	No
ADN de mujeres tratado con Hinf I y posterior amplificación sin cebadores	Sí	No
ADN de varones tratado con Hinf I y posterior amplificación sin cebadores	Sí	Sí
Controles negativos	No	No

Tabla nº 18.- Resultados de las amplificaciones de muestras de ADN digerido con la enzima de restricción Hinf I con y sin preamplificación inespecífica sin cebadores. Puede observarse que sin la preamplificación no se obtienen resultados y con ella se obtienen resultados que coinciden con el sexo real de las muestras. Los controles negativos han seguido el mismo proceso que las muestras: extracción, cuantificación y digestión, 1ª amplificación de amelogenina. preamplificación inespecífica sin cebadores v 2ª amplificación de amelogenina.

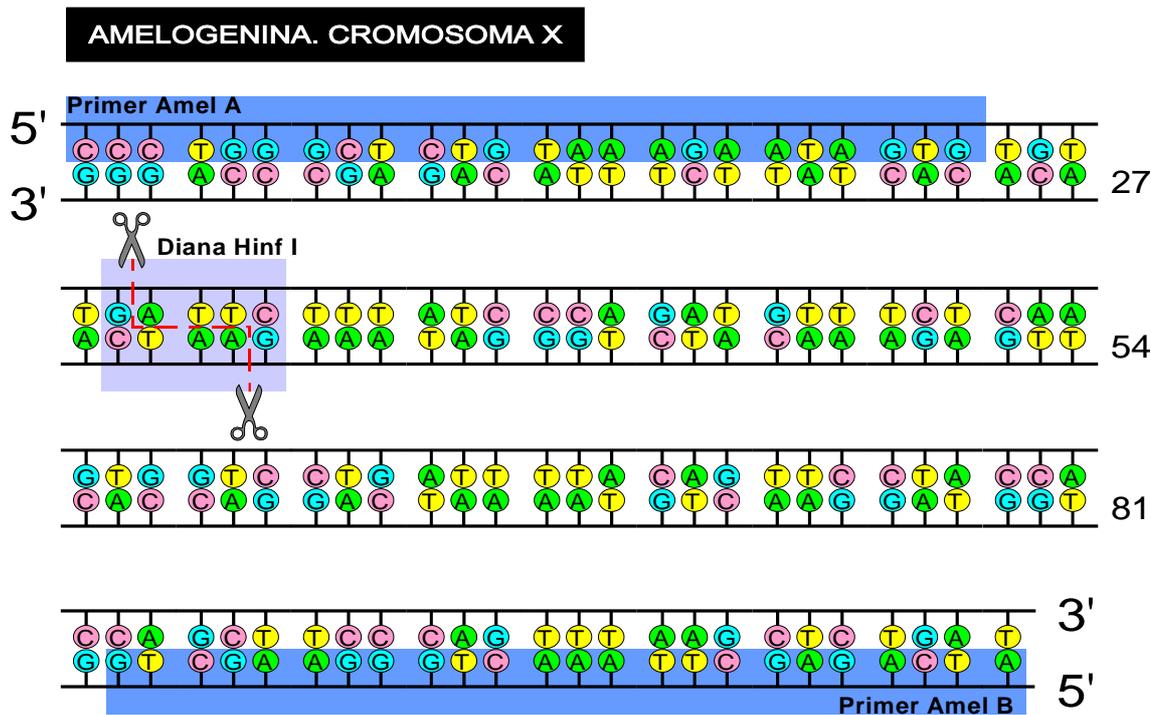
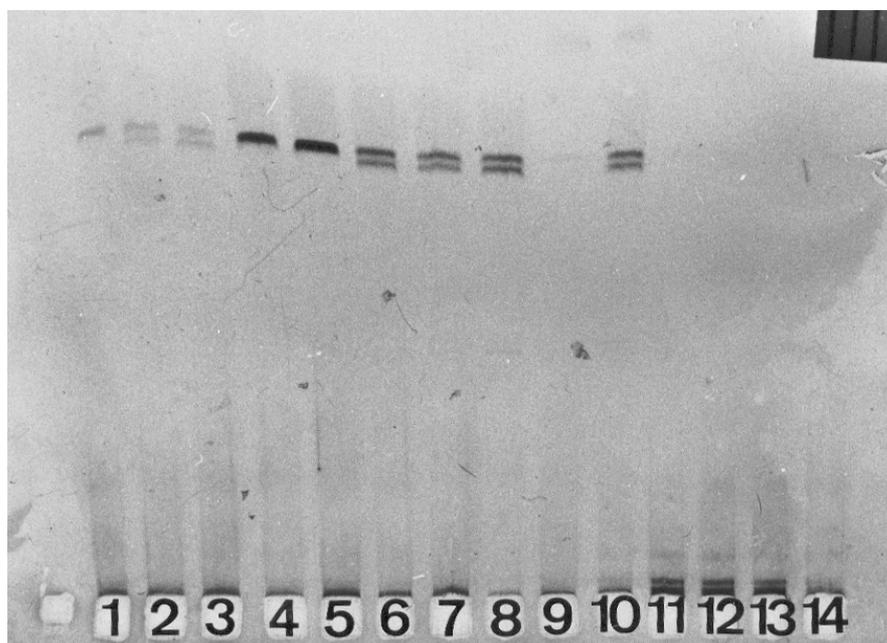


Figura nº 43.- Diana para la enzima de restricción Hinf I en el ADN molde del locus Amelogenina.



Fotografía nº 18.- Resultados de las amplificaciones con y sin pretratamiento de amplificación inespecífica en muestras digeridas con Hinf I. Líneas nº 11, 12 y 13: 1ª amplificación de los fragmentos de amelogenina en muestras digeridas con Hinf I, sin preamplificación inespecífica. Líneas nº 1, 2 y 3: las mismas muestras que las anteriores con preamplificación inespecífica partiendo de 1.6 µL de ADN preamplificado. Líneas nº 5, 6 y 7: las mismas muestras que las anteriores, con preamplificación inespecífica y partiendo de 16.1 µL de ADN preamplificado. Líneas nº 9 y 14: controles negativos. Líneas nº 4, 8 y 10: controles femenino y masculino.

2.4.3.2.- Muestras del Grupo b (sangre líquida expuesta a condiciones medioambientales).

Hemos estudiado un total de siete muestras de sangre líquida de sexo conocido que han permanecido a **Tª ambiente y a los efectos de la luz natural** durante 100 días de verano en Madrid. A medida que el tiempo iba pasando se podía observar que en algunas muestras empezaba a aparecer un sedimento blanquecino en el fondo de los tubos que contenían la sangre. A los 12 días realizamos una extracción de ADN, cuantificación (mediante electroforesis submarina y “Quantiblot”) y 1ª amplificación de amelogenina. Ya en el minigel de cuantificación, se podían observar diferencias entre las muestras. Algunas presentaban una banda clara de ADN de alto peso molecular (HMW) sin degradación alguna; otras presentaban un “smear” de ADN degradado.

Los resultados de la cuantificación mediante “Quantiblot” también diferían de unas muestras a otras y eran acordes con los resultados obtenidos en el minigel de cuantificación. De antemano podíamos intuir qué muestras nos darían resultados concluyentes y cuáles darían resultados negativos en la amplificación y determinación de sexo. Las muestras que no estuvieran degradadas y que contuvieran suficiente ADN probablemente no darían problemas en el análisis de sexo. A pesar de ello, realizamos una 1ª amplificación de la amelogenina por si estuvieran presentes inhibidores de la Taq polimerasa en nuestras muestras, lo cual daría resultados negativos aunque el ADN molde estuviera en buen estado y cantidad suficiente.

En sólo tres de las siete muestras obtuvimos ausencia de bandas en el gel de tipado; en las cuatro muestras restantes se obtuvieron resultados concluyentes y coincidentes con el sexo real (Fotografía nº 19). Por lo tanto, podemos estar seguros de que al menos las muestras que contienen ADN de buena calidad y cantidad, no tienen inhibidores en solución.



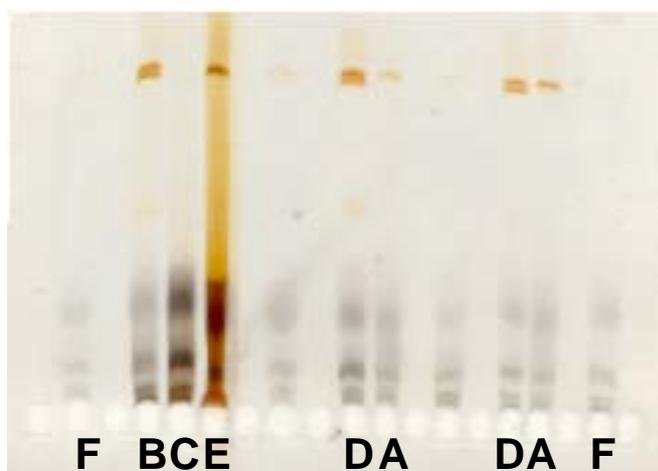
Fotografía nº 19.- Tipaje de muestras sin preamplificación inespecífica:

- A:** Control femenino;
- B:** Muestra nº 2 correspondiente a un varón (ausencia de amplificación);
- C:** muestra nº 3 correspondiente a un varón (ausencia de amplificación);
- D:** Control masculino;
- E:** muestra nº 4 correspondiente a una mujer (ausencia de amplificación);
- F:** control negativo

Elegimos las tres muestras que no dieron resultados para someterlas a preamplificación sin cebadores y posterior reacción PCR de amplificación de amelogenina. Una de las muestras no dio ningún resultado apareciendo ausencia de bandas en el gel y las otras dos dieron resultados positivos coincidentes con el sexo real (Ver fotografía nº 20). En la tabla nº 19 se muestran más detalladamente los resultados obtenidos.

MUESTRA	MINIGEL	QUANTIBLO T	SEXO SIN PREAMPLIFICA CIÓN	SEXO CON PREAMPLIFICA CIÓN
Nº 1 (Varón)	ADN de HMW. Sin degradación	40 ηgr./ μL.	Varón	No se realizó
Nº 2 (Varón)	ADN ligeramente degradado	0.0625ηgr./ μL.	Ausencia de bandas	Varón
Nº 3 (Varón)	ADN degradado	No ADN	Ausencia de bandas	Ausencia de bandas
Nº 4 (Mujer)	ADN degradado	No ADN	Ausencia de bandas	Mujer
Nº 5 (Mujer)	ADN de HMW sin degradación	125 ηgr./ μL.	Mujer	No se realizó
Nº 6 (Mujer)	ADN de HMW sin degradación	15ηgr./ μL	Mujer	No se realizó
Nº 7 (Mujer)	ADN de HMW sin degradación	17.5ηgr./ μL	Mujer	No se realizó
Controles negativos	Ausencia	No ADN	Ausencia	Ausencia

Tabla nº 19.- Resultados obtenidos en las muestras de sangre líquida sometidas durante 12 días a la temperatura medioambiental y la acción de la luz natural. En las muestras nº 1, 5, 6 y 7 aparece ADN de alto peso molecular en excelentes condiciones, por lo que estas muestras no dan problemas en la 1ª amplificación. La muestra nº 2 presenta su ADN degradado y por ello no da resultados en la 1ª amplificación. Tras un tratamiento de amplificación sin cebadores, esta muestra da resultados de acuerdo con su fenotipo sexual real. En las muestras 3 y 4 se detecta ADN degradado con el minigel pero no se detecta ADN humano mediante el "quantiblot", a pesar de lo cual, un de ellas (nº 4) dio resultados positivos tras el pretratamiento sin cebadores.



