



**Universidad de Cantabria  
Facultad de Medicina  
Departamento de Fisiología y Farmacología  
Medicina legal**

# **Estudio de los microsatélites y miniSTRs del cromosoma X de aplicación forense**

**María Castañeda Fernández**

**TRABAJO DE TESIS DOCTORAL DIRIGIDO POR:  
DRA. María Teresa Zarrabeitia Cimiano  
DR. Adrián Odriozola Martínez**

**2013**





La Doctora María Teresa Zarrabeitia Cimiano, profesora titular de Medicina Legal y Forense del departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Cantabria y Dr. Adrián Odriozola Martínez, Doctor en Bioquímica por la Universidad del País Vasco,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de tesis doctoral que lleva por título “**Estudio de los microsatélites y miniSTRs del cromosoma X de aplicación forense**”, de la licenciada en Biología por la Universidad de Salamanca, *María Castañeda Fernández*, ha sido realizada bajo nuestra dirección, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos la presente en Santander, a de Abril de 2013.

Prof. Dra. María Teresa Zarrabeitia Cimiano

Dr. Adrián Odriozola Martínez

Este trabajo ha sido financiado por el IFIMAV  
(*Fundación Marqués de Valdecilla*) mediante el proyecto API 11/26

*“No basta dar pasos que un día puedan conducir hasta la meta, sino que cada paso ha de ser una meta sin dejar de ser un paso”*

***Johann P. Eckermann***

A mis padres, hermanos y amigos  
A Juanan

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi agradecimiento a las personas que han colaborado en la realización de mi tesis doctoral y que sin ellos, no hubiera sido posible alcanzar este trabajo.

En primer lugar, darle las gracias a Maite Zarrabeitia, directora de mi tesis, por haberme dado la oportunidad de formarme en Genética Forense, particularmente en el apasionante mundo del cromosoma X, del que tanto sabe y me ha enseñado y con el que tanto he llegado a disfrutar.

En segundo lugar, mi más sincero agradecimiento a Adrián, mi codirector de tesis y sobre todo mi gran apoyo durante este tiempo, tanto con su presencia como en la distancia. Darle las gracias por sus enseñanzas, su generosidad y lo más importante, por sus sabios consejos en los momentos que más lo necesitaba.

A mis compañeras de laboratorio, Jana y Vero, por su buena disposición siempre que he necesitado su ayuda, pero especialmente, por su cariño y amistad. Muchas gracias a las dos por haber cuidado de mí. No quiero olvidarme de Carol, porque aunque los momentos compartidos han sido muy pocos, guardo un muy buen recuerdo.

A Tere, por sus útiles aclaraciones, pero sobre todo, por su desinteresada y valiosa ayuda en el laboratorio.

A las personas que han colaborado de forma altruista en la recogida de muestras (profesores de instituto, personal sanitario), porque sin ellos no hubiese sido posible comenzar este proyecto.

Y por último, a las personas que desde fuera me han apoyado en todo momento. A mis padres y hermanos, Miguel e Isabel, porque siempre han creído en mí y me han repetido una y otra vez que algún día este esfuerzo tendrá recompensa. A mis amigos, porque junto a mi familia son lo mejor que tengo, por las anécdotas y risas compartidas y por estar siempre ahí. En especial, a mi amiga Jarne, me ayudó muchísimo en los últimos momentos, gracias por su generosidad y apoyo.

A Juanan, por aguantarme, ayudarme y animarme cada segundo y confiar en mí siempre, repitiéndome día tras día que soy capaz de conseguir todos los objetivos que me proponga en la vida. Agradecerle la paciencia y tranquilidad que me aporta y le caracteriza.

Muchísimas gracias a todos de corazón.

