



I. INTRODUCCIÓN

1.- ADN Y CIENCIAS FORENSES

Desde hace casi un siglo, para estudiar las variaciones entre individuos se utilizan los llamados Polimorfismos Genéticos o Marcadores Genético-Moleculares. Son caracteres estables que se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie.

En general, las características que debe poseer un buen marcador genético desde el punto de vista forense, son las siguientes:

- Patrón de herencia bien establecido.
- Elevado polimorfismo.
- Alto grado de heterocigosidad.
- Detección fiable de los alelos.
- Datos poblacionales de frecuencias alélicas, fenotípicas y/o genotípicas establecidas.
- Herencia independiente de los otros marcadores usados.
- Tasa de mutación baja.
- Analizable mediante un método simple, rápido y reproducible.
- Precisar poco material para el análisis.

Hace pocos años los análisis forenses estaban basados fundamentalmente en el estudio de marcadores genéticos convencionales (antígenos eritrocitarios y leucocitarios, proteínas séricas y enzimas eritrocitarias). En la década de los 80 se consigue un avance espectacular en el campo de la genética forense a raíz del descubrimiento de las regiones hipervariables del ADN (Jeffreys 1985a). A partir de este momento, la utilidad de los polimorfismos clásicos va disminuyendo conforme se generaliza el estudio de estos nuevos marcadores, mucho más informativos, debido principalmente a la gran variabilidad y estabilidad química del ADN, así como a la alta sensibilidad de las técnicas que lo analizan.

Los polimorfismos de ADN hipervariables poseen tal capacidad identificadora que son considerados, hoy en día, un instrumento de elección en la resolución pericial de casos en Genética Forense. Antes de adentrarnos en el estudio de estos polimorfismos, vamos a referirnos a algunos aspectos básicos del ADN.

1.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL ADN

El ADN es la molécula que contiene toda la información genética del individuo. El conjunto de esta información presente en las células se denomina genoma y, según su localización, podemos identificar un genoma complejo nuclear y un genoma mitocondrial simple.

El genoma humano haploide está constituido aproximadamente por 3.3×10^9 pb. En el genoma existen 2 tipos de ADN, según la función biológica que desempeñen:

-ADN expresivo (30%). Este tipo de ADN, también llamado codificante, tiene una función conocida, como por ejemplo la expresión de un gen cuyo producto final es una proteína. Soporta gran presión selectiva, lo que se traduce en una variabilidad de regiones limitada.

-ADN no codificante (70%). Comprende secuencias de ADN transcripcionalmente inactivas de funciones diversas (como por ejemplo, promotores de genes) y, en otros muchos casos, de función desconocida o sin función aparente. Este tipo de ADN, por ser altamente polimórfico, tiene un gran interés de cara a la identificación de individuos. Lo podemos clasificar en :

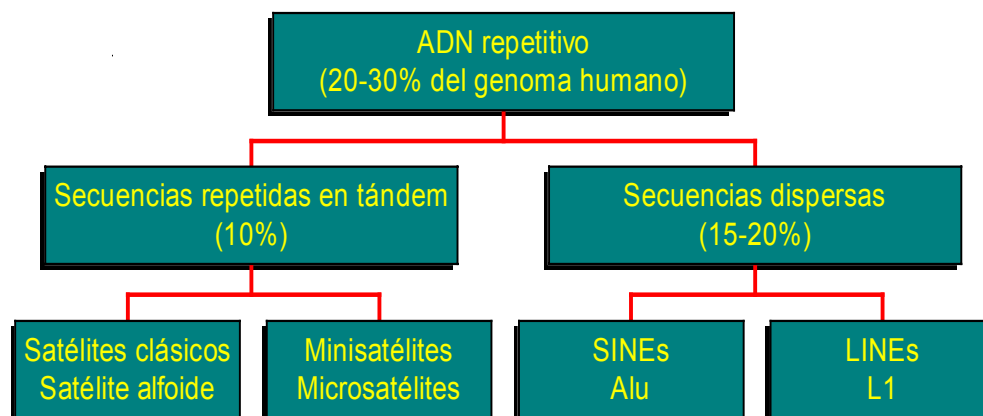
• **ADN de copia única.** Está compuesto por secuencias que se encuentran representadas una o muy pocas veces en el genoma. Se cree que puede actuar como espaciador entre regiones codificantes de ADN.

•**ADN de copia múltiple.** Las secuencias de este tipo de ADN, también denominado ADN Repetitivo, pueden ser altamente repetitivas, moderadamente o poco repetitivas. Podemos clasificarlas en base a sus dos características más importantes: su disposición a lo largo del genoma y el tamaño de la unidad de repetición (Tabla 1). Se pueden reconocer dos grupos principales:

ADN Repetido en Tándem (10% del genoma). Se compone de bloques de secuencias repetitivas agrupadas en tándem. Según el tamaño de la unidad de repetición se subdivide en 3 tipos: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite.

ADN Repetitivo Disperso (15-20% del genoma). Las unidades de repetición no se agrupan, sino que aparecen dispersas a lo largo del genoma. Esta representado por 2 familias: SINEs y LINEs.

Tabla 1. Clasificación de las secuencias de ADN repetitivo en el genoma humano (modificado de Fowler *et al* 1988)



1.1.1.- ADN REPETIDO EN TÁNDEM

Los distintos componentes de este tipo de ADN repetitivo adoptan un patrón de distribución cromosómica diferente: el ADN satélite se sitúa en la región centromérica, el ADN minisatélite en los telómeros o en sus proximidades, y el ADN microsatélite aparece disperso por todo el cromosoma.

Según Vogt (1990), las secuencias de ADN repetido en tándem se distribuyen por el genoma de dos maneras:

-Tipo I. Grandes bloques formados por repeticiones de distintas unidades de longitud variable. Se corresponde con los satélites clásicos I-IV y el satélite alfoide.

-Tipo II. Pequeños bloques distribuidos a lo largo de todo el genoma, con un número variable de unidades de repetición de secuencia similar. Pertenecen a este tipo los minisatélites y los microsatélites.

•**ADN Satélite.** Las secuencias repetitivas se disponen en grandes bloques de diversas unidades de complejidad variable, con una longitud desde 100 Kb a varias Mb. Este tipo de ADN no se transcribe y al organizarse de un modo tan complejo es difícil su aplicación al campo forense.

Para separar el ADN Satélite del resto del ADN genómico se somete a centrifugación en gradiente de densidad de Plata-Sulfato de Cesio, obteniéndose 2 bandas. La de menor densidad corresponde al ADN Satélite.

Se distinguen 4 tipos (I, II, III, IV) en función de su densidad, que está en relación con el mayor o menor contenido en GC (Singer 1982a). Representan en conjunto del 2 al 6% del genoma y tienen una secuencia consenso (unidad básica de repetición) de 5 a 170 pb (Prosser *et al* 1986, Frommer *et al* 1982, Hollis y Hindley 1988, Waye y Willard 1987). Algunos satélites poseen una unidad de repetición de pequeño

tamaño, como los satélites II y III, que consisten en la repetición en tándem de la secuencia ATTCC.

Existen otros tipos de ADN satélite que no pueden distinguirse por centrifugación en gradiente de densidad, debido a que su densidad es semejante a la de los satélites II y III. Se consiguieron caracterizar por digestión de ADN genómico mediante endonucleasas de restricción. El satélite alfoide pertenece a esta categoría, habiéndose comprobado que es el único satélite que está presente en todos los cromosomas, constituyendo la mayor parte de la heterocromatina del centrómero. Su secuencia consenso contiene aproximadamente 171 pb, con variaciones individuales (Choo *et al* 1991).

•**ADN Minisatélite.** El término minisatélite se debe a Jeffreys, quien lo usó para designar loci de ADN repetitivo de un tamaño menor que el de los satélites clásicos (Jeffreys *et al* 1985a). Los bloques de secuencias de este ADN poseen un tamaño aproximado entre 0.1 y 40 Kb y la unidad de repetición es de 10-100 pb. Tienen un alto grado de variabilidad, tanto en el número de repeticiones en tándem como en la secuencia de la unidad de repetición, por lo que ante tamaños idénticos podemos estar frente a alelos diferentes.

Nakamura *et al* (1987) denominaron a estos loci VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) aludiendo a la variación en el número de unidades de repetición. Tomado en sentido estricto, este término podría aplicarse a cualquier tipo de ADN repetitivo y no exclusivamente al minisatélite, y además, al hacer referencia sólo al número de repeticiones, los minisatélites monomórficos en poblaciones humanas no podrían incluirse (Armour *et al* 1990).

En el genoma humano los minisatélites no se distribuyen al azar. Se localizan preferentemente en las regiones subterminales de los cromosomas (Armour *et al* 1989) que son las implicadas en los fenómenos de recombinación, sobre todo en línea germinal masculina.

•**ADN Microsatélite.** Los microsatélites fueron llamados así por su pequeño tamaño, hasta unos 400 pb, lo que los hace especialmente idóneos para técnicas de PCR. También se conocen como STRs (*Short Tandem Repeats*) pues la unidad de repetición oscila entre 2 y 7 pb (Edwards *et al* 1991). Se encuentran ampliamente repartidos por todo el genoma (Litt y Luty 1989, Weber y May 1989).

Basándose en la longitud de la unidad de repetición y el número de veces que ésta se repite, junto con las posibles variaciones en su secuencia, Urquhart *et al* (1994) los clasifica en STRs simples, compuestos y complejos. Posteriormente, Brinkmann (1996) propone una clasificación alternativa: STRs con baja microvariabilidad, intermedia y alta microvariabilidad.

1.1.2.- ADN REPETITIVO DISPERSO

Está representado por dos familias que se diferencian en el número de nucleótidos que constituyen la unidad de repetición (Singer 1982a). Algunos componentes de estas familias pueden ser considerados como transposones (elementos genéticos móviles), que son fragmentos inestables de DNA con capacidad migratoria (Koremborg y Rykowski 1988).

-**SINEs** (*Short Interspersed Nuclear Elements*). Representan alrededor del 10 % del genoma. Los constituyen repeticiones menores de 500 pb. La familia más representativa y mejor estudiada es la *Alu*, así llamada por presentar un lugar de reconocimiento para el enzima de restricción *Alu* I (Slagel *et al* 1987).

Las secuencias *Alu* son las más abundantes en el genoma humano y tienen una secuencia muy conservada de unos 300 pb relativamente rica en GC. Se localizan en las regiones eucromatínicas, preferentemente en las llamadas “bandas R” o bandas reversas (de replicación precoz), que son las regiones cromosómicas más activas a nivel transcripcional.

Existen otras familias, como la NTS (*Non Transcribed Spacer*) que se localiza en primer lugar en la región homónima del ADN ribosómico (Singer 1982b).