Fotografía nº 20.- Tipaje de muestras con preamplificación inespecífica: A: Control femenino; B: Muestra nº 2 correspondiente a un varón; C: muestra nº 3 correspondiente a un varón; D: Control masculino; E: muestra nº 4 correspondiente a una mujer; F: control negativo

El segundo análisis lo realizamos cuando habían transcurrido 34 días desde que abandonamos las muestras. Tras este período los resultados fueron muy parecidos a los obtenidos tras los doce días pero una de las muestras que dieron resultados tras el pretratamiento entonces (nº 4), ahora no daba ningún resultado (ver tabla nº 20).

MUESTRA	MINIGEL	QUANTIBLOT	SEXO SIN PREAMPLIFICACIÓN	SEXO CON PREAMPLIFICACIÓN
Nº 1 (Varón)	ADN de HMW. Sin degradación	30 ηgr./ μL	Varón	No se realizó
Nº 2 (Varón)	ADN totalmente degradado	0.031ηgr./ μL	Ausencia de bandas	Varón
Nº 3 (Varón)	ADN totalmente degradado	No ADN	Ausencia de bandas	Ausencia de bandas
Nº 4 (Mujer)	ADN totalmente degradado	No ADN	Ausencia de bandas	Ausencia de bandas
Nº 5 (Mujer)	ADN de HMW algo degradado	18.75 ηgr./ μL	Mujer	No se realizó
Nº 6 (Mujer)	ADN de HMW sin degradación	37.5ηgr./ μL	Mujer	No se realizó
Nº 7 (Mujer)	ADN de HMW sin degradación	37.5ηgr./ μL	Mujer	No se realizó
Controles negativos	Ausencia	No ADN	Ausencia	Ausencia

Tabla nº 20.- Resultados obtenidos en las muestras de sangre líquida sometidas durante 34 días a la temperatura medioambiental y la acción de la luz natural. En las muestras nº 1, 5, 6 y 7 aparece ADN de alto peso molecular, por lo que estas muestras no dan problemas en la 1ª amplificación. La muestra nº 2 presenta su ADN degradado y por ello no dan resultados en la 1ª amplificación. Tras un tratamiento de amplificación sin cebadores esta muestra da resultados de acuerdo con su fenotipo sexual real. En las muestras nº 3 y 4 no se detecta ADN humano.

El tercer análisis se realizó a los 59 días; los resultados fueron exactamente los mismos que a los 34 días, si bien se podían observar diferencias en el grado de degradación de las muestras, que se iba haciendo más acusada (ver tabla nº 21).

Finalmente, el cuarto y último análisis se realizó a los 100 días, observándose en este momento que una muestra más de las que daban resultados positivos anteriormente sin la preamplificación pasó a no darlos (muestra nº 7). Esta muestra se sometió a preamplificación y dio un resultado de acuerdo con su fenotipo real (ver tabla nº 22).

MUESTRA	MINIGEL	QUANTIBLOT	SEXO SIN PREAMPLIFICACIÓN	SEXO CON PREAMPLIFICACIÓN
Nº 1 (Varón)	ADN de HMW degradado	15 ηgr./ μL	Varón	No se realizó
Nº 2 (Varón)	ADN totalmente degradado	0.031ηgr./ μL.	Ausencia de bandas	Varón
Nº 3 (Varón)	ADN totalmente degradado	No ADN	Ausencia de bandas	Ausencia de bandas
Nº 4 (Mujer)	No se observa banda ni degradación	No ADN	Ausencia de bandas	Ausencia de bandas
Nº 5 (Mujer)	ADN de HMW degradado	7.5 ηgr./ μL.	Mujer	No se realizó
Nº 6 (Mujer)	ADN de HMW sin degradación	15ηgr./ μL.	Mujer	No se realizó
Nº 7 (Mujer)	ADN de HMW sin degradación	15ηgr./ μL.	Mujer	No se realizó
Controles negativos	Ausencia	No ADN	Ausencia	Ausencia

Tabla nº 21.- Resultados obtenidos en las muestras de sangre líquida sometidas durante 59 días a la temperatura medioambiental y la acción de la luz natural. En las muestras nº 6 y 7 aparece ADN de alto peso molecular, por lo que estas muestras no dan problemas en la 1ª amplificación. Las muestras nº 1 y 5 presentan resultados sin necesidad de pretratamiento por presentar banda de HMW aunque parte del ADN está degradado. La muestra nº 2 presenta su ADN totalmente degradado y por ello no da resultados en la 1ª amplificación. Tras un tratamiento de amplificación sin cebadores, esta muestra da resultados de acuerdo con su fenotipo sexual real. Finalmente en las muestras nº 3 y 4 no se detecta ADN humano y por ello no dan resultados ni si quiera con el pretratamiento.

MUESTRA	MINIGEL	QUANTIBLOT	SEXO SIN PREAMPLIFICACIÓN	SEXO CON PREAMPLIFICACIÓN
Nº 1 (Varón)	ADN de HMW degradada	20 ηgr./ μL	Varón	No se realizó
Nº 2 (Varón)	ADN totalmente degradado	No ADN	Ausencia de bandas	Varón
Nº 3 (Varón)	No se observa banda ni degradación	No ADN	Ausencia de bandas	Ausencia de bandas
Nº 4 (Mujer)	No se observa banda ni degradación	No ADN	Ausencia de bandas	Ausencia de bandas
Nº 5 (Mujer)	ADN de HMW degradado	10 ηgr./ μL	Mujer	No se realizó
Nº 6 (Mujer)	ADN de HMW degradado	10 ηgr./ μL	Mujer	No se realizó
Nº 7 (Mujer)	ADN totalmente degradado	No ADN	Ausencia de bandas	Mujer
Controles negativos	Ausencia	No ADN	Ausencia	Ausencia

Tabla nº 22.- Resultados obtenidos en las muestras de sangre líquida sometidas durante 100 días a la temperatura medioambiental y la acción de la luz natural. Las muestras nº 1, 5 y 6 presentan resultados sin necesidad de pretratamiento por presentar banda de HMW aunque parte del ADN está degradado. En las muestras nº 2, 3, 4 y 7 no se detecta ADN humano, no dan resultados en la 1ª amplificación y tras un tratamiento de amplificación sin cebadores, dos de ellas dan resultados de acuerdo con su fenotipo sexual real.

2.4.3.3.- Muestras del Grupo c (manchas almacenadas durante 12 años).

Como se muestra en la tabla nº 23, no se han podido realizar estudios de preamplificación sin cebadores en ninguna de estas muestras pues todas ellas dieron resultados positivos coincidentes con su fenotipo real en la primera amplificación.

MUESTRA	MINIGEL	QUANTIBLOT	SEXO SIN PREAMPLIFICACIÓN	SEXO CON PREAMPLIFICACIÓN
Mancha de sangre F (Mujer)	ADN degradado	15 ηgr./ μL.	Mujer	No se realizó
Escamas de sangre G (Mujer)	ADN ligeramente degradado	3.75 ηgr./ μL.	Mujer	No se realizó
Mancha de sangre H (Mujer)	ADN ligeramente degradado	2.5 ηgr./ μL.	Mujer	No se realizó
Mancha de sangre I (Varón)	Ausencia	0.75 ηgr./ μL.	Varón	No se realizó
Mancha de sangre J (Varón)	Ausencia	0.25 ηgr./ μL.	Varón	No se realizó
Mancha de esperma K	Ausencia	0.375 ηgr./ μL.	Varón	No se realizó
Controles negativos	Ausencia	No ADN	Ausencia	Ausencia

Tabla nº 23.- Resultados obtenidos en las muestras de manchas de sangre y esperma almacenadas durante 12 años a la temperatura medioambiental en oscuridad. Ninguna muestra falló en la primera amplificación, por lo que no se pudo valorar la preamplificación inespecífica sin cebadores en ninguna de estas muestras.

2.4.3.4.- Muestras del Grupo d (sangre líquida a 4°C durante 1-2 años).

Este grupo de muestras son 5 muestras de sangre líquida de cadáveres que han permanecido almacenadas en nevera a 4°C durante largo tiempo (uno o dos años). Suponemos que el posible ADN que podamos encontrar estará totalmente degradado. El aspecto de las muestras es significativo, presentan color marrón o rojo muy oscuro y algunas de ellas desprenden un pestilente olor. Las características de cada muestra y los resultados obtenidos se resumen en la tabla nº 24.

MUESTRA	MINIGEL	QUANTIBLOT	SEXO SIN PREAMPLIFICACIÓN	SEXO CON PREAMPLIFICACIÓN
A (Varón, almacenada 1,5 años a 4°C)	Ausencia	0.094 ηgr./ μL	Ausencia de bandas	Varón
B (Mujer, almacenada 1,5 años a 4°C)	Ausencia	0.125 ηgr./ μL	Ausencia de bandas	Mujer
C (Mujer, almacenada 1 año a 4°C)	Ausencia	0.062 ηgr./ μL	Ausencia de bandas	Mujer
D (Varón, almacenada 1 año a 4°C)	Ausencia	No ADN	Ausencia de bandas	Varón
E (Varón, almacenada 2 años a 4°C)	Ausencia	1 ηgr./ μL	Varón	No se realizó
Controles negativos	Ausencia	No ADN	Ausencia	Ausencia

Tabla nº 24.- Resultados obtenidos en las muestras de sangre líquida almacenadas a 4 °C durante 1-2 años. La muestra reseñada como E presentó resultados sin necesidad de pretratamiento. En las muestras reseñadas como A, B, C y D no se detectaba señal en el minigel y se detectaba una leve señal o ninguna señal en "Quantiblot". Con ninguna de estas muestras se obtuvieron resultados concluyentes en la primera amplificación y en todas ellas se obtuvieron resultados de acuerdo con el fenotipo real de las muestras tras la preamplificación sin cebadores.

2.4.4.- DISCUSIÓN

Creemos que los buenos resultados obtenidos en las muestras del grupo "a" tras la preamplificación sin cebadores puede deberse principalmente a que la endonucleasa Hinf I no rompiera todas las copias de ADN molde presentes en la muestra. De esta manera, las copias rotas pueden funcionar a modo de "primers" anillándose en algún ADN molde intacto produciendo su extensión (Figura nº 39). Con esta prueba hemos querido poner de manifiesto nuestra capacidad para obtener resultados positivos mediante preamplificación inespecífica en muestras tratadas de forma controlada (con Hinf I) que no daban resultado alguno mediante PCR convencional, bajo condiciones controladas de laboratorio. Este es el primer paso para desarrollar el mismo proceso en muestras reales que presentan degradación a distintos niveles del fragmento que queremos amplificar.