## **LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AMOVA, *Analysis of Molecular Variance*  
ARN, Ácido ribonucleico  
ARNr, Ácido ribonucleico ribosómico  
ARNt, Ácido ribonucleico transferente  
cM, centimorgan  
CODIS, *Combined DNA Index System*  
CPD, *Combined power of discrimination*  
ddNTPs, Dideoxynucleótidos trifosfato  
ADN, Ácido desoxirribonucleico  
dNTPs, Deoxynucleótidos trifosfato  
EDNAP, *European DNA Profiling Group*  
EHW, Equilibrio de Hardy-Weinberg  
ENFSI, *European Network of Forensic Science Institute*  
ESS, *Extended European Standard Set*  
FBI, *Federal Bureau of Investigation*  
G6PD, Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa  
GCL, *German Core Loci*  
GEP-ISFG, Grupo Español y Portugués de la Sociedad Internacional de Genética Forense  
GPT, *Glutamic pyruvic transaminase*  
h, homocigosidad  
HET<sub>esp</sub>, Heterocigosidad esperada  
HET, heterocigosidad  
HET<sub>obs</sub>, Heterocigosidad observada  
HLA, *Human Leucocyte Antigen*  
INDEL, Inserción/Delección  
ISFG, Sociedad Internacional de Genética Forense  
ISSL, *Interpol Standard Set of Loci*  
kb, kilobases  
LCN, *Low Copy Number*  
LD, *Linkage Disequilibrium*  
LINEs, *Long Interspersed Nuclear Elements*  
LOD, *Logarithm of the Odds*  
LTR, *Long Terminal Repeats*  
Mb, megabases  
MEC, *Mean Exclusion Chance*  
min, minutos  
MIR, *Mammalian Interspersed Repeats*  
MIT, *Match Interpretation Threshold*  
ml, mililitro  
MLPs, *Multi Locus Probes*  
n, número de muestras  
NCBI, *National Center for Biotechnology Information*  
NDNAD, *National DNA Database*  
ng, nanogramo  
NIST, *National Institute of Standards and Technology*

PAT, *Peak Amplitude Threshold*  
pb, pares de bases  
PBS, *Phosphate-buffered Saline*  
PCR, *Polymerase Chain Reaction*  
PD, Poder de discriminación  
pg, picogramo  
PIC, *Polymorphism Information Content*  
RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
RFUs, *Relative Fluorescence Units*  
Rh, Rhesus  
rpm, Revoluciones por minuto  
s, segundo  
SINEs, *Short Interspersed Nuclear Elements*  
SLPs, *Single Locus Probes*  
SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*  
STRs, *Short Tandem Repeats*  
Taq, *Thermus aquaticus*  
Tm, *Melting Temperature*  
UV, Ultravioleta  
VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*  
vs., versus  
X-STRs, *X chromosomal Short Tandem Repeats*  
YHRD, *Y Chromosome Haplotype Reference Database*

# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>I.1. GENÉTICA FORENSE: DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS AL ADN .....</b>	<b>18</b>
<b>I.2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO.....</b>	<b>19</b>
<b>I.3. ADN MINISATÉLITE EN GENÉTICA FORENSE .....</b>	<b>20</b>
<b>I.4. ADN MICROSATÉLITE EN GENÉTICA FORENSE .....</b>	<b>22</b>
I.4.1. Clasificación de los STRs .....	22
I.4.2. Criterios de selección de los STRs .....	22
I.4.3. Nomenclatura de los STRs.....	24
I.4.4. Mutaciones de los STRs.....	25
I.4.5. Bases de datos y Grupos de Trabajo Internacionales de los STRs .....	25
I.4.6. Métodos de análisis de los STRs .....	26
<b>I.5. ADN MICROSATÉLITE DEL CROMOSOMA X EN GENÉTICA FORENSE .....</b>	<b>28</b>
I.5.1. De la Genética Clínica a la Genética Forense .....	28
I.5.2. Características del cromosoma X.....	29
I.5.3. Importancia del estudio de los microsatélites del cromosoma X en la práctica forense.....	30
I.5.4. Parámetros estadísticos de interés en Genética Forense .....	31
I.5.5. Mutación en microsatélites del cromosoma X .....	34
I.5.6. Aplicaciones de los STRs del cromosoma X en Genética Forense .....	35
I.5.7. Ligamiento y desequilibrio de ligamiento en el cromosoma X.....	37
I.5.8. Microsatélites del cromosoma X de uso forense.....	39
I.5.9. Grupos de ligamiento del cromosoma X de uso forense .....	43
I.5.10. El cromosoma X en genética de poblaciones .....	47
<b>I.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ADN ALTAMENTE DEGRADADO.....</b>	<b>48</b>
I.6.1. Limitaciones del análisis de muestras forenses: ADN degradado o en cantidad escasa.....	48
<i>I.6.1.1. Procesos de descomposición post-mortem y degradación del ADN .....</i>	<i>48</i>
<i>I.6.1.2. Muestras con cantidad de ADN reducido.....</i>	<i>49</i>
<i>I.6.1.3 Amplificación por PCR de ADN degradado y/o en cantidad reducida .....</i>	<i>50</i>
<i>I.6.1.4. Metodología para mejorar el genotipado de muestras con ADN degradado o en cantidad reducida .....</i>	<i>51</i>
<i>I.6.1.5. Herramientas para mejorar el genotipado de muestras con ADN degradado o en cantidad reducida.....</i>	<i>52</i>
I.6.1.5.1. SNPs para identificación de ADN degradado.....	52
I.6.1.5.2. MiniSTRs para identificación de ADN degradado .....	53

<i>I.6.1.6. Grupos de Trabajo Internacionales en relación al análisis de ADN degradado</i>	54
<i>I.6.1.7. Recomendaciones de la EDNAP y el ENFSI sobre la incorporación de los nuevos miniSTRs</i>	55
I.6.2. Desarrollo de multiplexes de miniSTRs de nueva generación	56
<i>I.6.2.1. Estrategias para el desarrollo y validación de miniSTR multiplex</i>	56
<i>I.6.2.2. Sistemas multiplexes de miniSTR autosómicos descritos</i>	56
<i>I.6.2.3. Reacciones de miniSTRs del cromosoma X</i>	58
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>62</b>
<b>II.1. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>62</b>
<b>II.2. OBJETIVOS</b>	<b>63</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>66</b>
<b>III.1. Población de Cantabria: objeto de estudio</b>	<b>66</b>
<b>III.2. Selección de las muestras</b>	<b>67</b>
III.2.1. Muestras control de ADN humano	67
III.2.2. Muestras de la población	67
III.2.3. Muestras de ADN altamente degradado	68
<b>III.3. Extracción de ADN</b>	<b>68</b>
III.3.1. Extracción de ADN a partir de hisopos de saliva	68
III.3.2. Extracción de ADN a partir de bloques de parafina	69
<b>III.4. Cuantificación de ADN</b>	<b>71</b>
III.4.1. Cuantificación de ADN mediante fluorimetría	72
III.4.2. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría	73
<b>III.5. Análisis de STRs del cromosoma X</b>	<b>73</b>
III.5.1. Microsatélites del cromosoma X incluidos en este estudio	73
III.5.2. Amplificación por PCR mediante la reacción decaplex	75
<i>III.5.2.1. Componentes de la reacción</i>	75
<i>III.5.2.2. Protocolo de amplificación</i>	76
<i>III.5.2.3. Condiciones de amplificación</i>	76
III.5.3. Amplificación por PCR mediante la reacción sextaplex	76
<i>III.5.3.1. Componentes de la reacción</i>	77
<i>III.5.3.2. Protocolo de amplificación</i>	77
<i>III.5.3.3. Condiciones de amplificación</i>	78
III.5.4. Análisis de los fragmentos amplificados por electroforesis capilar	78
<i>III.5.4.1. Preparación de la muestra</i>	78