-**LINEs** (*Long Interspersed Nuclear Elements*). Suponen del 2 al 5% del genoma. Están constituidos por secuencias repetitivas mayores de 500 pb. El *LINE-1* o familia *LI*, llamada también *Kpn*, es el LINE más abundante en humanos, presentando un número elevado de repeticiones. Los elementos *LI* se localizan principalmente en la eucromatina, al igual que la familia *Alu*, pero en este caso a nivel de las “bandas G” (de replicación tardía) obtenidas al teñir los cromosomas con Giemsa.

1.2.- POLIMORFISMOS DEL ADN

El término polimorfismo fue empleado por Ford (1940) para designar “la aparición conjunta en un lugar de dos o más formas discontinuas de una especie, de tal manera que la más rara de ellas no se puede mantener simplemente a través de la mutación periódica”. En la práctica, para que un locus sea considerado polimórfico, el alelo más común para ese locus debe tener una frecuencia poblacional menor del 99% y, de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, al menos un 2% de la población debe ser heterocigota para ese locus.

En el ADN codificante existe poca variabilidad individual, exceptuando la región HLA. El margen de variación permitido es muy bajo y los polimorfismos suelen acompañarse de modificaciones fenotípicas. Por ejemplo, si se producen diferentes formas de una proteína se puede condicionar su función o actividad, bien intrínsecamente, bien por influencia ambiental. El ADN no codificante, por el contrario, al no estar sujeto a presión selectiva intensa, puede soportar generalmente grandes niveles de variabilidad sin que se produzca repercusión fenotípica. Esta característica ha convertido a este tipo de ADN en la mayor fuente de investigación de polimorfismos en Genética Forense.

Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición. Pueden dividirse en 2 tipos:

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

-Polimorfismos de Longitud. Se producen por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos. Este tipo es el más abundante en ADN repetitivo, sobre todo en el ADN mini y microsatélite.

Los loci minisatélites y microsatélites están formados, como ya hemos visto, por repeticiones en tándem de secuencias similares que varían en longitud, pudiéndose acompañar simultáneamente de polimorfismos de secuencia. La causa de la variación se supone distinta en ambos casos. Para minisatélites se achaca a un mecanismo de conversión génica, frecuentemente inducida por regiones de flaqueo. En el caso de los microsatélites, según Armour (1996), la causa principal parece debida a un deslizamiento de unidades de repetición durante la replicación (*replication slippage*), aunque Jeffreys *et al* (1997) postulan que también la conversión génica, muchas veces inducida por regiones de flaqueo, puede ser un mecanismo preferente de variabilidad.

1.2.1.- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ESTOS POLIMORFISMOS EN GENÉTICA FORENSE

Desde hace poco más de una década, la tecnología del ADN ha permitido el estudio de la variabilidad humana mediante el análisis directo del propio material genético y no a través del análisis de las proteínas codificadas por éste.

Wyman y White (1980) dieron el primer paso en la identificación genética por medio del ADN al descubrir un locus polimórfico caracterizado por un número de fragmentos de restricción de longitud variable, aunque el verdadero auge de los polimorfismos de ADN se inicia con Jeffreys y colaboradores, sus introductores en el campo forense.

Los primeros en utilizarse con este fin fueron los denominados RFLPs “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (Jeffreys *et al* 1985a,b), polimorfismos en ADN minisatélite basados en la longitud de los fragmentos de restricción. Se identificaron mediante la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción y posterior hibridación con sondas (Botstein *et al* 1980). Un problema legal de inmigración en el Reino Unido (Jeffreys *et al* 1985c) fue el primer caso resuelto satisfactoriamente con ayuda de estos polimorfismos.

En un primer momento se utilizaron las denominadas sondas multilocus (MLPs, *Multilocus Probes*), que detectan múltiples loci minisatélites bajo condiciones poco rigurosas de hibridación, dando lugar a un complejo patrón de bandas. Este patrón de bandas múltiples corresponde a distintos loci con secuencias relacionadas entre sí. Jeffreys y su equipo consideraron que estos patrones serían prácticamente específicos para cada individuo y los denominaron “huellas genéticas” (*DNA fingerprints*).

Poco tiempo después se comienzan a utilizar sondas que permiten detectar un único locus (Wong *et al* 1987, Nakamura *et al* 1987b), las denominadas sondas unilocus (SLPs, *Single Locus Probes*) que proporcionan una o dos bandas según el carácter homocigoto o heterocigoto del individuo para ese locus. De esta manera se obtiene un perfil unilocus de ADN (*DNA profiling*).

Hoy en día sólo las sondas unilocus debidamente caracterizadas (Brinkmann *et al* 1992) están reconocidas para usos forenses. Han supuesto una evidente mejora metodológica en la investigación biológica de la paternidad, pero existen importantes limitaciones para su uso en criminalística. Un método alternativo, y en determinados casos mucho más recomendable que el empleo de sondas, lo constituye la Reacción

en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Mullis et Faloona 1987, Saiki *et al* 1988), como veremos más adelante.

En los últimos años estamos asistiendo a un despliegue de nuevas tecnologías, especialmente encaminadas al análisis de STRs, como por ejemplo:

-*LightCycler*®. Esta tecnología permite llevar a cabo, en una misma reacción, la amplificación por PCR de un fragmento de ADN y la detección por fluorescencia, en tiempo real, de la hibridación con dos sondas independientes. Es de una gran especificidad y posibilita la cuantificación exacta de producto amplificado y la detección de posibles mutaciones.

-*Chips* o *Arrays* de ADN. Son sistemas en miniatura que incorporan de cientos a cientos de miles de sondas alelo-específicas (ASO, *Allele Specific Oligonucleotides*). Si el fragmento de ADN diana, marcado mediante la incorporación de un grupo fluorescente durante la PCR, hibrida con la sonda complementaria, se detecta una señal de fluorescencia que es recogida a través de sistemas automatizados. Esta prometedora tecnología puede tener interesantes aplicaciones, fundamentalmente clínicas y forenses.

-*Espectrofotometría de masas*. Permite el análisis de una muestra en cuestión de segundos, sin necesidad de emplear escaleras alélicas, pero de momento sólo es utilizable para fragmentos de ADN menores de 100 pb. Los productos a analizar se cristalizan conjuntamente con una pequeña matriz orgánica, se volatilizan y se someten a un campo eléctrico en fase gaseosa. Se determina el peso molecular del ADN en función del tiempo empleado en el recorrido hasta llegar a un detector, ya que el tiempo es proporcional a la masa del fragmento de ADN.

2.- ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE ADN POR PCR

La principal limitación que presenta el empleo de sondas es que el análisis debe realizarse con ADN íntegro y en cantidad suficiente. Otros problemas añadidos son la laboriosidad del método, el tiempo de análisis (no menor de dos días) y la difícil estandarización de esta técnica.

La introducción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) vino a solucionar en gran medida muchas de estas dificultades. Esta técnica ha supuesto un avance metodológico de enorme repercusión en genética forense, ya que nos permite trabajar con cantidades ínfimas de ADN aún estando degradado. Otras ventajas adicionales de la PCR son la rapidez, sencillez, facilidad de interpretación y menor coste de la determinación, además de proporcionar una buena sensibilidad y especificidad.

El poder de exclusión individual de los marcadores analizados por PCR es menor que el de los marcadores detectados por sondas unilocus. Este dato deberá tenerse muy en cuenta aquellos casos en los que esta última determinación pueda ser factible.

2.1.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR es una técnica de amplificación “in vitro” de pequeñas secuencias de ADN que permite sintetizar millones de copias idénticas a partir de una cadena única. Se basa en la facilidad que posee el ADN para desnaturalizarse y renaturalizarse.

Para iniciar la síntesis de ADN se utilizan dos cebadores o *primers* específicos (secuencias de aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud complementarias a

los extremos 5' del fragmento que se desea amplificar) en combinación con una ADN polimerasa termoestable que incorpora dNTPs.

La reacción se lleva a cabo en un termociclador que realiza ciclos automáticos de tres temperaturas (93-95°C para desnaturalizar el ADN, 50-65°C para que tenga lugar el acoplamiento de los *primers* y 72°C para que la polimerasa copie la nueva cadena de ADN), consiguiendo de este modo que el número de copias de la secuencia de ADN que nos interesa aumente exponencialmente.

Experimentalmente, alrededor de 30 ciclos proporcionan una cantidad de ADN más que suficiente para un análisis directo del segmento amplificado sin necesidad de utilizar sondas.

2.2.- APLICACIONES DEL ANÁLISIS-PCR EN GENÉTICA FORENSE

Mientras que en principio varias categorías de polimorfismos de ADN podrían utilizarse con fines de identificación, la mayor parte de los marcadores usados en Genética Forense pertenecen a la categoría del ADN altamente repetitivo.

La amplia lista de polimorfismos amplificables por PCR (Tabla 2) continúa incrementándose a medida que se estudian nuevos loci, se contrastan experiencias y los diferentes grupos de investigación llegan a acuerdos para su validación.

2.2.1.- POLIMORFISMOS DE ADN CODIFICANTE

Aunque muy pocos marcadores de secuencia única son buenos candidatos para usos forenses (Ugozzoli *et al* 1992; Higuchi *et al* 1988), el primer sistema amplificado por PCR con este fin fue un polimorfismo de la región HLA, el locus HLA DQA1 (Saiki *et al* 1986; Erlich *et al* 1986; Higuchi *et al* 1988). Este polimorfismo de secuencia se detecta por *dot-blot* reverso del producto de PCR con

un panel de sondas ASO, inmovilizadas sobre una membrana de nailon (Erlich y Bugawan 1989), que reconocen cada alelo del sistema.

También se han propuesto otros métodos alternativos, más baratos y eficaces, mediante la detección de fragmentos amplificados en geles de poliacrilamida por análisis de heterodúplex y SSCP (*Single Strand Conformational Polimorphism*) (Barros *et al* 1991, 1992, 1994).

2.2.2.- POLIMORFISMOS DE ADN REPETIDO EN TÁNDEM

De todos los polimorfismos analizables por PCR, los de mayor interés médico-legal pertenecen a los tipos minisatélite y, sobre todo, microsatélite. Ambos son particularmente adecuados por ser altamente polimórficos y presentar un alto grado de heterocigosidad. Puesto que estos polimorfismos se deben a diferencias en el número de copias de las unidades repetitivas que presentan los distintos alelos, pueden detectarse tras la PCR mediante electroforesis, generalmente en geles de agarosa o poliacrilamida, como polimorfismos de longitud.

Estos polimorfismos pueden ser separados en clases discretas de alelos y clasificados por el número de repeticiones, lo que no es posible con el empleo de sondas. De este modo se facilita enormemente la estima de frecuencias (Alford *et al* 1994, Schmitt *et al* 1994), constituyendo una ventaja desde el punto de vista estadístico.