En las muestras de los grupos b y d que resultaron adecuadas para realizar preamplificación inespecífica (es decir, las que no presentaban producto de amplificación tras la PCR convencional) también se han obtenido resultados esperanzadores (resultado positivo en 6 de las 8 muestras tras preamplificación, 75%). Quizá en estas muestras se hayan producido uno de los dos mecanismos de reconstrucción propuestos en nuestra hipótesis (figuras nº 38 y nº 39) o los dos a la vez. En las dos muestras que no obtuvimos resultados tras la preamplificación sugerimos una elevada degradación. El grado de fragmentación del ADN puede ser muy variable de unas muestras a otras y ello influye enormemente en la posibilidad de arrojar resultados positivos con este tratamiento; en las muestras que presenten elevada degradación es más difícil que con la preamplificación inespecífica se consigan

resultados concluyentes ya que seguramente no quedará ninguna copia intacta del molde a amplificar y posiblemente los fragmentos presentes sean tan pequeños que sea difícil que se reconstruya el molde a través de ellos como hemos sugerido.

Los resultados obtenidos en conjunto pueden abrir una puerta en el análisis de muestras críticas, si bien creemos que la preamplificación inespecífica puede ofrecer buenos resultados cuando estudiamos polimorfismos de secuencia que se encuentren en el ADN haploide (ADN mitocondrial y cromosoma Y), ya que en el estudio de ADN autosómico diploide existe el peligro de obtener fragmentos reconstruidos quiméricos formados por la combinación de los dos alelos presentes en cada individuo.

V. CONCLUSIONES FINALES

V.- CONCLUSIONES FINALES

Nuestro principal objetivo en este trabajo consistía en evaluar diversas estrategias de análisis en el estudio de polimorfismos nucleares en muestras muy críticas. Hemos trabajado a dos niveles:

- Intentando optimizar la extracción de ADN.
- Intentando optimizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

a) Para el primer apartado comparamos diferentes métodos de extracción de ADN en restos óseos y hemos valorado la cantidad de ADN obtenido así como la aptitud del mismo para obtener resultados en la reacción PCR. Los métodos comparados fueron:

- 1.- Glass-Milk (el kit "Isoresin™ Fast Kit")
- 2.- Acetato Sódico (Cattaneo y cols., 1995) añadiendo tres pasos de purificación con Centricon-100.
- 3.- F/C/I-Centricon (Hochmeister y cols., 1995)
- 4.- F/C/I-Centricon-Resina de sílice (Krings y cols., 1997)

De todos ellos, los que mejores resultados ha dado fueron los descritos por Hochmeister y cols. (1995) y Krings y cols. (1997). Se trata de los dos protocolos más largos y costosos por lo que recomendaríamos utilizar también el protocolo de Cattaneo (1995) en caso de que se tengan que procesar gran número de muestras y sea posible repetir los análisis (la cantidad de polvo de hueso sea suficiente para intentar otro protocolo si éste falla). Este método es sencillo, corto y de bajo coste. También hemos comprobado que la amplificación de fragmentos de pequeño tamaño mejora mucho los resultados en las muestras críticas, ya que el ADN se encuentra altamente fragmentado y creemos que pueden utilizarse diferentes PCRs de fragmentos solapantes para estudiar regiones más grandes.

b) Para el segundo apartado utilizamos diversas estrategias:

- 1.- Doble PCR
- 2.- Dobles purificaciones
- 3.- Preamplificación inespecífica

Los resultados obtenidos nos hacen descartar completamente la doble PCR por los problemas de contaminación que se pueden producir a pesar de ser rigurosos en el trabajo. Las dobles purificaciones también mejoran los resultados cuando el problema consiste en una inhibición de la PCR, pero no aporta solución alguna si el ADN es escaso y está muy degradado. Por último, los resultados obtenidos en la preamplificación sin cebadores nos deja una puerta abierta para el futuro pues si bien pensamos que se tienen que seguir realizando estudios de este tipo para valorar su eficacia, los primeros resultados han sido esperanzadores.

Creemos que los estudios realizados pueden ser de gran utilidad no sólo en el campo forense para el esclarecimiento de hechos delictivos y la

identificación cadavérica, sino también en el entorno de la zoología, la antropología, la paleontología y la arqueología. A pesar de que el estudio de ADN antiguo ha generado siempre controversia debido a la elevada probabilidad de contaminación con ADN moderno, creemos que existen herramientas que pueden ayudar a controlar la posible contaminación en algunos casos. El tratamiento exquisito de las muestras en los procesos de análisis, el control del personal del laboratorio mediante el tipaje de cada uno de los individuos que estuvieron en contacto con las muestras, la posibilidad de estudiar varios tipos de muestras procedentes del mismo individuo antiguo (dientes, huesos, otros tejidos momificados), el análisis de las muestras en varios laboratorios, la posibilidad de comparar los resultados obtenidos en el análisis con características físicas (determinación de sexo), el procesado en paralelo de controles negativos y muestras de diferentes especies animales junto con las muestras antiguas y en general las estrategias de autenticación de resultados (PCR cuantitativa, obtención de idénticos resultados con diferentes parejas de primers, etc.), son algunas de las precauciones que pueden tomarse para aplicar los procesos descritos en este trabajo al estudio de ADN antiguo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

* **Akane A**, Shiono H, Matsubara K, Nakamura H, Hasegawa N, Kagawa M. (1993). "*Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis*". J. Forensic Sci. Vol. 38, No. 3, pp : 691-701.

* **Akane A**, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. (1994). "*Identification of the heme compound copurified with DNA from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification*". J. Forensic Sci. Vol. 39, No. 2, pp: 362-372.

* **Alberts B**, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1986). "Biología Molecular de la Célula". Ediciones Omega S.A., Barcelona.

* **Alonso A**, Martín P, Albarrán C, Sancho M (1993). "*Amplified fragment length polymorphism analysis of the VNTR locus D1S80 in Central Spain*". Int. J. Leg. Med. 105: 311-314.

* **Álvarez García A**, (1995). "*Utilización de polimorfismos de ADN mediante PCR para la identificación individual a partir de piezas dentarias*". Tesis Doctoral. Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Santiago de Compostela.

* **Anderson S** y cols., (1981). "*Sequenza and organization of the human mitochondrial genome*". Nature 290: 457-465.

* **Anker R**, Stinbrueck T, Donis-Keller H. (1992). "*Tetranucleotide repeat polymorphism at the human thyroid peroxidase (hTPO) locus*". Hum. Mol. Genet. 1: 137.

* **Arlett CF**, Lehmann AR. (1978) "*Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage*". Annu. Rev. Genet. 12 : 95-115 .

* **Arroyo JJ**, Arroyo-Pardo E, Prieto L, Casas JD, Rodríguez MS, Arenal Y, Pérez A, Ruiz de la Cuesta JM, Turbón D. (1997). "*High performance liquid chromatography (HPLC) detection of PCR inhibitors in 18 samples of ancient DNA*". En prensa.

* **Attardi G**, (1987). "*The elucidation of the human mitochondrial genome: a historical perspective*". Bioessays 5: 34.

* **Ayub Q**, Mohyuddin A, Qamar R, Mazhar K, Zerjal T, Mehdi S, Tyler-Smith C. (2000). "*Identification and characterization of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information*". Nucleic Acids Res. 28 (2): e8.

* **Baechtel FS**, (1989). "*The extraction, purification and quantification of DNA*". Proc. Of the Intl. Symp. On the Forensic Aspects of DNA Analysis. FBI Forensic Science Research and Training Center: Quantico, VA; p 25.

* **Bär W**, Kratzer A, Mächler M, Schmid W (1988). "*Post-mortem stability of DNA*". *Forensic Sci. Int.* 39 : 59-70.

* **Bär W**, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B. (1997). "*DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems*". *Int. J. Leg. Med.* 110: 175-176.

* **Barber MD**, Piercy RC, Andersen JF, Parkin BH. (1995a). "*Structural variation of novel alleles at the HumVWA and HumFES/FPS short tandem repeat loci*". *Int. J. Leg. Med.* 108: 31-35.

* **Barber MD y Parkin BH.** (1995b). "*Sequence analysis and alelis designation of the two short tandem repeat loci D18S51 and D8S1179*". *Int. J. Leg. Med.* 109: 62-65.

* **Barber MD**, McKeown BJ, Parkin B, (1996). "*Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus*". *Int. J. Leg. Med.* 108: 180-185.

* **Barberá y cols.**, 1993. "*Cualidades de los dibujos digitales*". *Policía Científica*. Ed. Tirant lo Blanch, pp.: 109-145.

* **Baron H**, Hummel S, Herrmann B, (1996). "*Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient bones*". *J. Archaeol. Sci.*

* **Bartels Y**, Grzes ChiK KH, Cooper DN, Schmarke J (1986) "*Regional mapping of six cloned DNA sequences on human chromosome 7*". *Am. J. Hum. Genet.* Vol. 38, pp: 280-287.

* **Bassam y cols.**, (1991). "*Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels*". *Anal. Biochem.* 196: 80-83.

* **Becker CH**, Li J, Shaler TA, Hunter JM, Lin H, Monforte JA (1997). "*Genetic analysis of short tandem repeat loci by time-of-flight mass spectrometry*". *Proceedings from the Seventh International Symposium on Human Identification* (Promega 1996), pp.: 158-162.

* **Bendall KE**, Sykes Bc, (1995). "*Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region*". *Am. J. Hum. Genet.* 57: 248-256.

* **Bendall KE**, Macaulay VA, Baker JR, Sykes B, (1996). "*Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region*". *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1276.

- * **Bodenteich A**, Mitcell LG, Polymeropoulos MH, Merrill CR, (1992). "*Dinucleotide repeat in the human mitochondrial D-Loop*". Hum. Mol. Genet. May 1 (2): 140.
- * **Borst P**, (1972). "*Mitochondrial Nucleic Acids*". Ann. Rev. Biochem. 41: 333.
- * **Borst P**, Grivell LA, (1981). "*Small is beautiful. Portrait of a mitochondrial genome*". Nature 290: 443.
- * **Bouffard GG**, Iyer LM, Idol JR, Braden VV, Cunningham AF, Weintraub LA, Mohr-Tidwell RM, Peluso DC, Fulton RS, Leckie MP, Green ED. (1997). "*A collection of 1814 human chromosome 7-specific STSs*". Genome Res. 7: 59-64.
- * **Bowcock AM**, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. (1994). "*High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites*". Nature 368, pp.: 455-457.
- * **Bradley HC**, (1938). "*Autolysis and atrophy*". Phisiol. Rev., 18: 173.
- * **Breslauer KJ**, Frank R, Blocker H, Markey LA, (1986). "*Predicting DNA duplex stability from the base sequence*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3746-3750.
- * **Brkic H**, Strinovic D, Slaus M, Skavic J, Zecevic D, Milicevic M. (1997). "*Dental identification of war victims from Petrinja in Croatia*". Int. J.. Legal Medicine 110: 47-51.
- * **Brown PO**, Botstein D. (1999). "*Exploring the new world of the genome with DNA microarrays*". Nature Genetics 21: 33-37.
- * **Brown TA**, Allaby RG, Brown KA, O'donoghue K y Sallares R. (1994). "*DNA in wheat seeds from European archeological sites*". Experientia 50: 571-575.
- * **Brunk CF**, Jones KC, James TW, (1979). "*Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates*". Anal. Biochem. 92: 497-500.
- * **Brynes JJ**, Downey KM, Esserman L, So AG. (1975). "*Mechanism of hemin inhibition of erythroid cytoplasmic DNA polymerase*". Biochemistry, Vol. 14, No. 4, pp.: 796-799.
- * **Budowle B**, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenbreg AJ, Allen R. (1991). "*Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high resolution PAGE*". Am. J. Hum. Genet. 48: 137-144.
- * **Budowle B**, Baechte FS, Smerick JB, Presley KW, Giusti AM, Parsons G, Alevy MC y Chakraborty M (1995). "*D1S80 population data in African*

Americans, Caucasians, Southeastern Hispanics, Southwestern Hispanics and Orientals". Journal of For. Sci., 40, nº 1: 38-44.