III.5.4.2. Condiciones de análisis.....	78
III.5.4.3. Construcción de la escalera alélica para la reacción sextaplex .....	79
<b>III.6. Desarrollo de una reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X .....</b>	<b>79</b>
III.6.1. Selección y diseño del conjunto de cebadores.....	79
III.6.2. Optimización del conjunto de cebadores.....	84
III.6.3. Optimización de la reacción de amplificación.....	84
III.6.4. Análisis de los fragmentos amplificados por electroforesis capilar.....	85
III.6.5. Construcción de la escalera alélica para la reacción miniX .....	85
<b>III.7. Validación de la reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X .....</b>	<b>86</b>
III.7.1. Estudios de concordancia.....	86
III.7.2. Determinación del porcentaje de alelos tartamudos .....	86
III.7.3. Determinación de la intensidad relativa entre picos heterocigóticos (PHR, <i>Peak Height Ratio</i> ) .....	86
III.7.4. Estudios de sensibilidad .....	87
<b>III.8. Estudio comparativo de la eficacia en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas con miniX con respecto a los métodos decaplex y sextaplex .....</b>	<b>87</b>
<b>III.9. Valoración forense de los STRs del cromosoma X .....</b>	<b>88</b>
III.9.1. Frecuencias alélicas.....	88
III.9.2. Comparación entre las poblaciones de estudio.....	88
III.9.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	88
III.9.4. Análisis del desequilibrio de ligamiento.....	88
III.9.5. Parámetros de eficacia forense .....	88
III.9.6. Estudio de la segregación meiótica.....	90
III.9.7. Frecuencias haplotípicas de los grupos de ligamiento analizados .....	90
III.9.8. Estudio de mutaciones de los X-STRs .....	91
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>93</b>
<b>IV.1. Análisis de STRs del Cromosoma X.....</b>	<b>93</b>
IV.1.1. Análisis de 10 X-STRs mediante reacción decaplex .....	93
IV.1.2. Análisis de 6 X-STRs mediante reacción sextaplex .....	93
<b>IV.2. Desarrollo de una reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X .....</b>	<b>97</b>
IV.2.1. Selección y diseño del conjunto de cebadores.....	97
IV.2.2. Optimización del conjunto de cebadores .....	98
IV.2.3. Optimización de la reacción multiplex.....	99
IV.2.4. Escalera alélica para la reacción miniX .....	101
<b>IV.3. Validación de la reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X .....</b>	<b>102</b>

IV.3.1. Estudios de concordancia.....	102
IV.3.2. Determinación del porcentaje de alelos tartamudos .....	103
IV.3.3. Determinación de la intensidad relativa entre picos heterocigóticos (PHR, <i>Peak Height Ratio</i> ) .....	103
IV.3.4. Estudio de sensibilidad.....	104
<b>IV.4. Estudio comparativo de la eficacia en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas con miniX con respecto a los métodos decaplex y sextaplex .....</b>	<b>105</b>
<b>IV.5. Valoración forense de los STRs del Cromosoma X.....</b>	<b>108</b>
IV.5.1. Frecuencias alélicas .....	108
IV.5.2. Comparación entre las poblaciones de estudio .....	111
IV.5.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	112
IV.5.4. Análisis del desequilibrio de ligamiento .....	112
IV.5.5. Parámetros de eficacia forense .....	115
IV.5.6. Estudio de la segregación meiótica .....	117
IV.5.7. Estudio de los haplotipos de los grupos de ligamiento analizados .....	119
IV.5.8. Estudio de mutaciones de los X-STRs .....	132
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>134</b>
<b>V.1. Reacción decaplex y sextaplex .....</b>	<b>134</b>
<b>V.2. Reacción miniX.....</b>	<b>134</b>
V.2.1. Estudios de concordancia .....	135
V.2.2. Determinación del porcentaje de alelos tartamudos.....	135
V.2.3. Determinación de la intensidad relativa entre picos heterocigóticos, <i>PHR</i> .....	136
V.2.4. Estudio de sensibilidad .....	136
<b>V.3. Estudio comparativo de las estrategias de diseño de los conjuntos de cebadores de la presente invención respecto a los previamente existentes.....</b>	<b>137</b>
<b>V.4. Estudio comparativo de la eficacia en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas con miniX con respecto a las reacciones decaplex y sextaplex .....</b>	<b>139</b>
<b>V.5. Valoración forense de los STRs del cromosoma X .....</b>	<b>140</b>
V.5.1. Frecuencias alélicas y comparación entre las poblaciones de estudio.....	140
V.5.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	140
V.5.3. Estudio de las mutaciones de los X-STRs .....	140
V.5.4. Análisis del desequilibrio de ligamiento .....	140
V.5.5. Parámetros de eficacia forense .....	141
V.5.6. Estudio de la segregación meiótica .....	142
V.5.7. Estudio de los grupos de ligamiento analizados.....	143
<b>V.6. Consideraciones Finales .....</b>	<b>143</b>