Cuando se trata de analizar la secuencia de algunos minisatélites se observa que raramente las unidades de repetición son todas iguales (Wong *et al* 1987). Este polimorfismo de secuencia puede determinarse junto con el polimorfismo de longitud por medio de una técnica denominada MVR (*Minisatellite Variant Repeat*).

- **AMPFLPs.** Los loci minisatélites que pueden ser amplificados por PCR se denominaron AMPFLPs (*AMPlified Fragment Length Polymorphisms*) (Jeffreys *et*

al 1988). Generalmente tienen unidades de repetición largas en múltiples copias y fragmentos alélicos de alto peso molecular. A pesar de los buenos resultados que se obtienen con esta técnica, que conjuga la alta variabilidad de los VNTRs con la sensibilidad y especificidad de la técnica PCR, no debemos olvidar que los productos de amplificación son de un tamaño relativamente grande, lo que puede constituir un factor limitante cuando las muestras se encuentran degradadas.

Los AMPFLPs fueron introducidos en el campo forense por Kasai *et al* (1990) y Budowle *et al* (1991). Los más utilizados son los loci D1S80 (pMCT118) (Kasai *et al* 1990, Budowle *et al* 1990), D17S5 (YNZ22) (Wolff *et al* 1988, Horn *et al* 1989), COL2A1 (Wu *et al* 1990, Rand *et al* 1992), 3'ApoB (Boerwinkle *et al* 1989). De ellos, el más empleado es el sistema el D1S80 (unidad de repetición de 16 pb y 29 alelos), que tiene a su favor una elevada heterocigosidad pero el inconveniente de que en muestras muy deterioradas se puede potenciar la amplificación de los alelos de menor tamaño. Esto nos conduciría al error de tipar como homocigota una muestra en la que no se amplificó el alelo de mayor tamaño.

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

En la actualidad este polimorfismo puede determinarse mediante PCR (MVR-PCR), técnica de gran sensibilidad y que posee una elevada capacidad de discriminación, cuyas bases metodológicas fueron descritas por Jeffreys *et al* (1991) y Tamaki *et al* (1992). La introducción de sistemas electroforéticos semiautomáticos y secuenciadores automáticos (Rodríguez-Calvo *et al* 1996) ha supuesto un gran avance en la automatización del análisis MVR-PCR, facilitando su aplicación práctica. Hay que destacar que el análisis no está sujeto a errores de medición en la migración de los fragmentos ni a fenómenos de distorsión de los geles.

Entre los diferentes loci que pueden ser abordados por MVR-PCR, interesantes desde el punto de vista médico-legal, citaremos el MS32 (locus D1S8) (Wong *et al* 1987), MS31A (locus D7S21) (Royle *et al* 1988), YNH24 (locus D2S24) (Holmlund *et al* 1998) y MSY1 (locus DYF155S1), el primer minisatélite descrito específico del cromosoma Y (Jobling *et al* 1994a).

La MVR-PCR es una técnica relativamente sensible con pequeñas cantidades de ADN e incluso se puede aplicar a muestras parcialmente degradadas, pero no se aconseja su uso para análisis de mezclas de muestras ni en casos forenses de paternidad.

- **MICROSATÉLITES.** Descritos inicialmente por Weber y May (1989) son secuencias pequeñas de ADN repetidas en tándem (STRs), constituidas por unidades de 2 a 7 pb que se repiten un número variable de veces y que dan lugar a alelos de tamaño aproximado entre 80 y 400 pb. Su gran utilidad se puso rápidamente de manifiesto debido a su abundancia (Beckman y Weber 1992), distribución bastante regular por el genoma (Stallings *et al* 1990), naturaleza polimórfica (Weber y May 1989, Litt y Luty 1989) y su pequeño tamaño, que los hace idóneos para ser amplificados por PCR. Fueron introducidos en el campo forense a principios de la década de los noventa por Edwards *et al* (1991), Polymeropoulos *et al* (1992a,b) y Tautz (1993), entre otros investigadores.

El polimorfismo de los microsatélites se debe a la variación en el tamaño de los alelos, como propusieron Fowler *et al* (1988) y confirmaron posteriormente Edwards *et al* (1991) y otros autores, pero también pueden presentar variaciones en la secuencia de la unidad de repetición. Urquhart *et al* (1994) clasificaron los STRs en simples, compuestos y complejos. Brinkmann *et al* (1996) proponen denominarlos STRs con microvariabilidad baja, intermedia y alta.

•**STRs simples o de baja microvariación.** Están formados por dos o más unidades de repetición contiguas e idénticas, tanto en longitud como en secuencia. La diferencia en tamaño entre los distintos alelos es de una unidad de repetición. La

presencia de alelos intermedios es excepcional. Son de fácil tipaje, pero tienen el inconveniente de su baja heterocigosidad.

Entre los STRs simples más usados están HUMTHO1 (Edwards *et al* 1991), HUMF13A1 (Polymeropoulos *et al* 1991a), HUMFES/FPS (Polymeropoulos 1991b), que contienen una unidad de repetición tetranucleotídica y HUMCD4, cuya unidad es pentanucleotídica y que presenta importantes diferencias poblacionales (Brinkmann *et al* 1995).

•**STRs compuestos o de microvariación intermedia.** Los sistemas comprenden dos o más unidades de repetición contiguas diferentes, que varían tanto en secuencia como en longitud. El de mayor interés forense es HUMVWA31/A (Kimpton *et al* 1992).

•**STRs Complejos o de alta microvariación.** Pueden contener varios bloques de unidades de repetición de longitud variable, con secuencias intermedias más o menos variables. Son frecuentes los alelos intermedios y las sustituciones simples de bases en algunas unidades, lo que ocasiona importantes variaciones tanto estructurales como en tamaño, produciéndose problemas de designación de alelos. Son los STRs más difíciles de tipar y se acompañan también de una tasa de mutación más alta. Se están utilizando con buenos resultados sistemas muy polimórficos como HUMACTBP2 (SE33) (Moos y Gallwitz 1983), HUMD21S11 (Sharma y Litt 1992) y HUMFIBRA/FGA (Mills *et al* 1992), que presentan una alta tasa de heterocigosidad.

Actualmente parece que se están acumulando evidencias a favor de que incluso los microsatélites más simples presentan algún grado de variabilidad interna en su estructura, por lo que la clasificación anterior sería cuestionable. Existen STRs relativamente simples y extremadamente variables al mismo tiempo, como D12S391 y D1S1656 (Lareu *et al* 1996, 1997), en los que la asociación directa entre variabilidad y complejidad no es sostenible.

Las grandes ventajas de los STRs son su estabilidad y la posibilidad de realizar PCR *multiplex*, amplificando varios loci simultáneamente (Kimpton *et al* 1993). Además su análisis se ha facilitado con el uso de fluorocromos y secuenciadores automáticos de ADN (Ziegle *et al* 1992). Sus aplicaciones son muy diversas, como construcción de mapas genéticos, estudios poblacionales, análisis de ligamiento en enfermedades genéticas, investigación del cáncer, estudios forenses, etc.

Los más abundantes y fáciles de amplificar son los que contienen 2 pb como unidad de repetición (Weber y May 1989) pero ciertos problemas técnicos, como la presencia de bandas “tartamudas” por *slippage* de la polimerasa durante la amplificación, hacen que se utilicen principalmente STRs con repeticiones de 4 pb, más apropiados para fines forenses.

Cuando se parte de ADN altamente degradado (Hagelberg *et al* 1991, Gill *et al* 1992a, Jeffreys *et al* 1992), el tipaje de SLPs e incluso AMPFLPs suele ser negativo, mientras que la amplificación de STRs proporciona generalmente resultados satisfactorios.

En los laboratorios forenses la tendencia actual viene marcada por la utilización de STRs simples e hipervariables (Lareu *et al* 1996, 1997), grandes *multiplexes* (Gill *et al* 1995) y *multiplexes* de STRs de pequeño tamaño, ya que la degradación del ADN es inversamente proporcional al tamaño de los fragmentos (Alvarez *et al* 1996).

2.2.3.- OTROS POLIMORFISMOS DE ADN

En el ADN mitocondrial (ADN_{mt}), la zona más variable se conoce como D-Loop y se han analizado dos regiones de gran interés en Genética de poblaciones (HV1 y HV2). La dotación mitocondrial es haploide y se hereda exclusivamente por vía materna, lo que facilita el análisis de divergencias de secuencias, aunque esta misma propiedad hace que este ADN no sea útil para el estudio biológico de la paternidad.

El ADN mt , mucho más abundante que el genómico, es ideal para el análisis de cabellos y pelos sin bulbo, muestras muy envejecidas como restos óseos de gran antigüedad y, en general, vestigios en los que no sea posible analizar ADN nuclear. La amplificación por PCR de regiones hipervariables del D-Loop y la posterior determinación de esta variabilidad por secuenciación es el método más empleado para la resolución de estos casos (Sullivan *et al* 1994, Gill *et al* 1994a).

El cromosoma Y, de herencia exclusivamente paterna, está suscitando un renovado interés tanto antropológico como médico-legal. Los desalentadores estudios iniciales (Casanova *et al* 1985, Lucotte y Ngo 1985, Jakubizka *et al* 1989, Malaspina 1990) no fueron óbice para que, merced a los avances tecnológicos, el estudio de nuevos polimorfismos de cromosoma Y se encuentre en una fase muy prometedora.

Actualmente se analizan fundamentalmente haplotipos de STRs, secuencia alfoide por análisis de heteroduplex, el minisatélite MSY1 por MVR-PCR, mutaciones puntuales y algunas duplicaciones, inserciones y deleciones.

Los polimorfismos de cromosoma Y, por ser el objeto de esta tesis, se comentarán con detalle más adelante.

2.3.- ESTANDARIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS

Para que cualquier polimorfismo pueda ser utilizado en la práctica forense, es preciso conocer unos valores que expresen la frecuencia de aparición de esta variación en la población, es decir, conocer la frecuencia alélica y genotípica en la población implicada y comprobar que está en equilibrio Hardy-Weinberg en la población donde va a ser usado.

Las regiones hipervariables del ADN presentan un gran polimorfismo y un número elevado y no determinado de alelos, lo que unido a variaciones en los procedimientos técnicos empleados podría conllevar dificultades a la hora de interpretar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. Ya que es esencial la comparación de resultados en la práctica forense, es imprescindible que existan unas directrices aceptadas por todos, con lo que se facilitaría la creación de bases de datos comunes y la realización de contrapericias.

Para supervisar este espinoso tema, se constituyeron diversos grupos de trabajo, tanto nacionales como internacionales, con el cometido de estandarizar las técnicas de análisis y su interpretación y garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos mediante estrictos controles de calidad.