* **Budowle B**, Wilson MR, DiZinno JA, Stauffer C, Fasano MA, Holland MM, Monson KL, (1999). "*Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data*". Forensic Sci. Int. 103: 23-35.

* **Buikstra JE y Ubelaker DH**. "Standards for data collection from human skeletal remains". Arkansas Archeological Survey Research Series nº 44. Fayetteville, Arkansas, 1994.

* **Buoncristiani M**, von Beroldingen C, Sensabaugh GF, (1990) "*Effects of U.V. damage on DNA amplification by the polymerase chain reaction*". In: Polesky HF, Mayr WR (eds.) *Advances in Forensic Haemogenetics*, vol. 3. Berlin: Springer-Verlag, pp. 151-153.

* **Burgoyne B** y Hewish DR, (1978). "*The regular substructure of mammalian nuclei and nuclear Ca-Mg endonuclease*". The cell nucleus 4: 47.

* **Butler JM**, McCord BR, Jung JM, Allen RO. (1994) "*Rapid analysis of the short tandem repeat HUMTH01 by capillary electrophoresis*". BioTechniques 17: 1062-1070.

* **Butler JM**, Li J, Shaler TA, Monforte JA, Becker CH (1998). "*Reliable genotyping of short tandem repeat loci without an allelic ladder using time-of-flight mass spectrometry*". Int. J. Leg. Med 112: 45-49.

* **Butzow J**, Eichorn G, (1975). "*Different susceptibility of DNA and RNA to cleavage by metal ions*". Nature 254: 358.

* **Cann RL**, (1988). "*DNA and human origins*". Ann. Rev. Anthropol. 17: 127.

* **Cattaneo C**, Smillie DM, Gelsthorpe K, Piccinini A, Gelsthorpe AR y Sokol RJ. (1995). "*A simple method for extracting DNA from old skeletal material*". J. Forensic Sci. 74: 167-174.

* **Cimino GD**, Gamper HB, Isaacs ST, Hearst JE (1985). "*Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry*". Annu. Rev. Biochem. 54: 1151-1193. *Annu Rev Biochem* 1985;54:1151-93

* **Clayton TM**, Whitaker JP, Fisher CL, Lee DA, Holland MM, Weedn VW, Maguire CN, DiZinio JA, Kimpton CP, Gill P. (1995). "*Further validation of a quadruplex STR DNA typing system: a collaborative effort to identify victims of a mass disaster*". Forensic Science International 76 : 17-25.

* **Comey CT**, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel FS, (1994). "*DNA extraction strategies for amplified*

fragment length polymorphism analysis". Journal of Forensic Sciences, Vol. 39, Nº 5, pp.: 1254-1269.

* **Cone RW**, Fairfax MR. (1993). "*Protocol for ultraviolet irradiation of surfaces to reduce PCR contamination*". PCR methods and applications, 3. Cold Spring Harbor Laboratory; pp : s15-s17.

* **Cooper A**, (1992). "*Removal of colourings inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contamination from ancient samples*". Ancient DNA Newsletter 1, 31-32.

* **Cooper A**, Mourer-Chuviré C, Chambers GD, von Haeseler A, Wilson AC, Pääbo S. (1992). "*Independent origins of New Zealand Moas and Kiwis*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, nº 18, pp.: 8741-8744.

* **Cooper G**, Amos W, Hoffman D, Rubinsztein DC. (1996). "Network analysis of human Y microsatellite haplotypes". *Hum. Mol. Genet.* 5 : 1759-1766.

* **Coulondre C**, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W (1978) "*Molecular basis of base substitution hotspots in E. Coli*". Nature 274 : 775-780.

* **Chang C-C**, Boezi JA, Warren ST, Sabourin CLK, Liu PK, Glatzer L, Trosko JE (1981). "*Isolation and characterization of a UV-sensitive hypermutable aphidicolin-resistant Chinese hamster cell line*". Somatic Cell Genet. 7 (2) : 235-253.

* **Chen X**, Prossner R, Simonetti S, Sadlock J, Jagiello G, Schon EA, (1995). "*Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes*". Am. J. Hum. Genet. 57: 239.

* **Christidis L**, Leeton PR & Westerman M. (1996). "*Were bowerbirds part of the New Zealand fauna?*". Proc. Natl Acad. Sci. USA 93, 3898–3901; erratum 93, 14992

* **Chu G**, Chang E (1988). "*Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA*". Science 242 (4878): 564-567.

* **Chu G**, Chang E (1990). "*Cisplatin-resistant cells express increased levels of a factor that recognizes damaged DNA*". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 87(9): 3324-3328.

* **Davidsohn I**. "Examination of semen". In: Henry JB, editor. Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 18th ed. Philadelphia: Saunders, 1991: 498-503.

* **de Franchis R**, Cross NCP, Foulkes NS, Cox TM. (1988). "*A potent inhibitor of Taq DNA polymerase copurifies with human genomic DNA*". Nucleic Acids Res., Vol. 16, p.: 10355.

* **Demple B**, Johnson A, Fung D, (1986). "Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia Coli*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7731.

* **DeSalle R**, Barcia M, Wray C. (1993). "PCR jumping in clones of 30 million-year-old DNA fragments from amber preserved termites (*Mastotermes electrodominicus*)". Experientia 49, pp.: 906-909.

* **Dickerson R**, Geis Y, (1969) "The structure and action of proteins". pp. 59-66 New York : Harper & Row.

* **DNA recommendations-** "1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) system". Int. J. Leg. Med. (1994) 107: 159-160.

* **Doran GH**, Dickel DN, Ballinger WE, Agee OF, Laipis PJ, Hauswirth WW, (1986). "Anatomical, cellular and molecular analysis of 8000-yr-old human brain tissue from the Windover archaeological site". Nature, vol. 323, pp.: 803-806.

* **Drake JW**, (1969) "Comparative rates of spontaneous mutation" Nature 221 : 1132.

* **Eckert KA**, Kunkel TA (1991). "DNA polimerasa fidelity and the polymerase chain reaction". PCR 1: 17-24.

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

* **Erlich HA**, Sheldon EL, Horn J, (1986). "HLA typing using DNA probes". Bio. Technol., 4: 975-981.

* **Evans DM**, Moseley BEB (1985). "Identification and initial characterisation of a pyrimidine dimer UV endonuclease (UV endonuclease beta) from *Deinococcus radiodurans*; a DNA-repair enzyme that requires manganese ions". Mutat. Res. 145 (3): 119-128.

* **Farinelli Fierro M**. (1993). "Identification of human remains". En: Spitz WU (ed.). Medicolegal investigation of death, 3^a ed. Charles E. Thomas, Springfield, Ill. pp.: 71-117.

* **Fisher DL**, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Wicox AW, Wadhams M, Weedn vW, (1993). "Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone". J. Forensic Sci. 38 (1): 60-68.

- * **Fox CL**, (1996). "*Analysis of ancient mitochondrial DNA from extinct aborigenes from Tierra del Fuego-Patagonia*". *Ancient Biomolecules* 1: 43-54.
- * **Freier SM**, Kierzek R, Jaeger JA, Sugimoto N, Caruthers MH, Nielson T, Turner DH. (1986). "*Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stabilit*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9373-9377.
- * **Friedberg EC** (1985) *DNA repair*. WH Freeman, New York.
- * **Frost HM**, (1960). "*Measurement of osteocytes per unit volume components of osteocytes and canaliculae in man*". *Henry Ford Hospital Bulletin* 9: 137.
- * **Gaster y cols.** (1995). "Survey of trinucleotide repeats in the human genome: assesment of their utility as genetic markers". *Hum. Mol. Genet.* 4: 1829-1836.
- * **Gibson DT** (Ed.), (1984). "Microbial degradation of organic compounds". Marcel Dekker: New York, NY.
- * **Giles RE**, Blanc H, Cann HM, Wallace DC, (1980). "*Maternal inheritance of human mitochondrial DNA*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 77: 6715-6719.
- * **Gill y cols.**, (1985). "Forensic application of DNA fingerprints". *Nature*, 318, pp.: 577-579.
- * **Gill P**, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett Y, Hagelberg E, Sullivan K (1994). "*Identification of the remains of Romanov family by DNA analysis*". *Nature Genetics* 6, pp : 130-135.
- * **Gill P**, Brinkmann B, D'Aloja E, Abdersen J, Bar W, Carracedo A y cols. (1997) "*Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature*". *For. Sci. Int.* 87: 185-192.
- * **Gill P**, Whitaker J, Flaxman C, Brown N and Buckleton J. (2000). "*An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA*". *Forensic Sci. Int.* 112 (1): 17-40.
- * **Ginther C**, Issel-Tarver L, King MC . (1992) "*Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from Teeth*". *Nature genetics* 2: 135-138.
- * **Gisbert Calabuig**. (1991). *Medicina Legal y Toxicología*. 4ª Ed. Salvat editores S.A. Barcelona.
- * **Golenberg EM**, Bickel A, Weihs (1996). "*Effect of highly fragmented DNA on PCR*". *Nucleic Acid Reserch*, Vol. 24, nº 24: 5026-5033.

* **Goloubinoff P**, Pääbo S, Wilson A. (1993). "Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *adh2* gene segment from archaeological specimens". Proc. Natl. Acad. Sci.. USA, 90: 1997-2001.

* **Goodyear PD**, Mac Laughlin S, Mason IJ, (1994). "A reliable method for the removal of Co-Purifying PCR inhibitors from ancient DNA". BioTechniques, vol. 16, nº 2: 232-235.

* **Graves** (1995). "The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y borne genes: An evolving understanding". BioEssays 17: 311-320.

* **Gusmao L**, Alves C, Amorim A. (2001). "Molecular characteristics of four human Y-specific microsatellites (*DYS434*, *DYS437*, *DYS438*, *DYS439*) for population and forensic studies". Ann. Hum. Genet. 65 (Pt 3): 285-291.

* **Gyllensten U**, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC, (1991). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice". Nature 352: 225.