<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>146</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>149</b>
<b>VIII. ANEXO: Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis.....</b>	<b>162</b>

# I. INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. GENÉTICA FORENSE: DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS AL ADN

La Genética Forense es la ciencia que se basa en el estudio de la variabilidad genética, como medio de identificación de individuos, para así ser capaz de resolver, entre otros, casos de Investigación Biológica de Parentesco y Criminalística.

El descubrimiento del sistema ABO de los Hematíes por Karl Landsteiner en el año 1900 y la demostración de la transmisión hereditaria de los fenotipos de dicho sistema, por Von Dungern y Hiszfeld en 1910, permitieron llevar a cabo las primeras investigaciones forenses, basadas en los análisis de antígenos eritrocitarios con variantes alélicas y herencia mendeliana simple [1].

Posteriormente, se continuó con el estudio de marcadores genéticos tales como: antígenos eritrocitarios (MNSs, P, y Rh), proteínas plasmáticas (JAYLE Y GILLARD, 1947), enzimas eritrocitarias y leucocitarias, como ACP (HOPKIN-SON, 1963), GPT (CHEN Y GIBLETT, 1971) y el sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) descrito por varios grupos de investigadores (VAN ROOD, TERASAKI y principalmente DAUSSET, 1967) [1].

Pero el inicio de la Genética Forense basado en los análisis de ADN puede ser datado en 1985, cuando Alec Jeffreys descubrió la existencia de unas regiones hipervariables dispersas en el genoma humano, que al ser tratadas con enzimas de restricción, mediante la técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), generaban fragmentos de longitud variable [2]. La diferencia de longitud se debía a que estas regiones estaban constituidas por un determinado número de repeticiones en tándem, el cual variaba de unos individuos a otros. En ese mismo año, Jeffreys describía un método de identificación individual conocido con el nombre de *DNA Fingerprinting* o huella genética [3]. En Abril de ese mismo año, se resolvía satisfactoriamente, en Inglaterra, un caso de inmigración por medio de esta técnica y muy poco después fue aplicada en un homicidio [4, 5].

Por otro lado, el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por parte de Kary B. Mullis en 1985 supuso un gran avance para la Genética Forense. La reacción de PCR consiste en la amplificación *in vitro* de una molécula de ADN millones de veces, permitiendo reducir la cantidad de ADN y el tamaño de fragmentos de ADN molde [6].

Actualmente, la Genética Forense considera al estudio de las regiones variables del ADN como su herramienta principal para la obtención de la información genética individual.

## I.2. ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO

El ADN es la molécula que contiene toda la información genética. El Genoma Humano haploide está formado por  $3 \times 10^9$  pares de bases [7]. Según la función biológica que desempeñe, el ADN se puede clasificar en:

- ADN codificante: está constituido por genes, secuencias ordenadas de nucleótidos en la molécula de ADN, cada uno de los cuales contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas, pero también diferentes tipos de ARN (ARNt, ARNr). Los genes están constituidos por exones e intrones. Los exones son los fragmentos codificantes, mientras que los intrones son los fragmentos que se encuentran separando los exones. El ADN codificante soporta gran presión selectiva, por lo que muestra, en general, una reducida variabilidad de secuencia entre individuos [7- 9].
- ADN no codificante: comprende secuencias de ADN cuya función es en gran parte desconocida, pero que probablemente incluyen zonas con función reguladora [10]. Este tipo de ADN, al no estar sujeto a presión selectiva tan intensa soporta mayores niveles de variación entre individuos, por lo que tiene gran interés en identificación humana [7- 9].