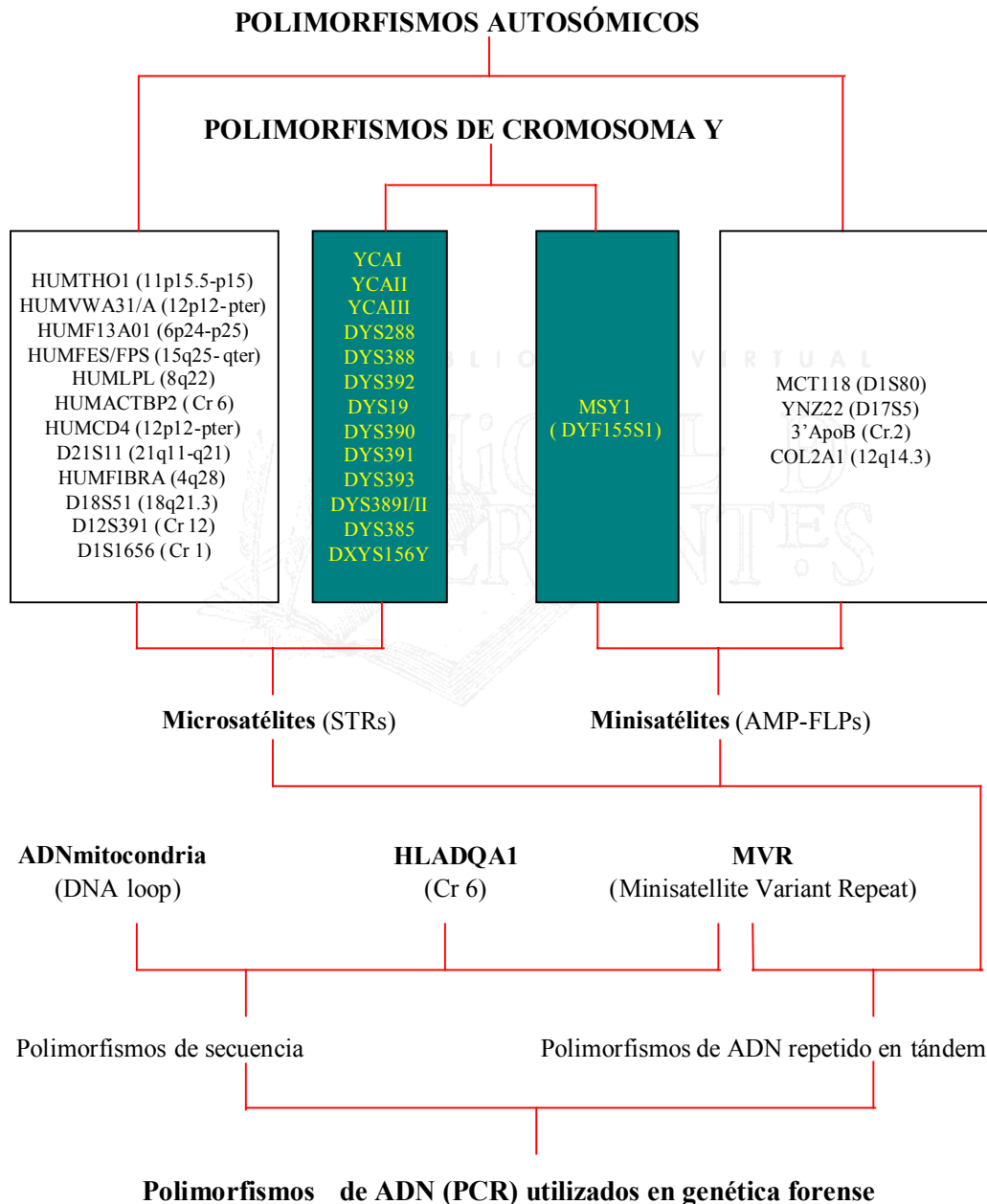
En Europa, en 1989, varios laboratorios de distintos países constituyen el grupo *European DNA Profiling group* (EDNAP) del que forma parte el Instituto de Medicina Legal de Santiago de Compostela. El primer ejercicio de estandarización (Schneider *et al* 1991) consistió en el análisis de una serie de muestras usando el enzima de restricción HinfI y la sonda YNH24, siguiendo cada laboratorio sus propios protocolos, con lo que se evidenció un intervalo de error del 10% en el tamaño de los fragmentos analizados. En el segundo ejercicio (Gill *et al* 1992b) todas las determinaciones se realizaron con un protocolo semejante, con lo que disminuyó enormemente el intervalo de error, demostrándose que la uniformización de protocolos puede permitir la comparación de resultados entre laboratorios. Posteriormente se estandarizaron STRs simples (Gill *et al* 1994b, Kimpton *et al* 1995, Andersen *et al* 1996) y STRs complejos (Gill *et al* 1997).

Otro grupo de estandarización es el grupo norteamericano *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods* (SWGDM) que publica periódicamente sus recomendaciones (TWGDAM 1989, 1990, 1991, 1993, 1994, 1995). En Estados Unidos el uso de ADN con fines forenses ha sido específicamente regulado por el National Research Council (NRC 1992, 1997).

Representantes de la EDNAP y de la SWGDAM constituyen la *DNA Comission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG)*, que también emite recomendaciones, generalmente anuales, sobre el uso de marcadores de ADN con fines forenses, incluyendo nomenclatura, estadística, gestión y control de calidad (ISFG 1989, 1992a,b, 1995, 1997).



Tabla 2. Algunos polimorfismos de ADN amplificables mediante PCR utilizados en Genética Forense



3.- CROMOSOMA Y

Dentro de los interrogantes que se plantean los seres humanos desde lejanas épocas, la curiosidad acerca de sus orígenes ocupó siempre un lugar muy relevante. Tradicionalmente, el pasado ha sido investigado por historiadores, arqueólogos, y paleontólogos, en tanto que hoy en día se tiende a buscar la evidencia indirecta de poblaciones humanas modernas a través de la lingüística y, cada vez en mayor medida, la biología molecular. Desde que ha sido factible el análisis de nuestro material genético con nuevas técnicas, el estudio del cromosoma Y, por sus especiales características, está despertando grandes expectativas al revelarse como una útil fuente de polimorfismos de ADN, especialmente en el ámbito de la evolución humana y las ciencias forenses.

3.1.- INTRODUCIÉNDONOS EN EL CROMOSOMA Y

Tras la fecundación, la mitad del ADN del cigoto procede de la madre y la otra mitad del padre. La mujer cede a su descendencia obligatoriamente un cromosoma X, el varón en cambio puede contribuir con un cromosoma X o Y determinando, por tanto, el sexo de su descendencia. Este cromosoma en los mamíferos es el responsable del desarrollo testicular, indicando la presencia de un gen responsable que codifica el *testis determining factor* (TDF) que hace que las gónadas indiferenciadas se transformen en testículos en una etapa precoz de la embriogénesis.

3.1.1.- SU NATURALEZA

Es uno de los cromosomas más pequeños del genoma humano, con un tamaño aproximado de 60 Mb (Morton 1991). Desde el punto de vista citológico, el cromosoma Y está formado por regiones de heterocromatina y eucromatina.

La región heterocromatínica se sitúa sobre el brazo largo (Yq) en posición distal. Varía considerablemente en tamaño entre individuos. Se compone de secuencias altamente repetitivas, como por ejemplo DYZ1 y DYZ2, presentando polimorfismos de longitud.

La región de eucromatina se localiza en el brazo corto (Yp), centrómero y en la zona proximal del brazo largo. Su tamaño es bastante constante en varones normales (alrededor de 30 Mb). Es la región de mayor interés genético. Aquí se encuentran algunos genes, así como secuencias que muestran homología con el cromosoma X y los autosomas, y también secuencias repetitivas específicas del cromosoma Y (DYZ3, DYZ4, DYZ5).

Aunque el grueso de su volumen se considera genéticamente inerte, en el cromosoma Y se pueden diferenciar tres regiones interesantes desde el punto de vista genético: dos pseudoautosómicas (PAR1 y PAR2) y una específica del cromosoma Y (Figura 1).

3.1.2.- LAS REGIONES PSEUDOAUTOSÓMICAS

A pesar de su distinta naturaleza morfológica, los cromosomas X e Y pueden aparearse durante la meiosis e intercambiar información. Este fenómeno ocurre en ciertas pequeñas regiones que contienen secuencias homólogas presentes en ambos cromosomas, denominadas regiones pseudoautosómicas porque en ellas las secuencias de ADN no muestran una herencia ligada al sexo en sentido estricto. En los cromosomas sexuales humanos hay dos de estas regiones, denominadas PAR1 y PAR2, situadas respectivamente en los extremos terminales del brazo corto y brazo largo de dichos cromosomas.

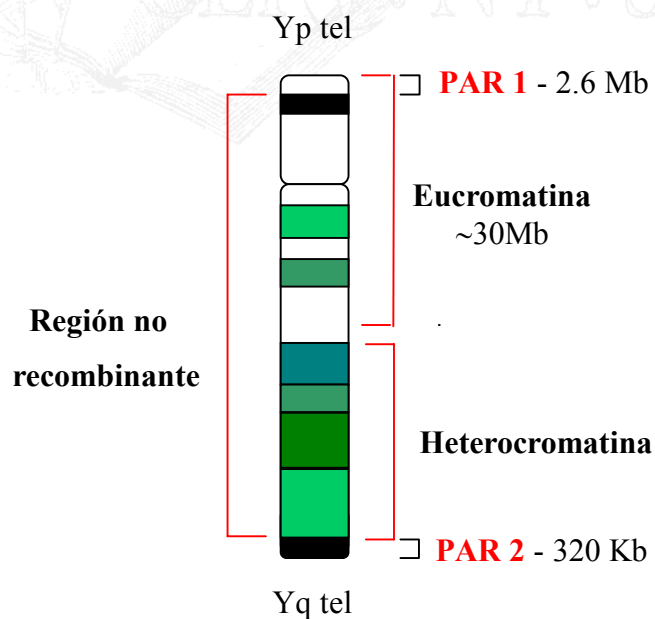
La región pseudoautosómica mayor (PAR1) del cromosoma Y tiene un tamaño de aproximadamente 2,6 Mb. La recombinación a nivel de PAR1 es necesaria para una segregación normal de los cromosomas X e Y en la meiosis (Ellis y Goodfellow

1989a) y por tanto recombina siempre. Pueden existir alteraciones, como en el síndrome de Klinefelter, cuyo cariotipo 47,XXY es producto de la no-disyunción, no produciéndose recombinación a nivel de PAR1 en la gran mayoría de casos (Hassold *et al* 1991).