* **Hagelberg E**, Sykes B, Hedges R. (1989). "Ancient bone amplified". Nature 342: 485.

* **Hagelberg E**, Gray IC, Jeffreys AJ. (1991a). "Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis". Nature 352 : 427-429.

* **Hagelber E**, Clegg JB. (1991b). "Isolation and characterisation of DNA from archeological bone". Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 244 : 45-50.

* **Hagelberg E.**, Bell L. S., Allen T. Boyde A. Jones S., Clegg J. B. (1991c). "Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications". Phil. Trans. R. Soc. Lond. 333: 399-407.

* **Hagelberg E** (1994) " Mitochondrial DNA from ancient bones". In: Ancient DNA. Hermann and Hummel eds. Springer-Verlag. PCR Microsatellite analysis, pp. 195-204.

* **Hagelberg E**, Quevedo S, Turbón D, Clegg JB, (1994). "DNA from ancient Easter Islanders". Nature, vol. 369, pp.: 25-26.

* **Ham AW** (1975). "Hueso". En: Tratado de Histología. 7ª edición. Editorial Interamericana, pp. 279 y 353-357.

* **Hammer** (1994). "A recent insertion of an Alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies". Mol. Biol. Evol., 11 : 749-761.

* **Hammer y Zegura** (1996). "The role of the Y chromosome in human evolutionary studies". Evol. Antropol. 5 (4): 116-134.

- * **Hammond HA**, Caskey CT. (1992). "*Personal identification via short tandem repeats*". Proceedings from the 3rd International Symposium on Human Identification, pp.: 161-172.
- * **Handt O**, Höss M, Krings M, Pääbo S. (1994). "*Ancient DNA: methodological challenges*". *Experientia* 50, pp.: 524-529.
- * **Harashima N**, Liu C, Katsuyama Y, Ota M, Fukushima H (1997). "*Sequence variation of allele 27 at the D1S80 locus*". *Int. J. Legal Med.* 110: 22-26.
- * **Hauge XY**, Litt M (1993). "*A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphism by the PCR*". *Hum. Mol. Genet.* 2: 411-415.
- * **Hauswirth WW**, Dickel CD, Doran GH, Laipis PJ, Dickel DN (1991). "*8000 year old human brain tissue from the Windover site: anatomical, cellular and molecular analysis*". In: Ortner DJ, Aufderheide AC (eds.) *Human Paleopathology: Current Synthesis and Future Options*. Washintong, DC: Smithsonian Press, pp:60-72.
- * **Hellmann A**, Rohleder U, Schmitter H, Wittig M.(2001). "*STR typing of human telogen hairs-a new approach*". *Int J Legal Med.* 14 (4-5): 269-73.
- * **Henner WD**, Grunberg SM, Haseltine WA, (1982). "*Sites and structure of gamma radiation-induced DNA strand breaks*". *J. Biol. Chem.* 257: 11750.
- * **Heukeshoven J**, Dernick R (1985). "*Simplified methods for silver staining of proteins in polyacrilamide gels and the mechanism of silver staining*". *Electrophoresis* 1985 n° 6: 103-112.
- * **Higuchi R**, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. (1984). "*DNA sequences from the Quagga, an extinct member of the horse family*". *Nature*, vol. 312, n° 5991, pp.: 282-284.
- * **Higuchi R.**, von Beroldingen C., Sensabaugh G. F., Erlich H. (1988). "*DNA typing from single hairs*". *Nature* 332: 543-546.
- * **Higuchi R.** (1989). "*Simple and rapid preparation of samples for PCR*". En: *PCR technology. Principles and applications for DNA technology*. Erlich HA ed. Nueva York: Stockton press, pp.: 31-43
- * **Hochmeister MN**, Budowle B, Borer UV, Eggman U, Comey T, Dirnhofer R. (1991). "*Identification of unknown human remains: amplification and typing of DNA extracted from compact bone tissue*". *J. Forensic Sci.* 36 : 1649-1661.
- * **Hochmeister MN**, Budowle B, Borer UV, Rudin O., Bohnert, Dirnhofer R. (1995). "*Confirmation of the identity of human skeletal remains using*

multiplex PCR amplification and typing kits". Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol. 40; No. 4, pp.: 701-705.

* **Holland MM**, Fisher DL, Roby RK, Ruderman J, Bryson C, Weedn VW (1995). "*Mitochondrial DNA sequence analysis of human remains*". Crime Lab Digest 22: 109-115.

* **Holland MM**, Parsons TJ, (1999). "*Mitochondrial DNA sequence analysis – Validation and use for forensic casework*". Forensic Sci. Rev. 11: 21-50.

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

* **Hopwood AJ**, Mannucci A, Sullivan KM (1996). "*DNA typing from human faeces*". Int. J. Leg. Med. 108: 237-243.

* **Horai S**, Hayasaka K, Murayama K, Wate N, Koike H, Nakai N (1989) "*DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis*". Pro. Jap. Acad. 65 : 229-233.

* **Höss M**, Pääbo S (1993). "*DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method*". Nucleic Acids Res. 21 : 3913-3914.

* **Huang NE**, Chakraborty R, Budowle B (1994). "*D1S80 allele frequencies in a Chinese population*". Int. J. Leg. Med. 107: 118-120.

* **Huhne J**, Pfeiffer H, Brinkmann B. (1999a). "*Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples*". Int J Legal Med 112 (1): 27-30.

* **Huhne J**, Pfeiffer H, Waterkamp K, Brinkman B, (1999b). "*Mitochondrial DNA in human hair shafts – existence of intra-individual differences?*". Int. J. Leg. Med. 112: 172-175.

* **Hummel S**, Herrmann B, (1991). "*Y-chromosome specific DNA amplified in ancient bone*". Naturwissenschaften 78, pp.: 266-267.

* **Hummel S**, Nordsiek G, Herrmann B, (1992). "*Improved efficiency in amplification of ancient DNA and its sequence analysis*". Naturwissenschaften 79, 359-360.

* **Hummel S**, Schultes T, Bramanti B, Herrmann B, (1999). "*Ancient DNA profiling by megaplex amplications*". Electrophoresis 20, pp.: 1717-1721.

* **Hunkapiller T**, Kaise RJ, Koop BF, Hood L, (1991). "*Large-scale and automated DNA sequence determination*". Science 254: 59-67.

- * **Ingman M**, Kaessmann H, Pääbo S, & Gyllensten U. (2000). "Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans". *Nature* 408, 708–713.
- * **Innis MA**, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA, (1988). "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85 (24): 9436-9440.
- * **Innis MA**, Gelfand DH. (1990). In: "PCR protocols". Eds. Innis, Gelfand, Sminsky y White. Academic Press. San Diego.
- * **Jacobson SC**, Ramsey JM (1996). "Integrated microdevice for DNA restriction fragment analysis". *Anal. Chem.* 68: 4081-4086.
- * **Jalanko A**, Kere J, Savilahti E, Schwartz M, Syvänen AC, Ranki M y cols. (1992). "Screening for defined cystic fibrosis mutations by solid phase minisequencing". *Clin. Chem.* 38: 39-43.
- * **Jazin EE**, Cavelier L, Eriksson Y, Orelund L, Gyllensten U, (1996). "Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12382-12387.
- * **Jeffreys AJ**, Wilson V, Thein SL, (1985). "Hypervariable minisatellite regions in human DNA". *Nature* 314: 67-73.
- * **Jeffreys AJ.**, Wilson V., Thein S.L. (1985) "Individual specific "fingerprints" of human DNA". *Nature* 316: 76-79.
- * **Jeffreys AJ**, MacLeod A, Tamaki K, Neil DL, Monckton DG (1991). "Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing". *Nature* 354 (6350): 204-9
- * **Jeffreys AJ**, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A. (1992). "Identification of skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis". *Forensic Science Int.* 56, pp.: 65-76.
- * **Jin L**, Underhill PA, Buoncristiani MR, Robertson JM (1997). "Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non-human primates". *J. For. Sci.* 42 (3): 496-499.
- * **Jobling MA**, Tyler-Smith C. (1995). "Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution". *Trends Genet.* 11: 449-456.
- * **Jobling MA**, Pandya A, Tyler-Smith C. (1997). "The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing". *Int. J. Leg. Med.* 110: 118-124.
- * **Jones BK**, Yeung AT, (1988). "Repair of 4,5',8-trimethylpsoralen monoadducts and cross-links by the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (22): 8410-8414.

* **Johnson PH**, Olson CB, Goodman M, (1985). *“Isolation and characterization of deoxyribonucleic acid from tissue of the woolly mammoth, Mammuthus primigenius”*. Comp. Biochem. Physiol. 81B: 1045-1051.

* **Jorns MS** (1989) in *“Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes”* (Muller F, ed.). CRC Press, Boca Ratón, Florida, Vol. 2.

* **Jorns MS**, Wang B, Jordan SP, Chanderkar LP, (1990). *“Chromophore function and interaction in Escherichia coli DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and/or flavin derivatives”*. Biochemistry 29 (2): 552-561.

* **Jukes TH**, (1980) *“Silent nucleotide substitutions and the molecular evolutionary clock”*. Science 210 : 973 - 978.

* **Kadasi L**, Bohusova T, (1995). *“A new extremely large allele at the D1S80 (pMCT118) locus”*. J. Forensic. Sci. 40: 906-907.

* **Kasai K**, Nakamura Y 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. For. Sci. 35, nº 5: 1196-1200.

* **Kayser M**, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Roewer L, y cols. (1997): *“Evaluation of Y chromosomal STRs: a multicenter study”*. Int. J. Leg. Med. 110: 125-133.

* **Keeney S**, Linn S, (1990). *“A critical review of permeabilized cell systems for studying mammalian DNA repair”*. Mutation Res. 236 (2-3): 239-252.

* **Kim HS**, Smiyhies O, (1988). *“Recombinant fragment assay for gene targetting based on the polymerase chain reaction”*. Nucl. Acids Res. 16 (18): 8887-8903.

* **Kim ST**, Sancar A. (1995). *“Photorepair of nonadjacent pyrimidine dimers by DNA photolyase”*. Photochem. Photobiol. 61 (2): 171-174.

* **Kimpton CP**, Walton A, Gill P. (1992) *“A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vVF gene”*. Hum. Mol. Genet. 1: 287.

* **King MC**. (1991). En: *“Molecular genetic medicine”*. Vol. 1. Ed. Friedmann. Academic Press. San Diego. pp.: 117-131.