A su vez, el ADN no codificante se puede clasificar en:

- ADN de copia única: formado por secuencias representadas una o muy pocas veces en el genoma [11].
- ADN de copia múltiple: formado por secuencias repetitivas denominadas unidades de repetición, cuyo número de copias de estas unidades varía desde un mínimo de mil veces (ADN moderadamente repetitivo) hasta millones de veces (ADN altamente repetitivo) en el genoma [7- 9]. Se clasifican a su vez, en función de su disposición a lo largo del genoma y del tamaño de la unidad de repetición en dos grupos:
  - ADN repetitivo disperso: las unidades que se repiten aparecen intercaladas o dispersas a lo largo del genoma. Se distinguen los LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*), SINEs (*Short Interspersed Nuclear*

*Elements*) [7], LTR (*Long Terminal Repeats*) [12], y transposones de ADN [13].

- ADN repetitivo en tándem: las unidades que se repiten aparecen agrupadas con una secuencia común de nucleótidos repetida de manera consecutiva. Según el número de nucleótidos que forman las unidades de repetición de estos fragmentos y el número de veces que se repiten estas unidades, podemos distinguir: ADN satélite [14], minisatélites o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) [2] y los microsatélites o STRs (*Short Tandem Repeats*) [15, 16].

Las secuencias satélite son secuencias poco polimórficas entre los individuos, a diferencia de los minisatélites y microsatélites, y se encuentran localizadas en las regiones heterocromáticas de los cromosomas. Estas secuencias aparecen repetidas en tándem entre miles y un millón de veces, con lo que el bloque de repetición puede abarcar cientos de kb o incluso varias Mb. Al organizarse de un modo tan complejo, es difícil su aplicación en Genética Forense.

### **I.3. ADN MINISATÉLITE EN GENÉTICA FORENSE**

Los minisatélites o VNTR son polimorfismos formados por la repetición en tándem de una secuencia un número variable de veces. El rango de longitud es de aproximadamente 8-100 pares de bases (pb). Se localizan mayoritariamente en las regiones subtelo méricas de los cromosomas, estando, en muchos de los casos, implicados en la replicación de la región terminal [17].

El interés de los marcadores minisatélites en Genética Forense radica en que poseen un alto grado de variabilidad, convirtiéndolos en una herramienta útil en los estudios de identificación genética. Sin embargo, presenta importantes limitaciones en el análisis de muestras con poca cantidad de ADN o ADN degradado [18].

Los primeros análisis de los minisatélites se basaron en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción y posterior hibridación con varias sondas específicas marcadas [2]. Las sondas denominadas multilocus (MLPs, *Multi Locus Probes*) reconocen un núcleo común de 10-15 pb compartido por varios minisatélites. Su posterior detección por la técnica *Southern Blot* permite revelar un patrón multibanda resultante de los fragmentos de restricción polimórficos en longitud (RFLP) que se conoce como "Huella Genética" (*DNA fingerprint*) [3]. La principal ventaja es que estos polimorfismos poseen un alto poder de discriminación. Sin

embargo, se requieren grandes cantidades de ADN, poco habitual en muestras forenses debido a su escasez y/o degradación. Además, el mayor inconveniente de esta técnica es que en análisis forenses puede generar patrones de difícil interpretación, como resultado de mezclas que contienen las muestras de ADN procedentes de distintas personas implicadas en el caso [17].