La región pseudoautosómica menor (PAR2) del cromosoma Y mide sobre 320 Kb y no siempre participa en procesos de recombinación. Además, la actividad de recombinación de PAR2 no puede sustituir a la de PAR1 (Freije *et al* 1992), no siendo, por tanto, ni necesaria ni suficiente para el éxito de la meiosis masculina.

La zona límite de recombinación entre PAR1 y la región específica del cromosoma Y ha sido clonada y secuenciada (Ellis *et al* 1989b) y se conoce como frontera pseudoautosómica.

Figura 1. Idiograma del cromosoma Y. (Modificado de Jobling *et al* 1997)



(PAR1 y PAR2: Regiones pseudoautosómicas)

3.1.2.1.- LOS GENES DE LAS REGIONES PSEUDOAUTOSÓMICAS

Se espera que los genes localizados en estas regiones escapen al mecanismo de inactivación, para asegurar de este modo un reparto equivalente de genes entre los sexos. De los genes que se citan a continuación (Tabla 3), todos tienen homólogo en X.

- El gen **MIC2Y** (PAR1, Yp) ha sido el primer gen pseudoautosómico descrito en el hombre (Goodfellow *et al* 1983). Codifica una proteína estructural del antígeno de superficie celular CD99. Su homólogo en X es **MIC2**.

- El gen **ASMTY** (PAR1, Yp) codifica una enzima que cataliza la última etapa de la síntesis de la hormona melatonina (Yi *et al* 1993). Tiene homólogo en X (**ASMT**).

- El gen **XE7Y** se localiza proximalmente respecto al anterior. Fue aislado en 1992 (Ellison *et al* 1992) y codifica el antígeno XE7, de función desconocida, pero que presenta homología con el CD99. Tiene como homólogo al gen **XE7**.

- **IL3RAY** (PAR1, Yp) es el gen del receptor de la interleucina-3. Se localiza proximal a CSF2RAY (Kremer *et al* 1993). **IL3RA** es su homólogo en X.

- **CSF2RAY** (PAR1, Yp) es el gen más distal de los descritos en PAR1 hasta el momento. Codifica el receptor del factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Goug *et al* 1990). Su homólogo en X es **CSF2RA**.

También han sido identificados algunos genes en la región PAR2, como el gen **SYBL1Y** (*synaptobrevin-like*) que está inactivado en el cromosoma Y (D'Esposito *et al* 1996) y el gen del receptor de la interleucina-9, **IL9RY** (Kermouni *et al* 1995).

3.1.3.- LA REGION ESPECÍFICA DEL CROMOSOMA Y Y SUS GENES

Esta región no recombina con ninguno de los cromosomas, por lo cual sus loci se transmiten inalteradamente por línea paterna de generación en generación (en ausencia de mutaciones). Presenta algunos genes funcionales, de gran importancia para el desarrollo sexual del hombre (Tabla 3).

- El **SMCY**, gen que codifica el antígeno menor de histocompatibilidad H-Y, fue el primer gen identificado en la región específica del cromosoma Y (Wachtel *et al* 1975). **SMCX** es su homólogo en el cromosoma X.

- El gen **ZFY** codifica una proteína que presenta un motivo en dedo de zinc (Page *et al* 1987) cuya función no es conocida por el momento. Su homólogo en el cromosoma X es **ZFX**.

- El gen **SRY** ha sido aislado en el brazo corto del cromosoma Y, en la llamada *Sex-determining Region of the Y chromosome*, a 5kb en dirección proximal a PAR1 (Sinclair *et al* 1990). Presenta un solo exón y carece de homólogo en X. Diversos estudios han demostrado que se expresa únicamente a nivel testicular. En ratones transgénicos hembras, la inserción de un fragmento de ADN conteniendo el homólogo murino de SRY induce la formación de testículos (Koopman 1991). En humanos, las mutaciones en este gen afectan total o parcialmente al desarrollo testicular.

- La familia de genes **YRRM** (*Y chromosome RNA Recognition Motif*) se cree que podría intervenir en la regulación de la espermatogénesis. Como el gen anterior, este grupo carece de homólogo en X.

- El **RPS4Y**, localizado entre SRY y ZFY, es un gen que codifica la proteína ribosómica S4. Posee un homólogo en X que escapa a la inactivación (Fisher *et al* 1990).

• El **AMGY**, gen que codifica un producto *amelogenine-like*, también tiene un homólogo en X (Nakahori *et al* 1991), que es responsable de la formación normal del esmalte dentario.

Tabla 3. Algunos genes conocidos en el cromosoma Y humano

SÍMBOLO	NOMBRE/FUNCIÓN	LOCALIZACIÓN	HOMÓLOGO EN X
CSF2RAY	Receptor del GM-CSF	PAR1, Yp	CSF2RA
IL3RAY	Receptor IL-3	PAR1, Yp	IL3RA
ASMTY	Codifica Acetil serotonin N-metil transferasa	PAR1, Yp	ASMT
XE7Y	Codifica antígeno XE7	PAR1, Yp	XE7
MIC2Y	Codifica antígeno de superficie CD99	PAR1, Yp	MIC2
XGRY	Codifica regulador de grupo sanguíneo	PAR1, Yp	XGR
XGY	Codifica un antígeno de grupo sanguíneo	PAR1, Yp	XG
ZFY	Codifica proteína en dedo de zinc	Distal Yp11.1	ZFX
RSP4Y	Codifica proteína ribosómica S4	Distal Yp11.1	RSP4X
AMGY	Codifica amelogenina	Proximal Yp11.1	AMGX
SMCY	Codifica antígeno H-Y	Proximal Yq	SMCX
SRY	Codifica el TDF	Próximo a PAR1, Yp	No
Familia YRRM	¿Regulación de la espermatogénesis?	Yq11.23	No

3.1.4.- ALGUNAS PECULIARIDADES DEL CROMOSOMA Y. ANALOGÍA CON EL ADN MITOCONDRIAL

El cromosoma Y presenta una compleja secuencia, con grandes fragmentos de ADN no codificante y numerosas familias de secuencias repetitivas dispersas o en tándem. El hecho de que el cromosoma Y sea extraordinariamente pobre en genes (Lahn *et al* 1997) hace pensar en una baja presión selectiva en las zonas no codificantes del cromosoma, por lo que podría acumular más mutaciones y secuencias *junk* que los otros cromosomas. Además, el que permanezca más tiempo en la línea germinal, y que la formación de esperma conlleve un alto número de divisiones celulares, también podría favorecer la aparición de mutaciones (Weber y Wong 1993, Brinkmann *et al* 1998).

Paradójicamente, la frecuencia de polimorfismos en regiones no codificantes del cromosoma Y es mucho menor que en el resto del genoma nuclear. Hay varias posibles explicaciones que intentan justificar este bajo nivel de polimorfismo observado en el cromosoma Y respecto a otros cromosomas (Jobling y Tyler-Smith 1995).

Una de las proposiciones se basa en una razón aritmética, ya que la población efectiva de cromosomas Y (número de cromosomas que pasan a la descendencia) en un momento determinado es claramente inferior a la de otros cromosomas (por cada cromosoma Y están presentes 3 cromosomas X y 4 de cada autosoma), lo que refleja el hecho de que existe correlación entre diversidad y tamaño de la población cromosómica (Kimura 1983). Además, actividades históricamente ligadas al género masculino como guerras y otras expansiones, así como ciertas estructuras sociales o religiosas habituales en el pasado, todavía reducen más el número efectivo de cromosomas Y. Todo esto hace que procesos como la deriva genética hayan tenido un efecto mucho más patente sobre el cromosoma Y que sobre cualquier otro, lo que acrecienta su interés para estudios de evolución humana (Roewer *et al* 1996a, Underhill *et al* 1996).

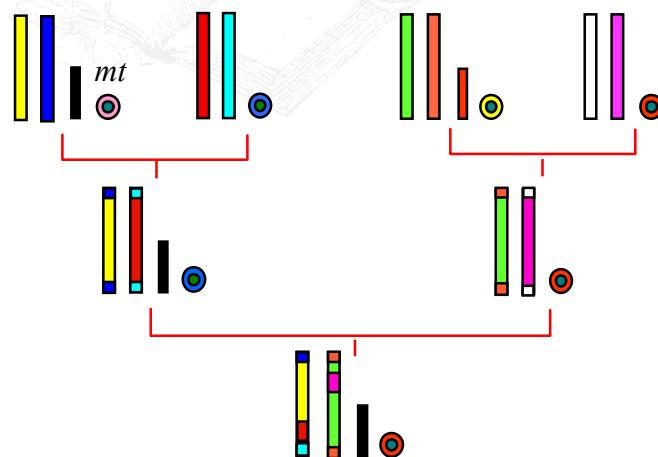
Otro de los argumentos hace referencia a la falta de recombinación del cromosoma Y. Debido a este hecho, si el proceso de selección actuase sobre alguno de los genes del cromosoma, se produciría una selección global de todo el haplotipo que portase dicho cromosoma por efecto “*hitch-hiking*”. El haplotipo en concreto aumentaría mucho de frecuencia y podría llegar a fijarse, lo que provocaría una bajada de los niveles de polimorfismo global del cromosoma Y en la población. De todas maneras, para que un barrido selectivo (“*selective sweep*”) de este tipo se pueda detectar en el presente, tendría que haber sucedido bastante recientemente, ya que si nos remontamos a los comienzos de la historia evolutiva de la especie, la mutación ya habría tenido tiempo de regenerar los niveles de polimorfismo.

El análisis de las primeras secuencias de ADN_{mt} (Anderson *et al* 1981) tuvo una gran repercusión en el estudio de las relaciones filogenéticas entre los diferentes

grupos humanos actuales. El hecho de que una molécula se herede exclusivamente por vía materna y sin sufrir recombinación, permite preservar la información de los sucesos mutacionales que han surgido en un linaje mitocondrial determinado en las generaciones pasadas. Pero el ADN mt no es la única molécula que tiene un gran potencial filogenético. El cromosoma Y (Figura 2), portador de los genes determinantes del sexo masculino, también se hereda uniparentalmente (en este caso por vía paterna) y no padece fenómenos de recombinación en prácticamente toda su extensión (Wolf *et al* 1992).

Figura 2. Esquema de la transmisión diferencial de un cromosoma Y, una molécula de ADN mt , y un par de autosomas*

Herencia de autosomas, cromosoma Y y ADN mt .



(*Las secuencias autosómicas recombinan en cada generación, mientras que la región específica del cromosoma Y y el ADN mt no lo hacen. Por consiguiente, el material autosómico de un individuo procede de múltiples ancestros, pero tanto el cromosoma Y (excluyendo las regiones pseudoautosómicas) como el ADN mt provienen de un único antepasado).