- * **King MP**, Attardi G, (1988). *"Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA"*. Cell 52: 811.
- * **Klug WS**, Cummings MR. *Conceptos de Genética (5ªed)*. Ed. Prentice Hall Iberica. Madrid 1999.
- * **Knijff P**, Kayser M, Roewer L. (1998). *"Towards a reliable forensic and population genetic use of chromosome Y microsatellites"*. En: 9th International Symposium on Human Identification, Promega Corporation, Orlando (Florida), Presentación Oral.
- * **Kobilinsky L** (1992). *"Recovery and stability of DNA in samples of forensic science significance"*. Forensic Science Review Vol. 4 N^o 1: 68-87.
- * **Kocher TD**, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC, (1989). *"Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers"*. Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 6196-6200.
- * **Kohn M**, Knauer F, Stoffella A, Schröder W. & Pääbo S. (1995). *"Conservation genetics of the European brown bear — a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences"*. Mol. Ecol. 4, 95–103.
- * **Kornberg A.** (1980) *"DNA replication"*. San Francisco: Freeman.
- * **Krajewski C**, Driskell AC, Baverstock PR, & Braun MJ. (1992). *"Phylogenetic relationships of the thylacine (Mammalia: Thylacinidae) among dasyuroid marsupials: evidence from cytochrome b DNA sequences"*. Proc. R. Soc. Lond. B 250, 19–27.
- * **Krings M**, Stone A, Schmitz R, Krainitzki H, Stoneking M, Pääbo S. (1997). *"Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans"*. Cell, vol. 90: 19-30.
- * **Krings M**, Geisert H, Schmitz RW, Krainitzki H, Pääbo S, (1999). *"DNA sequence of the mitochondrial hypervariable region II from the Neandertal type specimen"*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 96, pp.: 5581-5585.
- * **Krings M** y cols. (2000). *"A view of Neandertal genetic diversity"*. Nature Genet. 26, 144–146.
- * **Krokan H**, Wist E, Krokan RH, (1981). *"Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase alpha and isolated nuclei by a similar mechanism"*. Nucleic Acids Res. 9 (18): 4709-4719.
- * **Kunkel TA**, Loeb LA, (1981). *"Fidelity of mammalian DNA polymerases"*. Science 213: 765-767.

* **Kwok S.**, Higuchi R. (1989). "Avoiding false positives with PCR". *Nature* 339: 237-238.

* **Labarca C**, Paigen K, (1980). "A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure". *Anal Biochem.* 102: 344-352.

* **Lafleur MVM**, Woldhuis J, Loman H, (1979). "Alkali-labile sites and post-irradiation effects in gamma-irradiated biologically active double stranded DNA in aqueous solution". *Int. J. Radiat. Biol.* 36: 241.

* **Lalueza C**, Pérez-Pérez A, Prats E, Cornudella L, Turbón D, (1997). "Lack of founding Amerindian mitochondrial DNA lineages in extinct aborigines from Tierra del Fuego-Patagonia". *Human Molecular Genetics* 6 (1): 41-46.

* **Lassen C**, Hummel S, Herrmann B. (1994). "Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue". *Int J Legal Med.* 107(3):152-5.

* **Lassen C**, Hummel S, Herrmann B, (1996). "PCR based sex identification of ancient human bones by amplification of X- and Y-chromosomal sequences: a comparison". *Ancient Biomolecules*, vol. 1, 1, pp.: 25-33.

* **Lawlor DA**, Dickel CD, Hauswirth WW, Parham P. (1991). "Ancient HLA genes from 7.500 year old archeological remains". *Nature*, Vol. 349, pp: 785-787.

* **Lee HC**, Pagliaro EM, Berka KM, Folk NL, Anderson DT, Ruano G, Keith TP, Phipps P, Herrin GL, Garner DD, Gaensslen RE. (1991). "Genetic markers in human bone: I. Deoxyribonucleic Acid (DNA) analysis". *J. For. Sci.*, Vol. 36, No. 2, pp.: 320-330.

* **Lehninger A**, (1981). "Curso breve de Bioquímica". Eds Omega. Barcelona. Spain.

* **Leonard JA**, Wayne RK, & Cooper A. (2000). "From the cover: population genetics of ice age brown bears". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 1651-1654.

* **Lewin B**, (1987). "Genes III". Wiley, New York, NY.

* **Li H**, Gyllensten UB, Cui X, Saiki RK, Erlich HA, Arnheim N. (1988). "Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells". *Nature* 335: 414-417.

* **Li H**, Schmidt L, Wei MH, Hustad T, Lerman MI, Zbar B, Tory K. (1997). "Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352, D3S1358, D3S1359". *Hum. Mol. Genet.* 2: 1327.

- * **Li SFY**. *Capillary electrophoresis: Principles, Practice, and Applications*. Elsevier: New York, 1992: pp: 1-586.
- * **Li YK**, Sancar A, (1990). "Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair". *Biochemistry* 29 (24): 5698-5706.
- * **Lindahl T**, Andersson A, (1972). "Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid". *Biochemistry* 11 (19): 3618-3623.
- * **Lindahl T**, Nyberg B, (1972). "Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid". *Biochemistry* 11 (19): 3610-3618.
- * **Lindahl T** (1976) "New class of enzymes acting on damaged DNA". *Nature* 259 : 64-66.
- * **Lindahl T** (1982) "DNA repair enzymes". *Ann. Rev. Bioch. (ARB)* 51 :61-88.
- * **Lindahl T**, (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA". *Nature* 362, 709-715.
- * **Lins AM**, Sprecher CJ, Micka KA, Rabbadr D, Bacher J, Schumm JW (1997). "High throughput multiplex STR systems without instrumentation". Seventh International Symposium on Human Identification, pp.: 53-66.
- * **López Palafox J**. (1996). "Identificación de cadáveres calcinados y en grandes catástrofes: aplicación de métodos odontológicos actuales. Importancia de marcadores genéticos en tejido dental". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- * **Lubian**, 1975. "Dactiloscopia". Ed. Reus, pp: 81-82.
- * **Lutz S**, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S, (1997). "A third hypervariable region in the human mitochondrial D-Loop". *Hum. Genet.* 101: 384.
- * **Machie FP**. (1929). "The microscopically changes occurring in organs after death". *Indian J. Med. Res.*, 16: 827.
- * **Mannucci A**, Sullivan KM, Ivanov PL, Gill P. (1993). "Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene *amelogenin*". *Int. J. Legal Medicine* 106, pp.: 190-193.
- * **Mansfield** y cols., (1993). "Alternative labeling techniques for automated fluorescence based analysis of PCR products". *BioTechniques* 15: 274-279.

* **Manfredi G**, Thyagarajan D, Papadopoulou LC, Pallotti F, Schon EA, (1997). "*The fate of human sperm derived mtDNA in somatic cells*". Am. J. Hum. Genet. 61: 953.

* **McCord BR**, Jung JM, Holleran EA. (1993). "*High resolution capillary electrophoresis of forensic DNA using a non-gel sieving buffer*". J. Liq. Chromatogr. 16: 1963-1981.

* **Mills KA**, Even D, Murray JC. (1992). "*Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA)*". Hum. Mol. Genet. 1: 779

* **Möller A**, Meyer E, Brinkmann B (1994). "*Different types of structural variation in STRs: HUMFES/FPS, HUMVWA and HUMD21S11*". Int. J. Leg. Med. 108: 165-166.

* **Montesino M**, Prieto L, Rodríguez A, Rivas E, García E. "*Mitochondrial DNA VR2 region analysis in a Spanish population: Application to forensic casework*". XVIII Congress International Academy of Legal Medicine. Sep 2000. Santiago de Compostela.

* **Morley JM**, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G. (1999). "*Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework*". Int. J. Legal Medicine 112: 241-248.

* **Mu D**, Hsu DS, Sancar A. (1996). "*Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease*". J. Biol. Chem. 271(14): 8285-94 .

* **Mullis K. B.**, Faloona F., Scharf S. J., Saiki R. K., Horn G. T., Erlich H. A. (1986). "*Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*". Cold Spring Harbor. Sym. Quant. Biol. 51: 263-27.

* **Mullis K. B.**, Faloona F. (1987). "*Specific synthesis of DNA in vitro polymerase catalyzed chain reaction*". Meth. Enzymol. 155: 335-350.

* **Nagai A**, Yamada S, Bunai Y, Ohya I (1994). "*Analysis of the VNTR locus D1S80 in a Japanese population*". Int. J. Leg. Med. 106: 268-270.

* **Nakamura Y**, Leppert M, O'connell P, Wolf R, Holm T, Culver M, Martín C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlim E y White R. (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)*". Nucleic Acids Res., 16 : 9364.

* **Noll M**, (1974). "*Subunit structure of chromatin*". Nature 251: 249.

- * **Oberg B**, (1989). “*Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium)*”. *Pharmacol. Ther.* 40 (2): 213-285.
- * **Pääbo S** (1985) “*Preservation of DNA in ancient Egyptian mummies*”. *J. Archeol. Sci.* 12 : 411-417.
- * **Pääbo S**, Gifford JA, Wilson AC. (1988). “*Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain*”. *Nucleic Acids Res.* 16 : 9775-9787.
- * **Pääbo S** (1989) “*Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification*”. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 86: 1939-1943.
- * **Pääbo S**, (1990) “*Amplifying ancient DNA*”. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) *PCR Protocols: A guide of methods and amplifications*. San Diego: Academic Press, pp. 159-166.
- * **Pääbo S**, Irwin DM, Wilson AC (1990a) “*DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification*”. *J Biol. Chem.* 265: 4718-4721.
- * **Pääbo S**, Irwin DM, Wilson AC (1990b) “*Enzymatic amplification from modified DNA templates*”. *L Biol Chem* 265 : 4718-4721.
- * **Pääbo S**, Wilson AC, (1991) “*Miocene DNA sequences- a dream come true?*”. *Current Biology* 45-46.
- * **Pääbo, S.** (2000). “*Of bears, conservation genetics, and the value of time travel*”. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 1320–1321.
- * **Parsons W**, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM, (1998). “*Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: Application of mtDNA sequence analysis to a forensic case*”. *Int. J. Leg. Med.* 111: 124-132.
- * **Patterson M**, Chu G, (1989). “*Evidence that xeroderma pigmentosum cells from complementation group E are deficient in a homolog of yeast photolyase*”. *Mol. Cell Biol.* 9 (11): 5105-5129.
- * **Payne G**, Wills M, Walsh C, Sancar A, (1990). “*Reconstitution of Escherichia coli photolyase with flavins and flavin analogues*”. *Biochemistry* 29 (24): 5706-5711.
- * **Pena y cols.**, “*Paternity testing in the DNA era*”. *Trends Genet.* (1994) 10: 204-209.
- * **Perkin-Elmer Corporation.** (1999). “*DNA Quantitation*”. En: *AmpFISTR SGM Plus PCR Amplificatio Kit. User’s Manual*, USA, pp.: 4.1-4.6.

* **Perry W.L.**, Bass W.M., Riggsby w.s. y Sirotkin K. (1988). "The autodegradation of deoxyribonucleic acids (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death". *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol.33, No. 1, pp.: 144-153.

* **Pestoni C**, Cal ML, Lareu MV, Rodriguez-Calvo MS, Carracedo A. (1999). "Y chromosome STR haplotypes: genetic and sequencing data of the Galician population (NW Spain)". *Int. J. Leg. Med.* 112: 15-21.

* **Petruska J**, Goodman MF, Boosalis MS, Sowers LC, Cheong C, Tinoco Y, (1988). "Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (17) : 6252-6256.

* **Pfizinger H.**, Ludes B., Mangin P. (1993). "Sex determination of forensic samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence". *Int. J. Legal Med.* 105(4): 213-216.