Posteriormente, comenzó el análisis de minisatélites mediante la hibridación con las denominadas sondas unilocus (*SLPs, Single Locus Probes*). Estas sondas se unen específicamente a un locus, a diferencia de las MLPs que se unían a varios loci minisatélites, dando lugar a un patrón de una o dos bandas, que corresponden a los alelos del minisatélite de cada individuo. El desarrollo de las sondas SLPs facilitó la interpretación de la prueba, aumentó la sensibilidad y mejoró la eficacia en el análisis de mezclas [19].

Asimismo, el desarrollo de la PCR aumentó significativamente la sensibilidad de los análisis de ADN. Esta técnica en la actualidad representa la base del genotipado de ADN.

Uno de los primeros sistemas amplificados por PCR con fin identificativo fue el locus HLA-DQA1, localizado en una región del sistema HLA [20]. Posteriormente, el locus D1S80, localizado en el cromosoma 1, se convirtió en el minisatélite más empleado debido a su elevada heterocigosidad [19, 21].

En general, la aplicación de minisatélites en el campo de la Genética Forense presenta una serie de limitaciones. Requiere al menos 50 nanogramos (ng) de ADN molde, por lo que no es aplicable a muestras de ADN escaso o degradado. Igualmente, es un proceso laborioso y el tiempo de análisis es prolongado [22].

Las limitaciones que presentaban los minisatélites se superaron a principios de la década de los 90 con el descubrimiento de los microsatélites y la tecnología de secuenciación automática, lo que condujo a que a partir de este momento el ADN microsatélite se convirtiera en la herramienta básica de identificación de los laboratorios de Genética Forense.

#### **I.4. ADN MICROSATÉLITE EN GENÉTICA FORENSE**

Los microsatélites o STRs son polimorfismos compuestos por unidades de repetición de 2-7 pb repetidas en tándem 3-50 veces, distribuidos ampliamente en el genoma en secuencias de longitudes menores en general a 400 pb [23].

El tamaño de los alelos de los STRs (~100-400 pb) permite la posibilidad de realizar la amplificación por PCR de estas regiones en una reacción multiplex. De esta manera, se posibilita el análisis simultáneo de un número elevado de loci en un rango estrecho de tamaños, lo que disminuye la amplificación preferencial de los alelos de menor tamaño [17, 23]. Asimismo, se facilita la estandarización de los resultados obtenidos [24, 25]. Además, cabe destacar que la cantidad de material genético necesaria para conseguir un perfil genético completo se encuentra entre ~100 picogramos (pg) y 1ng de ADN molde [26].

##### **I.4.1. Clasificación de los STRs**

Las secuencias de STRs pueden variar en el tamaño de la unidad de repetición, en el número de veces que se repite la unidad/es y en las características del patrón de repetición.

Dependiendo del número de pares de bases que constituya la unidad de repetición, podemos diferenciar STRs dinucleotídicos, trinucleotídicos, tetranucleotídicos, pentanucleotídicos, o hexanucleotídicos con 2, 3, 4, 5, o 6 pb respectivamente.

En cuanto al patrón de repetición los STRs, se clasifican en: STRs simples, compuestos por repeticiones con unidades idénticas en longitud y secuencia; STRs compuestos, con dos o más tipos de unidades de repetición; STRs complejos, compuestos por varios bloques de unidades de repetición de longitud variable e intercaladas con otras secuencias variables [27] ; y STRs hipervariables compuestos, los cuales poseen alelos no consenso que van a diferir tanto en la secuencia como en el tamaño, ofreciendo dificultades en cuanto a su nomenclatura [28].

Estos polimorfismos se pueden encontrar tanto en los cromosomas autosómicos, como en los cromosomas sexuales X e Y.