Esta falta de recombinación hace que el cromosoma se comporte como un gran fragmento único de ADN, portador de un haplotipo que se transmite intacto de padres a hijos, a no ser que actúen fenómenos de mutación.

El ADN_{mt} presenta una tasa de sustitución de bases diez veces superior a la del ADN nuclear, lo que significa que existe un gran número de secuencias diferentes de ADN_{mt} en la población, por tanto, una gran diversidad. Al mismo tiempo, esta fuerte tasa de mutación también es causa de inconvenientes: mutaciones puntuales se pueden producir varias veces en el mismo punto o aparecer independientemente en diferentes linajes, haciendo imposible determinar el estado ancestral. Por el contrario, algunas mutaciones puntuales en el cromosoma Y se pueden considerar como acontecimientos únicos que son específicos de un linaje, ya que cuando un grupo de cromosomas Y portan una mutación puntual dada es muy probable que tengan el mismo origen.

A modo de resumen, las principales características de ambos tipos de ADN se muestran a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Analogías/Diferencias entre el ADN de cromosoma Y y el ADN_{mt}

Analogías/Diferencias	ADN Cromosoma Y	ADN mitocondrial
Localización en la célula	Núcleo (ADN genómico)	Mitocondrias (Extranuclear)
Modo de herencia	Monoparental Masculina	Monoparental Femenina
Tipo de Transmisión	En bloque	En bloque
Recombinación	Generalmente, no*	No
Tipo de molécula de ADN	Lineal	Circular
Tamaño molecular aprox.	60 Mb	16.5 Kb
Secuencia conocida	No en su totalidad	Si
Densidad de genes	Actualmente escasa	Alta
ADN no Codificante	Abundante	Escaso
Tasa de mutación	Baja	Alta
Polimorfismos predominantes	Variables**	De secuencia

(* Sólo en las regiones pseudoautosómicas).

(**Pequeños y grandes reordenamientos como inserciones, deleciones, duplicaciones e inversiones. Repeticiones en tándem en ADN satélite, minisatélite y microsatélite).

Las características que hemos comentado han hecho que las aportaciones del cromosoma Y, tanto al campo antropológico (Hammer 1994, Jobling y Tyler-Smith 1995) como al médico-legal (Roewer y Epplen 1992a, Gomolka *et al* 1994), sean ampliamente reconocidas.

3.2.- POLIMORFISMOS EN EL CROMOSOMA Y

Tras las primeras descripciones de marcadores polimórficos en el cromosoma Y (Casanova *et al* 1985, Lucotte y Ngo 1985), durante casi una década no se van a encontrar nuevos polimorfismos. Inicialmente, una búsqueda sistemática de polimorfismos convencionales (RFLPs) pone de manifiesto su relativa escasez (Jakubicza *et al* 1989, Malaspina *et al* 1990, Spurdle y Jenkins 1992a). A éstos se añaden los detectados por electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE) (Oakey y Tyler-Smith 1990, Jobling 1994a) y, posteriormente, un nuevo tipo de polimorfismos detectables por PCR (Roewer *et al* 1992a, Seielstad *et al* 1994). Otra estrategia empleada, la secuenciación de amplias regiones no codificantes del cromosoma Y de varios individuos, apuntó un acusado monomorfismo (Dorit *et al* 1995, Hammer 1995a).

3.2.1.- TIPOS DE POLIMORFISMOS DEL CROMOSOMA Y

Actualmente se conocen diversos tipos de polimorfismos diferentes localizados en este cromosoma (Figura 3), detectables por métodos basados en PCR muchos de ellos, que incluyen entre otros:

- Duplicaciones/delecciones (Casanova *et al* 1985, Jobling *et al* 1996).
- Reordenamientos complejos (Lucotte y Ngo 1985).
- Mutaciones puntuales de cambios de base (Underhill *et al* 1996, 1997).
- Inserciones Alu (Hammer 1994).
- Polimorfismo en ADN repetido en tándem (Roewer *et al* 1992b, Jobling *et al* 1994b).

La mayoría de los polimorfismos de cromosoma Y (Tabla 5) son difíciles de interpretar, pues todavía los mecanismos genéticos que los originan no están bien caracterizados.

Duplicación/Delección

Este tipo de polimorfismo se identifica cuando una variación en el tamaño de los fragmentos es detectada por enzimas de restricción diferentes.

- **12f2 (DYS11)**. Fue el primer RLFP descrito como específico de cromosoma Y (Casanova *et al* 1985). Lo detectan *EcoRI* (5.2 y 3.2 kb) y *TaqI* (10 y 8 kb). Aparentemente es un evento único.

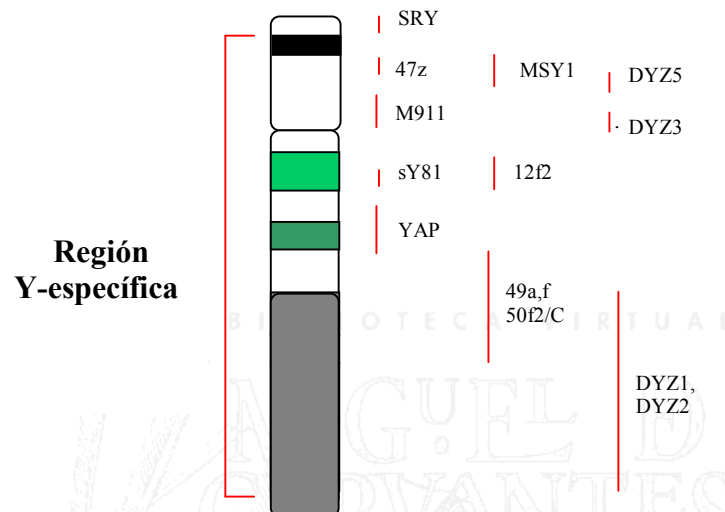
- **50f2(DYS7/C)**. Con *EcoRI* se detectan varios fragmentos (50f2/A, B, C, D y E). La delección de uno de los fragmentos (locus C localizado en Yq) origina un polimorfismo (Disteche *et al* 1986). Este polimorfismo comprende tres categorías: grandes deleciones, pequeñas deleciones y duplicación. Hoy es posible detectar la delección 50f2/C por PCR -producto de 196 pb presente o ausente- (Jobling *et al* 1995). Este locus (DYF155S2) dista 4 kb de 50f2/C (DYS7/C). Los *primers* empleados en la determinación también amplifican el minisatélite MSY1 (DYF155S1).

Reordenamientos complejos

- **49a/f (DYS1)**. Fue descrito inicialmente por Lucotte y Ngo (1985). Con ayuda de *TaqI* detecta una secuencia débilmente repetitiva. También se utilizan otras enzimas (*PvuII*, *BglIII*, *HindIII*, *PstI*, etc.) pudiendo conformarse más de 100 haplotipos diferentes. Las bandas detectadas pueden variar tanto en número (presencia o ausencia) como en tamaño (Ngo *et al* 1986, Spurdle y Jenkins 1992b).

Es el RFLP con mayor variabilidad en el cromosoma Y, lo que dificulta la interpretación de este polimorfismo.

Figura 3. Localización de algunos loci polimórficos en el cromosoma Y



Inserción Alu (YAP)

El YAP (DYS287) o *Y Alu Polimorphism*, es el resultado de una inserción reciente de un miembro de la familia Alu en el brazo largo, Yq11, del cromosoma Y (Hammer 1994). La variación detectada en el tamaño de los fragmentos es idéntica y se identifica con más de una enzima (*TaqI* o *EcoRV*). Por técnicas de PCR, cuando ha tenido lugar la inserción Alu (305 pb) se detecta un producto de 455 pb (YAP+) y si ésta no se ha producido, de 150 pb (YAP-) (Hammer y Horai 1995b).

La secuenciación ha mostrado que en el cromosoma Y el elemento Alu se inserta en la misma posición en diferentes individuos de distintas poblaciones (Hammer 1994) y se considera que la inserción (YAP+) tiene un único origen. El hecho de que esté ausente en la región homóloga del cromosoma Y en chimpancés y gorilas

sugiere que la inserción se ha producido tras la divergencia entre hombres y grandes simios.

La presencia del elemento YAP es muy abundante en la población Sub-Sahariana (sobre todo en bantúes y africanos del Oeste), seguida de la del Norte de África. En Europa es poco frecuente, y nula en la mayoría de las poblaciones de Oceanía y Asia (excepto en Japón, donde muestra una frecuencia bastante elevada). Estos resultados podrían indicar que la distribución de cromosomas Y portando el YAP es posible que ocurriese por migración de varones *Homo sapiens* desde África hacia Europa y Asia (Hammer 1994).

El marcador YAP es particularmente útil en estudios sobre el origen y migración de poblaciones humanas porque representa probablemente un evento único con un estado ancestral conocido (alelo YAP-), aunque es necesario confirmar estas suposiciones con más estudios sobre otras poblaciones y con más marcadores de cromosoma Y.

Mutaciones puntuales

Las sustituciones de una base (Hamer y Horai 1995b, Whitfield *et al* 1995, Underhill *et al* 1996) representan habitualmente un evento mutacional único, probablemente abundante (Jobling *et al* 1997), pudiendo definir un grupo monofilético. La misma sustitución en el mismo punto va a ser rara, excepto que haya ocurrido hace mucho tiempo. Se pueden detectar con una sola enzima o por secuenciación. Estos polimorfismos son poco variables, su tasa de mutación es baja y presentan sólo dos estados alélicos, por lo que son muy adecuados para estudios de evolución humana a lo largo del tiempo.

- **47z (DXYS5Y)**. Es un RFLP detectable con la enzima *StuI* (Nakahori *et al* 1989). No es un marcador específico de cromosoma Y puesto que la sonda detecta igualmente un locus en el cromosoma X.

- **92R7** (No tiene locus asignado). El polimorfismo es analizable por PCR. Se identifica una secuencia moderadamente repetitiva. La sonda detecta siete bandas tras digestión con *HindIII* (Mathias *et al* 1994).

- **sY81 (DYS271)**. El polimorfismo convencional sY81, detectado en población Sub-Sahariana YAP+, presenta como sustitución de base la transición A→G (Seielstad *et al* 1994) que origina la pérdida de un lugar de restricción para la enzima *NlaIII*. Este polimorfismo se detecta por PCR-RFLP (Seielstad *et al* 1994), definiéndose dos alelos, A (alelo 0) y G (alelo 1). Es manifiesta la asociación entre el alelo G en sY81 y la inserción YAP. Combinando estos dos polimorfismos se ha intentado inferir el momento en que ocurren estas dos mutaciones. El estudio haplotípico muestra la presencia de un alelo A con YAP- en primates no humanos. Esto hizo sugerir que primero sobrevino la inserción Alu sobre un cromosoma con un alelo A y que posteriormente tuvo lugar la transición A→G sobre un cromosoma YAP+. La transición ha debido producirse una sola vez y, probablemente, en África.