* **Poinar HN**, Cano R, Poinar Jr GO. (1993). "DNA from an extinct plant". *Nature* 363: 677.

* **Poinar HN**, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S, (1998). "Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops Shastensis*". *Science* 281: 402-406.

* **Polymeropoulos MH**, Rath DS, Xiao H, Merrill CR. (1991a). "Tetranucleotide repeat polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (*F13A1*)". *Nucleic Acids Res.* 19: 4306.

* **Polymeropoulos MH**, Rath DS, Xiao H, Merrill CR. (1991b). "Tetranucleotide repeat polymorphism at the human *c-fes/fps* proto-oncogene (*FES*)". *Nucleic Acids Res.* 19: 4018.

* **Pötsch** y cols., (1994). "HLA-DQA typing of human fingernails". En: *Advances in Forensic Haemogenetics 5*. Bär, Fiori and Rossi Eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg).

* **Prieto L**, Arroyo E, Pérez-Pérez A, Arenal I, Asperilla C, Turbón D. "Simultaneous Typing of five loci in ancient DNA of three Basque populations". Comunicación a congreso: Ancient DNA III. Julio 1995, Oxford .

* **Prieto L**, Arroyo E, Pérez-Pérez A, Asperilla C, Arenal I, Ruiz de la Cuesta JM, Turbón D. "A multiplex amplification approach for simultaneous typing of five loci in DNA of ancient Basque populations". En: "Advances in Forensic Haemogenetics 6". Carracedo A, Brinkmann B, Bär W Eds. Springer, 1996, Germany; pp: 204-206.

* **Prieto L**, Cámara T, Carralero T, Palafox J, Andradas J. (1997). "*Estrategias seguidas en la identificación de un cadáver*", en las II Jornadas de Genética Forense, GEP-ISFG, Funchal (Madeira).

* **Prieto L**, León A, García E, Montesino M, Prat E, Rodríguez-Monge A, Rivas E. (2000). "*Comparación de distintos métodos de extracción de ADN en restos óseos para análisis de STRs vía PCR*", V Jornadas de Genética Forense, GEP-ISFG, Funchal (Madeira).

* **Prieto L**, León A, Díaz M, Montesino M, Rodríguez-Monge A, Carralero J, García Poveda E. (2001). "*Identificación genética de un niño de tres años a partir de gérmenes dentarios incluidos en un fragmento de mandíbula*". VI Jornadas de Genética Forense, GEP-ISFG, Córdoba (Argentina).

* **Prinz M**, Boll K, Baum H, Shaler B. (1997). "Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples". *Forensic Sci. Int.*, 85: 209-218.

* **Puers, C.**, Lins, A.M., Sprecher, C.J., Brinkmann, B. and Schumm, J.W. (1993) "*Analysis of polymorphic short tandem repeat loci using well-characterized allelic ladders.*" Proceedings from the 4th International Symposium on Human Identification. pp. 161-172.

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

* **Ramos MD**, Lalueza C, Girbau E, Pérez-Pérez A, Quevedo S, Turbón D, Estivill X, (1995). "*Amplifying dinucleotide microsatellite loci from bone and tooth samples of up to 5000 years of age: more inconsistency than usefulness*". *Human genetics* 96 (2): 205-212

* **Rath DS** y Merrill CR, (1989). "*Mitochondrial DNA and its forensic potential*". Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis, FBI Forensic Science Research and Training Center: Quantico, VA, p.: 113.

* **Robertson JM**, (1994). "*Evaluation of native and denaturing polyacrilamide gel electrophoresis for short tandem repeat analysis*". *Adv. Forensic Haemogenet.* 5: 320-322.

* **Rodríguez Calvo MS**, Bellas S, Souto L, Vide C, Valverde E, Carracedo A (1996). "*Population data on the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and Gc in three Southwest European Populations*". *J. of For. Sci.* 41, nº 2: 291-296.

* **Rogan P**, Salvo J (1991) "*Study of nucleic acids isolated from ancient remains*" Year book of Physical Anthropology. 33 : 195-214.

* **Rogan P**, Salvo J, Tooley P (1990) "*Use of universal PCR primers amplify 28S ribosomal DNA from taxonomically diverse organisms*".

Proceedings of the 4th International Congress of Systematic and Evolutionary Biology, vol. 2 . College Park, Md: University of Maryland, p. 393.

* **Rogers SO**, Bendich AJ. (1985). "*Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues*". Plant molec. Biol. 5: 69-76.

* **Rolf B**, Möller K, Schürenkamp M, Brinkmann B, (1997). "*Automatische analyse von hoch effizienten STRs*". Rechtsmedizin 7: 157-161.

* **Rollo F**, Venanzi FM, Amici A. (1991). "*Nucleic acids in mummified plant sedes: biochemistry and molecular genetics of pre-Columbian maize*". Genet. Res. 58: 193-201.

* **Ross PL**, Belgrader P (1997). "*Analysis of short tandem repeat polymorphism in human DNA by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*". Anal. Chem. 69: 3966-3972.

* **Rossen L**, Norskov P, Holmstrom K, Rasmussen OF, (1992). "*Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*". Int. J. Food Microbiol. 17: 37-45.

* **Ruano G**, Fenton W, Kidd KK, (1989). "*Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster" PCR*". Nucl. Acids Res. 17, 5407.

* **Ruano G**, Brash DE, Kidd KK, (1991). "*PCR: the first few cycles*". Amplifications, 7: 1-4.

* **Ruano G**, Pagliaro EM, Schwartz TR, Lamy K, Messina D, Gaensslen RE y Lee HC, (1992). "*Heat-soaked PCR: an efficient method for DNA amplification with applications to forensic analysis*". Biotechniques 13 (2): 266-274.

* **Saiki RK**, Scharft F, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) "*Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*". Science 230 : 1350-1354.

* **Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi RH, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). "*Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*". Science 239 : 487-491.

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

* **Sajantila A**, Ström M, Budowle B, Karhunen PJ, Peltonen L. (1991). "*The polymerase chain reaction and post - mortem forensic identity testing: application*

of amplified D1S80 and HLA-DQ α loci to the identification of fire victims". Forensic Sci. International, 51 : 23-34.

* **Salas A**, 1999. Estudio de la variabilidad molecular del ADN mitocondrial humano. Universidad de Santiago de Compostela, Tesis doctoral

* **Salas A**, Lareu V, Calafell F, Bertranpetit J, Carracedo A. (2000). "*mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies*". Eur J Hum Genet 8 (12): 964-74

* **Salas A**, Lareu MV, Carracedo A. (2001). "*Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report*". Int. J. Legal Med. 114 (3): 186-90 .

* **Sambrook S.**, Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). "*Molecular cloning. A Laboratory Manual*". 2nd. ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

* **Sancar A**, Sancar GB, (1988). "*DNA repair enzymes*". Annu. Rev. Biochem. 57: 29-67.

* **Sancar GB**, (1990). "*DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair*". Mutation Res. 236 (2-3): 147-160.

* **Sancar A**. (1994). "*Mechanisms of DNA excision repair*". Science 266 (5193): 1954-1956.

* **Sancar A**. (1995). "*Excision repair in mammalian cells*". J. Biol. Chem. 270 (27): 15915-8.

* **Sancar GB**, Siede W, van Zeeland AA. (1996). "*Repair and processing of DNA damage: a summary of recent progress*". Mutat. Res. 362(1): 127-146.

* **Sancar A**. (1996). "*DNA excision repair*". Annu. Rev. Biochem. 65: 43-81. Erratum in: Annu. Rev. Biochem. 1997; 66: VII.

* **Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR. (1977). "*DNA sequencing with chain terminating inhibitors*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.

* **Sancar GB** (2000). "*Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting*". Mutat Res 451(1-2):25-37.

* **Sanz Nicolás P.**, Prieto Ruiz-Canela V. "*Restos biológicos de interés forense*". En: La prueba del ADN en Medicina Forense. 1999, Masson S.A. Barcelona.

* **Sasaki M**, Shiono H, Fukushima T, Shimizu K. (1997). "*Human identification by genotyping of personal articles*". Forensic Science Int. 90, pp.: 65-75.

* **Schiffenbauer J**, Didier DK, Klearman M, Rice K, Shuman S, Tiever VL, Kittlessen DJ, Schwarz BD. (1987). "*Complete sequence of the HLA DQ alpha and DQ beta cDNA from a DR5/DQw3 cell line*". J. Immunol. 139 (1): 228-233. (la corrección de errores a la publicación aparece en J. Immunol. 1991 Mar. 1; 146 (5): 1715)

* **Schildkraut C**, Lifson S. (1965). "*Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration*". Biopolymers 3: 195-208.

* **Schmalzing D**, Kounty L, Adourian A, Belgrader P, Matsudaira P, Ehrlich D (1997). "*DNA typing in thirty seconds with a microfabricated device*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10273-10278.

* **Schmalzing D**, Kounty L, Chisholm D, Adourian A, Matsudaira P, Ehrlich D (1999). "*Two-color multiplexed analysis of eight short tandem repeat loci with an electrophoresis microdevice*". Anal. Biochem. 270: 148-152.

* **Schmidt T**, Hummel S, Herrmann B, (1995). "*Evidence of contamination in PCR laboratory disposables*". Naturwissenschaften 82, 423-431.

* **Scholer G**, Ward JF, Weiss JJ, (1960). "*Mechanisms of the radiation-induced degradation of the nucleic acids*". J. Mol. Biol. 2: 379.

* **Scholz M**, Giddings I, Pusch CM, (1998). "*A polymerase chain reaction inhibitor of ancient hard and soft tissue DNA extracts is determined as human collagen type I*". Anal. Biochem. 259: 283-286.

* **Schrödinger E** (1945) "What is life?" Cambridge, Eng.: Cambridge University Press.

* **Sepulchre MA**, Wiegand P, Brinkmann B (1995). "*D1S80 (pMCT118) analysis of 3 ethnic subpopulations living in Brussels*". Int. J. Legal Med. 108: 45-47.

* **Sharma V** y Litt M (1992). "*Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus*". Hum. Mol. Genet. 1: 67.

* **Sheffield** y cols., (1995). "*A collection of tri- and tetranucleotide repeat markers used to generate high quality, high resolution human genomewide linkage maps*". Hum. Mol. Genet. 4: 1837-1844.

* **Shi Y**, Simpson PC, Scherer JR, Wexler D, Skibola C, Smith MT, Mathies RA. (1999). "*Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance nucleic acid analysis*". Anal. Chem. 71: 5354-5361.

- * **Sibghat-Ullah**, Sancar A, (1990). "Substrate overlap and functional competition between human nucleotide excision repair and *Escherichia coli* photolyase and (a)BC excision nuclease". *Biochemistry* 29 (24): 5711-5718.
- * **Siebert PD**, Fukuda M (1986) "Isolation and characterization of human glycophorin A cDNA clones by synthetic oligonucleotide approach: nucleotide sequence and mRNA structure" *Proceedings of the National Academy of Science USA*. Vol. 83, pp: 1665-1669.
- * **Sigman MH**. "Azoospermia". In: Walsh PC, Retick AB, Stamey TA, Vaughan ED, editors. *Campbell's urology*, 6 th ed. Philadelphia: Saunders, 1992; 676.
- * **Simon C**. *Molecular systematics at the species boundary: Exploiting conserved and variable regions of the mitochondrial genome of animals via direct sequencing from amplified DNA*. In: Hewitt GM, et al. editors. *NATO ASI Series, Vol. H 57. Molecular Techniques in Taxonomy*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1991; 33-71.
- * **Sinden RR**, Cole R, (1978). "Topography and kinetics of genetic recombination in *Escherichia coli* treated with psoralen and light". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75 (5): 2373-2377.
- * **Singer B**, Fraenkel-Conrat H, (1965). "Effects of light in the presence of iron salts on RNA and model compounds". *Biochemistry* 4: 226.
- * **Singer-Sam J**, Tanguay RL, Riggs A. (1989). "Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells". *Amplifications*, Vol. 3: 11.
- * **Skinker DM**, Warnecke SC, Morrow JK, Hunsaker JC 3rd. (1997). "DNA typing of azoospermic semen at the D1S80 locus". *J. Forensic Sci.* 42, n° 4: 718-720.
- * **Skowasch K**, Wiegand P, Brinkmann B, (1992). "pMTC118: a new allelic ladder and an improved electrophoretic separation lead to the demonstration of 28 alleles". *Int. J. Leg. Med.* 105: 165-168.
- * **Sladek FM**, Melian A, Howard-Flanders P, (1989). "Incision by UvrABC excinuclease is a step in the path to mutagenesis by psoralen crosslinks in *Escherichia coli*". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (11): 3982-3986.
- * **Slightom JL**, Blechl AE, Smithies O (1980) "Human fetal G and A γ -globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes" *Cell*, Vol. 21, pp: 627-638.
- * **Sopher IM**. (1993). "Forensic Odontology". En: Spitz WU (de.) *Medicolegal investigation of death*, 3ª de. Charles C. Thomas, Springfield III, pp.: 118-136.

* **Southern E.** (1975) "*Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*". J. Mol Biol. 95: 503-508.

* **Spigelman M,** Lemma E, (1993). "*The use of the polymerase Caín reaction to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons*". Int. J. Osteoarcheol. 3, pp.: 137-143.

* **Spurdle AB,** Jenkins T. (1992), "The Y chromosome as a tool for studying human evolution". Curr. Opin. Genet. Dev. 2: 487-491.

* **Sugiyama E,** Honda K, Katsuyama Y, Uchiyama S, Tsuchicane A, Ota M, y Fucushima H (1993). "*Allele frequency distribution of the D1S80 (pMCT118) locus polymorphism in the Japanese population by the polymerase chain reaction*". Int. J. Legal Medicine 106: 111-114.

* **Sullivan KM,** Hopwood R, Lang B, Gill P. (1991). "*Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA*". Electrophresis 12: 17.

* **Sullivan KM,** Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. (1993) "*A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin*". Biotechniques 15: 636-641.

* **Sullivan KM,** Alliston-Greiner R, Archampong FIA, Piercy R, Tully G, Gill P, Loyd-Davies C, (1997). "*A single diference in mtDNA control region sequence observed between hair shaft and reference samples from a single donor*". Proceedings from the 17th International Symposium on Human Identification; 1996 Sept 19-21; Scottsdale (AZ): 1996; Promega Corporation, pp 126-129.

* **Sweet DJ,** Sweet CHW. (1995). "*DNA analysis of dental pulp to link incinerated remains of homicide victim to crime scene*". J. of Forensic Sci., Vol. 40, No. 2, pp.: 310-314.

* **Syvänen AC,** Aalto-Setälä K, Harju L, Kontula K, Söderlund H. (1990). "*A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E*". Genomics 8: 684-692.

* **Sykes B.** (1991). "*Ancient DNA: the past comes alive*". Nature 352: 381-382.

* **Szibor R,** Michael M, Spitsyn VA, Plate I, Ginter EK, Krause D, (1997). "*Mitochondrial D-loop 3' (CA)_n repeat polymorphism: optimization of análisis and population data*". Electrophoresis 18: 2857-2860.

* **Takahashi M,** Kato Y, Mukoyama H, Kanaya H, Kamiyama S. (1997). "*Evaluation of five polymorphic microsatellite markers for typing DNA from decomposed human tissues - Correlation between the size of the alleles and that of the template DNA*". Forensic Science Int. 90, pp.: 1-9.

- * **Tamura K**, Nei M, (1993). "*Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees*". Mol. Biol. Evol. 10: 512-526.
- * **Taranenko NI**, Golovlev VV, Allman SL, Taranenko NV, Chen CH, Hong J, Chang LY (1998). "*Matrix-assisted laser desorption/ionization for short tandem repeat loci*". Rapid Commun. Mass Spectrom. 12: 413-418.
- * **Teoule R**, Cadet J, (1978). "*Radiation-induced degradation of the base component in DNA and related substances-final products*". En: Bertinchamps AJ, Huttermann J, Kohnlein W, Teowe R (Eds): Effects of ionizing radiation on DNA- Physical, Chemical and Biological aspects; Springer-Verlag: Berlin, Germany; p.: 171.
- * **Thomas RH**, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. (1990) "*Spatial and temporal continuity of kangaroo rat populations shown by sequencing mitochondrial DNA from museum specimens*". J. Mol. Evol. 31 : 101-112.
- * **Thomas RH**, Schaffner W, Wilson AC, Pääbo S. (1989). "*DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf*". Nature 340: 465-467.
- * **Thomas MG**, Hesse SA, Al-Mahdawi S, Bui TD, Moniz CF, Farzaneh F. (1994). "*A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA*". Biotechniques, Vol. 16, No. 2: 232-234.
- * **Thuesen I**, Engberg J, (1990). "*Recovery and analysis of human genetic material from mummified tissue and bone*". J. Archeol. Sci. 17: 679.
- * **Tully G**, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE, Gill P. (1996). "*Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing*". Genomics 34: 107-113.
- * **Tuross N**, (1994). "*The biochemistry of ancient DNA in bone*". Experientia 50: 530-535.
- * **Ubaldi M**, Sassaroli S, Rollo F, (1996). "*Ribosomal DNA analysis of culturable Deuteromycetes from Iceman's Hay: comparison of living and Mummified fungi*". Ancient Biomolecules, vol. 1 (1), pp.: 35-42.
- * **Urquhart A**, Kimptom CP, Downes TJ, Gill P, (1994). "*Variation in Short Tandem Repeat sequences- a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers*". Int. J. Leg. Med. 107: 13-20.
- * **Van Houten B**, (1990). "*Nucleotide excision repair in Escherichia coli*". Microbiol. Rev. 54 (1): 18-51.

* **Veltri KL**, Espiritu M, Singh G, (1990). "*Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs*". J. Cell Physiol. 143 (1): 160-164.

* **Vigilant L**, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC, (1989). "*Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a Southern African population*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 9350.

* **Vila C**. Y cols. (2001). "*Widespread origins of domestic horse lineages*". Science 291, 474-477.

* **Vincent S**, Vian JM, Carlotti MP, (2000). "*Partial sequencing of the Cytochrome Oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation*". J. Forensic Sci. 45 (4): 820-823.

* **Walker GC**, (1985). "*Inducible DNA repair systems*". Annu. Rev. Biochem. 54: 425-457.

* **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.

* **Wang B**, Jorns MS, (1989). "*Reconstitution of Escherichia coli DNA photolyase with various folate derivatives*". Biochemistry 28 (3): 1148-1152.

* **Waye JS**, Presley LA, Budowle B, Shutler GG, Fournay RM. (1989). "*A simple and sensitive method for quantifying human genomic DNA in forensic specimen extracts*". BioTechniques, Vol. 7: 852-855.

* **Weber JL**, May PE, (1989). "*Abundant class of human DNA polymorphism wick can be typed using the polymerase chain reaction*". Am. J. Hum. Gent., 44: 388-396.

* **Weinfeld M**, Liuzzi M, Paterson MC, (1990). "*Response of phage T4 polynucleotide kinase toward dinucleotides containing apurinic sites: design of a 32P-postlabeling assay for apurinic sites in DNA*". Biochemistry 29 (7): 1737-1743.

* **White HW y Kusakawa N**, (1997). "*Agarose-based system for separation of short tandem repeat loci*". Biotechniques 22 (5): 976-980.

* **White P**, Tatum O, Deaven L, Longmire J. (1999). "*New, male-specific microsatellite markers from the human Y chromosome*". Genomics 57 (3): 422-437.

* **Wiegand** y cols., "*DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis*". Int. J. Leg. Med., 104 (1992) 359-360.

- * **Wiegand P**, Budowle B, Rand S, Brinkman B, (1993). "*Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11*". Int. J. Leg. Med 105: 315-320.
- * **Wiegand P**, Kleiber M (1997). "*DNA typing of epithelial cells after strangulation*". Int. J. Legal Medicine 110: 181-183.
- * **Williams PE**, Marino MA, Del Rio SA, Turni LA, Devaney JM (1994). "*Analysis of DNA restriction fragments and polymerase chain reaction products by capillary electrophoresis*". J. Chromatogr. A 680: 525-540.
- * **Wilson AC**, Carlson SS, White TJ,. (1977) "*Biochemical evolution*". Annu. Rev. Biochem. (ARB) 46 : 573-639.
- * **Wilson MR**, Stoneking M, Holland MM, DiZinno JA (1993). "*Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science*". Criem Lab. Digest 20: 68-77.
- * **Wilson MR**, Polanskey D, Butler J, DiZinnio JA, Replogle J, Budowle B (1995a). "*Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts*". BioTechniques 18: 662-669.
- * **Wilson MR** y cols. (1995b). "*Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis*". Int. J. Leg. Med. 108: 68-74.
- * **Whitaker JP**, Cotton EA, Gill P. (2001). "*A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR® SGM Plus multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis*". Forensic Sci. Int. 123 (2-3): 215-23.
- * **Wong Z**, Wilson V, Patel I, Povey S, Jeffreys AJ, (1987). "*Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA*". Ann. Hum. Genet. 51: 269-288.
- * **Woolley AT**, Hadley D, Landre P, deMello AJ, Mathies RA, Northrup MA. (1996). "*Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device*". Anal. Chem. 68: 4081-4086.
- * **Yakes MF**, Van Houten B, (1997). "*Mitochondrial DNA damage is more extensive and persist longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 514-519.
- * **Yamamoto K**. (1996). "*Molecular biological studies on teeth, and inquests*". Forensic Science Int. 80, pp : 79-87.
- * **Yang F**, Brune JL, Naylo SL, Cupples KL, Naberhaus KH, Bowman BH (1985) "*Human Group-specific component (GC) is a member of the albumin family*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 82, pp: 7994-7998.

* **Yedidag EN**, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M, (1996). "*Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus*". *Transplantation* 62: 238-242.

* **Zhou J**, Bruns MA, Tiedje JM, (1996). "*DNA recovery from soils of diverse composition*". *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316-322.