- **SRY-1532** (Jobling y Tyler-Smith 1995, Whittfield *et al* 1995, Kwok *et al* 1996). Es una mutación puntual en la secuencia del gen principal que presenta la transición A→G en la posición 10.831. Es poco frecuente en Europa pero común en el subcontinente indio. Por PCR se obtiene un producto de 167 pb que se analiza por SSCP o usando la enzima *DraIII*. Otras mutaciones puntuales en este gen también detectables por PCR son **SRY-8299**, polimorfismo antes conocido como SRY 4.064 (Whitfield *et al* 1995), que presenta la sustitución de base G→A y **SRY-2627**, denominado primeramente SRY-2628 (Veitia *et al* 1997), que consiste en la sustitución C→T y que es abundante en la Península Ibérica.

- **DYS199** La transición C→T (Underhill *et al* 1996) se detecta con *MunI*.

- Otras mutaciones puntuales como **M9** (Underhill *et al* 1997), **Tat** (Zerjal *et al* 1997), etc.

Tabla 5. Algunos ejemplos de polimorfismos de cromosoma Y

TIPO	LOCUS	NOMBRE	DETECCION	REFERENCIA
Sustitución de una base	DXYS5Y	47z	<i>StuI</i> / hibridación	Nakahori <i>et al</i> (1989)
	–	92R7	<i>HindIII</i> /hibridación PCR	Mathias <i>et al</i> (1994)
	DYS271	sY81	<i>NlaIII</i> /PCR	Seielstad <i>et al</i> (1994)
	SRY	SRY-1532	<i>DraIII</i> /PCR	Witfield <i>et al</i> (1995) Kwok y Hawkins (1996)
	SRY	SRY-8299	<i>BsrBI</i> /PCR	Witfield <i>et al</i> (1995)
	SRY	SRY-2627	HKAI/PCR	Veitia <i>et al</i> (1997)
	DYS199		<i>MunI</i>	Underhill <i>et al</i> (1996)
	–	M9	<i>HinfI</i> /PCR	Underhill <i>et al</i> (1997)
	–	Tat	<i>NlaIII</i> /PCR	Zerjal <i>et al</i> (1997)
Duplicación o delección	DYS11	12f2	<i>TaqI</i> o <i>EcoRI</i> / hibridación	Casanova <i>et al</i> (1985)
	DYS7/C	50f2	<i>EcoRI</i> /hibridación	Disteche <i>et al</i> (1986)
	DYF155S2	50f2/C	PCR	Jobling <i>et al</i> (1995)
Inserción	DYS287	YAP	<i>TaqI</i> o <i>EcoRV</i> / hibridación	Hammer (1994)
			PCR	Hammer y Horai (1995)
Reordenamientos complejos	DYSS1	49a/f	<i>TaqI</i> y otras/ hibridación	Lucotte y Ngo (1985)
Repeticiones en tándem				
En ADN satélite	DYZ3	Y α 1	<i>BglII</i> /PFGE-hibridación	Oakey <i>et al</i> (1990)
			<i>HindIII</i> /PCR	Santos <i>et al</i> (1995)
En ADN minisatélite	DYF155S1	MSY1	MVR-PCR	Jobling <i>et al</i> (1994b)
En ADN microsatélite	DYS288	–	PCR	GDB
	–	YCAI	PCR	Mathias <i>et al</i> (1994)
	–	YCAII	PCR	Mathias <i>et al</i> (1994)
	–	YCAIII	PCR	Mathias <i>et al</i> (1994)
	DYS388	–	PCR	GDB
	DYS392	–	PCR	GDB
	DYS19	27H39LR	PCR	Roewer <i>et al</i> (1992a)
	DYS390	–	PCR	GDB
	DYS391	–	PCR	GDB
	DYS393	–	PCR	GDB
	DYS385	–	PCR	GDB
	DYS389	–	PCR	GDB
	DXYS156Y	–	PCR	Chen <i>et al</i> (1994)

Polimorfismo en ADN repetido en tándem

- **En ADN Satélite.** El locus DYZ3 (Satélite Alfoide), de localización centromérica, está formado por subunidades de aproximadamente 170 pb organizadas en unidades de unas 6 kb a lo largo de una región de centenares de kb. Aquí se produce un polimorfismo de longitud ($Y\alpha I$) detectable con diferentes enzimas de restricción (Oakey *et al* 1990) como *BglIII* (*array length polymorphism*), *AvaII* o *EcoO1091*, mediante técnicas electroforéticas en gel de campo pulsante (PFGE) que tienen como principales inconvenientes la lentitud en la determinación y la necesidad de usar sangre fresca o líneas celulares.

Afortunadamente es posible tipar el polimorfismo alfoide por PCR (Santos *et al* 1995), obteniéndose un producto de 285 pb que se corta parcialmente con *HindIII* (lo que indica unidad de 6 kb presente). Se generan fragmentos de 237 y 48 pb, analizándose por heterodúplex la divergencia de subunidades alfoides de la secuencia repetitiva, que se localiza en los extremos del centrómero. Las bases moleculares del polimorfismo son complejas y se basan en la coamplificación de *repeats* alfoides que se diferencian en tamaño y/o secuencia (Santos *et al* 1996). La mayoría de los individuos poseen un locus conservado de 281 pb con una deleción de 4 pb en la rama izquierda de la secuencia alfoide, próxima a Yp, y un número variable de loci (entre 1 y 5) de 285 pb cada uno en la rama derecha, próxima a Yq, cuyas secuencias suelen diferir en una sola base. Combinándolos, se pueden formar desde 1 par hasta 5 pares de heterodúplex por individuo, que asumen diferentes conformaciones según su secuencia y pueden resolverse en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Es un polimorfismo común en Europa, pero no ocurre en un grupo monofilético (Jobling y Tyler-Smith 1995), lo que constituye una limitación para estudios de evolución humana.

También existen otros loci polimórficos como DYZ1/*HaeIII* en el Satélite III y DYZ2/*MspI* en el Satélite I (Mathias *et al* 1994), ambos localizados en el brazo largo del cromosoma Y y que están formados por secuencias altamente repetitivas. En el

brazo corto, DYZ4 y DYZ5 (Y190) (Oakey *et al* 1990) representan loci con un bajo grado de bloques de secuencias repetitivas.

• **En ADN Minisatélite**

Mientras que en la región pseudoautosómica PAR1 se conocen numerosos minisatélites, el único minisatélite descrito hasta la fecha en la región no recombinante es el MSY1 (locus DYF155S1), localizado en brazo corto del cromosoma Y (Jobling *et al* 1994b). Las unidades de repetición, ricas en AT, tienen 25 pb y existen cuatro variedades identificadas por la secuenciación directa de los extremos de los alelos. Los alelos tienen entre 60 y 100 unidades de repetición.

El estudio de MSY1 por medio MVR-PCR (Jobling *et al* 1994b) ha demostrado que este minisatélite posee un alto grado de diversidad alélica y un alto poder de discriminación. Cuando se comparan códigos MSY1 con grupos de haplotipos, se observa una cierta correlación directa entre mayor o menor homogeneidad del grupo y estructuras MSY1. Algunas de las unidades de repetición parecen ser altamente específicas de poblaciones (Jobling *et al* 1994b, Bouzekri *et al* 1995).

El análisis de minisatélites específicos de cromosoma Y, por su polimorfismo, puede resultar muy interesante para estudiar linajes parentales, así como la tasa y proceso de mutación debido a la ausencia de intercambios interalélicos, y, finalmente, como marcadores específicos en procesos de identificación masculina en el campo forense (Jobling *et al* 1994b).

• **En ADN Microsatélite**

Actualmente los microsatélites constituyen una de las clases más utilizadas de marcadores de cromosoma Y (Roewer *et al* 1992a,b; Mathias *et al* 1994, Kayser *et al* 1997, de Knijff *et al* 1997). Son polimorfismos muy variables dentro de una población y analizables por PCR, lo que les hace ser de gran utilidad en genética forense. La facultad de detectar y discriminar ADN de varón hacen de los STRs del

cromosoma Y un eficaz complemento de los establecidos sistemas autosómicos basados también en PCR.

A continuación describiremos algunos de estos sistemas:

3.2.2.- STRs DEL CROMOSOMA Y ANALIZABLES MEDIANTE PCR.

Los STRs del cromosoma Y descritos presentan unidades de repetición que comprenden de dos a cinco nucleótidos. En la Figura 4 se muestra la ubicación de algunos de ellos, de los que haremos una breve descripción:

• *Dinucleótidos*

DYS288 (locus GDB-ID G00-139-631). Este microsatélite de cromosoma Y posee como unidad de repetición el dinucleótido CA y presenta un único locus polimórfico.

YCAI (Mathias *et al* 1994). Su unidad de repetición es el dinucleótido CA Se detectan dos loci polimórficos.

YCAII (Mathias *et al* 1994). También presenta el repeat CA y dos loci polimórficos.

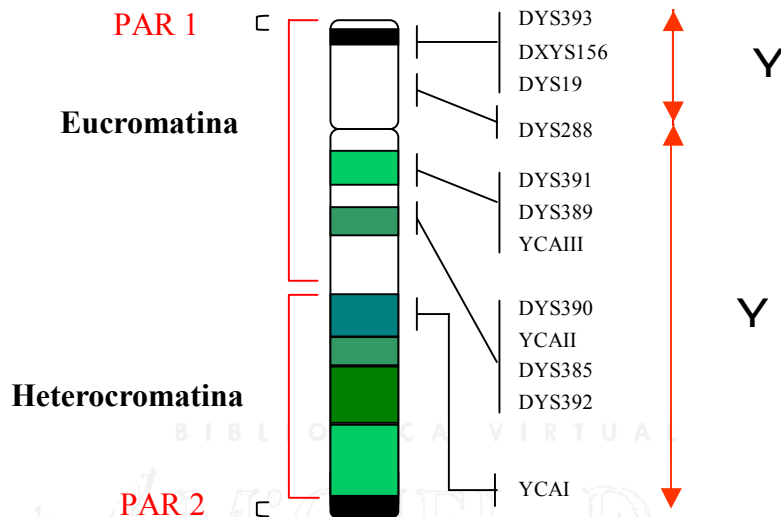
YCAIII (Mathias *et al* 1994). Comparte con los anteriores la misma unidad de repetición, siendo dos los loci polimórficos detectados para el cromosoma Y.

• *Trinucleótidos*

DYS388 (locus GDB-ID G00-365-729). Este STR tiene como unidad de repetición el trinucleótido ATA. Tiene un sólo locus polimórfico.

DYS392 (locus GDB-ID G00-456-509). Se caracteriza por el repeat ATT y es poseedor de un único locus polimórfico.

Figura 4. Esquema de la localización de algunos STRs descritos en el cromosoma Y



• **Tetranucleótidos**

DYS19 (locus GDB-ID G00-121-409). Este STR, primeramente denominado polimorfismo Y27H39, fue el primero que descrito en el cromosoma Y (Roewer *et al* 1992a). La unidad de repetición es el tetranucleótido GATA. Presenta un locus polimórfico.

DYS390 (locus GDB-ID G00-366-115). La unidad de repetición es CTAT y tiene solo un locus polimórfico.

DYS391 (locus GDB-ID G00-366-118). Este sistema tiene como motivo de repetición el tetrámero CTAT y un único locus polimórfico.

DYS393 (locus GDB-ID G00-456-649). La unidad repetitiva básica es el tetranucleótido GATA. Existe un sólo locus polimórfico.

DYS389I/II (locus GDB-ID G00-366-108). La unidad de repetición es tetranucleotídica (CTG/AT) y presenta 2 loci polimórficos.

DYS385 (locus GDB-ID G00-316-257) También en este sistema están implicados dos loci. La unidad de repetición es GAAA.

- **Pentanucleótidos**

DXYS156Y (Chen *et al* 1994). El motivo repetitivo es el pentanucleótido TAAAA. No es un STR específico de cromosoma Y, ya que también se amplifica un locus homólogo en X (DXYS156X).

4.- CONTRIBUCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE ADN AL CAMPO MEDICO-LEGAL Y DE LOS POLIMORFISMOS DEL CROMOSOMA Y EN PARTICULAR

Desde que Jeffreys y colaboradores consiguieron el reconocimiento de los polimorfismos de ADN para usos forenses, al resolver satisfactoriamente un problema de inmigración en el Reino Unido empleando sondas multilocus (Jeffreys *et al* 1985c), los polimorfismos de ADN, y los de cromosoma Y cada vez en mayor medida, siguen contribuyendo con nuevas aportaciones a ampliar el horizonte médico-legal en las siguientes áreas:

4.1.- INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA DE LA PATERNIDAD

La utilidad del análisis de los polimorfismos de ADN es incuestionable, tanto en casos rutinarios, en los que se dispone de todas las muestras necesarias, como en casos especiales de difícil solución por métodos clásicos, por ejemplo, aquellos en los que se carece de muestra perteneciente al presunto padre (Odelberg *et al* 1988), análisis de líquido amniótico para determinación de paternidad en fetos (Ishiyama *et al* 1988), paternidades a realizar sobre restos óseos, en ausencia de madre, con familiares en ausencia de ambos progenitores, etc.

A partir de la introducción de la PCR podemos estudiar diversos tipos de polimorfismos (AMP-FLPs, STRs, polimorfismos de secuencia), que nos van a

permitir, en general, realizar investigaciones biológicas de paternidad con mayor rapidez y con menor coste relativo.

Los polimorfismos de cromosoma Y (STRs) pueden proporcionar información adicional en casos de investigación biológica de paternidad en hijos varones cuando, por fallecimiento del progenitor u otras causas, no estén disponibles datos genéticos relativos al presunto padre (Pena y Chakraborty 1994). Esta falta de datos puede suplirse con los obtenidos de familiares varones por línea paterna para comprobar si su haplotipo coincide con el del supuesto hijo.

También pueden aportar ayuda en la confirmación de exclusiones. Trabetti *et al* (1996) y Weichhold *et al* (1996) han revisado paternidades con exclusión probada y la han corroborado, en un elevado porcentaje de ellas, utilizando únicamente el sistema DYS19.

La inclusión basada únicamente en determinaciones de cromosoma Y no es factible, ya que todos los varones pertenecientes al mismo linaje paterno comparten el mismo haplotipo y se encontrarían inexcusablemente implicados.

Dado el interés de los STRs de cromosoma Y en determinaciones de paternidad, algunos laboratorios forenses acreditados los están incluyendo ya en su sistemática.

4.2.- CRIMINALÍSTICA

Muy frecuentemente los vestigios biológicos de interés en criminalística se encuentran en cantidades ínfimas, sufren deterioro o están contaminados de diversas formas, lo que dificulta enormemente su análisis.

La determinación de polimorfismos de ADN, en especial mediante la técnica de PCR, es un procedimiento óptimo cuando necesitamos analizar manchas de sangre minúsculas o degradadas u otras muestras (como esperma, saliva, pelos o cabellos

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

Los polimorfismos de ADN aportan al análisis criminalístico la posibilidad de diferenciar fácilmente muestras compuestas por mezclas de fluidos procedentes de distintos individuos (Evetts *et al* 1991a,b; Wiegand *et al* 1992)) y, en el caso particular de agresiones sexuales, permiten separar el ADN de células vaginales del ADN espermático (Gill *et al* 1987a,b).

El potencial del ADN como medio de identificación hizo que pronto se propusiese la creación de bases de datos de delincuentes para delitos graves y con alta tasa de reincidencia, como el de violación, formadas a partir de las evidencias recogidas con ocasión de hechos delictivos, lo que permitiría la comparación con sospechosos e interrelacionar delitos cometidos por la misma persona. En el Reino Unido y Holanda estas bases de datos ya son una realidad (Werret 1997, Kloosterman y Janssen 1997). En el primero de estos países se almacenan perfiles de ADN de inculpados o simplemente sospechosos y se pretende incluir a toda la población en el futuro. Otros países se inclinan por seguir un criterio más restrictivo, que incluya casos concretos (delitos contra la libertad sexual, por ejemplo). En España, por el momento, no existe legislación al respecto. (En un número especial de la publicación periódica *Forensic Sci Int* (1997) se recogen aspectos legales y éticos sobre este tema).

Los polimorfismos de cromosoma Y (STRs) aplicados al análisis criminalístico (Roewer y Eppelen 1992a), presentan la ventaja de proporcionar información adicional sobre la presencia de ADN de varón en manchas forenses, particularmente en casos de violación y asalto sexual, en los que este análisis ofrece una nueva aproximación.

La principal utilidad de estos sistemas se encuentra en los casos de muestras con mezclas de células masculinas y femeninas. Contrariamente a lo que sucede en los sistemas autosómicos, una elevada cantidad de ADN femenino no inhibe la amplificación de los alelos de cromosoma Y (Prinz *et al* 1997) permitiendo obtener un perfil específico de ADN del asaltante, incluso omitiendo el paso de la lisis diferencial. En aquellas ocasiones en las que esta última determinación se presume ineficaz o arriesgada, por ejemplo, por estar la muestra muy degradada o por contener una mínima cantidad de esperma, estos STRs pueden incrementar la tasa de éxito en la identificación del componente masculino en fluidos corporales con mezcla de células de ambos sexos. Este abordaje no sólo es rápido, sino que minimiza también la pérdida de ADN espermático y reduce el riesgo de contaminación.

Los STRs de cromosoma Y también pueden ser interesantes en la identificación de otras mezclas, como por ejemplo, sangre-sangre, sangre-saliva o mezcla de tejidos similares, en las que no puede aplicarse la lisis celular diferencial.

Como otras posibles aplicaciones podemos incluir la detección de células epiteliales masculinas procedentes de individuos vasectomizados o el permitir una mejor aproximación al número de contribuyentes de semen en casos de violaciones múltiples, obteniéndose en este caso una mezcla de haplotipos de los agresores. Cuando la víctima de la violación es un hombre, a pesar de la mezcla, también es posible inferir el haplotipo del violador restando el correspondiente a la víctima.

Los STRs de cromosoma Y también pueden usarse como un método de screening rápido para excluir sospechosos, sin tener que emplear tiempo en una extracción diferencial que a veces se muestra infructuosa (Kayser *et al* 1997).

En casos de criminalística, cuando un sospechoso posee un haplotipo de cromosoma Y diferente al del culpable estaríamos ante una buena razón para su exclusión, al igual que ocurre con otros sistemas basados en el tipado de ADN. La inclusión basada solamente en marcadores de cromosoma Y plantea el mismo

problema que hemos comentado al hablar de la investigación de la paternidad. Utilizando sistemas autosómicos, la probabilidad de que dos individuos posean idéntico perfil es habitualmente muy baja (se reduciría al caso de que ambos fuesen gemelos univitelinos), sin embargo, la determinación aislada de polimorfismos de cromosoma Y incluye a todos los familiares varones por vía paterna por compartir idéntico haplotipo, por lo que el veredicto de culpabilidad deberá basarse en otras pruebas adicionales.

Los casos de agresiones sexuales, como vemos, son ideales para la aplicación de este tipo de marcadores de cromosoma Y, lo que va a redundar en un incremento del número de casos resueltos.

Por otro lado, como consecuencia del alto grado de especificidad poblacional de algunos haplotipos de cromosoma Y, sería razonable hacer suposiciones sobre el origen étnico de una muestra de ADN hallada en la escena del delito, caso de portar un haplotipo característico de un grupo particular, lo que permitiría acotar la búsqueda de sospechosos. En algunos casos, cuando las frecuencias haplotípicas sean conocidas, tal información podría utilizarse en investigaciones, siempre y cuando se establezcan normas cautelares que garanticen el uso adecuado de esta información.

4.3.- IDENTIFICACIÓN GENÉTICA

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

Diversos estudios han demostrado la utilidad de la amplificación del ADN mediante PCR en la identificación de cadáveres humanos, ya que cuando la muestra no se encuentra en condiciones óptimas por efecto de factores adversos como temperatura, humedad y procesos autolíticos y de degradación cadavéricos, la identificación por RFLPs puede no ser posible. Aún en restos muy antiguos es

posible analizar ADN_{mt} o STRs partiendo, por ejemplo, de piezas dentarias (Alvarez-García *et al* 1996) o fragmentos óseos (Gill *et al* 1994a). La comparación con el ADN obtenido de muestras de sangre de algún ascendiente o descendiente indubitado (preferiblemente de los progenitores) suele ser suficiente para establecer una relación de parentesco.

En situaciones de grandes catástrofes (Olaisen *et al* 1997), los polimorfismos de ADN se revelan como un procedimiento de gran utilidad respecto a la asignación de restos cadavéricos a individuos y la identificación de éstos. En circunstancias especiales, en las que el proceso de identificación de cadáveres o restos cadavéricos se prevea dificultoso, puede ser útil contar con fichas genéticas previas de individuos sometidos a conflictos bélicos o con profesiones de riesgo.

Los polimorfismos de cromosoma Y (STRs) en casos forenses de indentificación, especialmente cuando se trata analizar pequeños fragmentos humanos por efecto de desastres en masa, harían posible una rápida determinación del sexo del individuo, contribuyendo además a su identificación (Corach *et al* 1995, 1996).