##### **I.4.2. Criterios de selección de los STRs**

Entre los criterios de selección de los microsatélites o STRs con aplicación en los análisis de identificación humana y relaciones de parentesco destacamos los siguientes:

- *Elevado poder de discriminación y heterocigosidad*: El poder de discriminación (PD) determina la capacidad de dicho marcador o conjunto de marcadores para diferenciar genéticamente a individuos no relacionados tomados al azar. La heterocigosidad (HET) es la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomado al azar de la población sean distintos. Cuanto mayores sean estos valores, mayor será la capacidad de identificación de este marcador, siendo aconsejable un poder de discriminación no inferior al 90% y una heterocigosidad superior al 70% [29].
- *Localización cromosómica diferente*: uno de los requisitos es que se asegure una selección de loci que segreguen independientemente y no como grupo de ligamiento, de tal manera que se pueda aplicar la regla del producto en los cálculos estadísticos de probabilidad de coincidencia al azar [30]. Para ello, se buscan loci que se encuentren en distintos cromosomas o distantes entre sí en el mismo cromosoma.
- *Baja tasa de mutación*: juega un papel importante en los casos de investigación biológica de parentesco, debido a que estas mutaciones pueden provocar la interpretación de falsas exclusiones. En los casos de criminalística, este criterio no es tan importante, puesto que las mutaciones tienen lugar en las células germinales y son mantenidas durante toda la vida del individuo [30, 31].
- *Bajo porcentaje de bandas tartamudas*: El deslizamiento de la ADN polimerasa (en inglés, *replication slippage*), es el responsable de que se generen bandas tartamudas (en inglés, *stutter bands*), que van a ser productos alélicos que se diferencian del alelo asociado tan sólo por una unidad de repetición. La producción de bandas tartamudas supone una desventaja para la correcta interpretación de los análisis de mezclas, ya que estos picos pueden confundirse con alelos reales. La altura de estos picos es normalmente inferior a un 10-15% de la altura del pico del alelo real [32]. La aparición de estos artefactos se produce con mayor frecuencia en los STRs con unidades de repetición más cortas, como los dinucleótidos y trinucleótidos, y con una menor frecuencia en las unidades de repetición más largas, como los pentanucleótidos y hexanucleótidos, por otra parte menos frecuentes en el genoma.
- *Rango alélico reducido*: se aconseja que los tamaños de los alelos estén comprendidos entre 90-500 pb, para asegurar buenos resultados en muestras con ADN degradado [30].

Cabe señalar que las repeticiones tetranucleótidas son las que más se ajustan a estas características y de esta manera son las más utilizadas en Genética Forense.

### **I.4.3. Nomenclatura de los STRs**

La ISFG (Sociedad Internacional de Genética Forense) desarrolló una nomenclatura común para la designación de los alelos de los STRs [33], con el objetivo de estandarizar los resultados de perfiles genéticos y así posibilitar la comparación de datos entre los diferentes laboratorios. En primer lugar, se recomendó que la secuencia fuese leída en dirección 5´-3´. Para evitar confusiones a la hora de qué hebra elegir, se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Para STRs situados en genes codificantes de proteínas (como en intrones), se debe utilizar la hebra codificante. Un ejemplo donde se puede aplicar esto es en el microsatélite VWA (GenBank: M25858).
- Para secuencias repetitivas sin ninguna conexión con genes codificantes de proteínas, como muchos de los loci D#S#, la secuencia originalmente descrita en la literatura, o la publicada en primer lugar en base de datos (preferentemente GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se convierte en la referencia estándar de nomenclatura. Como ejemplo D21S11 (GeneBank: M84567).
- En los casos en los que la nomenclatura esté ya establecida en el campo forense de forma previa, será mantenida para evitar confusiones innecesarias.

En segundo lugar, se consideró como la unidad de repetición de un locus STR, a la primera secuencia repetitiva de nucleótidos a partir del extremo 5´.

Y por último, la designación de alelos se llevó a cabo según el número de unidades de repetición completas. Cuando algún microsatélite tenga una unidad de repetición incompleta, se designará, en primer lugar, el número de unidades de repetición completas. A continuación, separándolas por un punto, el número de pares de bases de la unidad de repetición incompleta [28].

Como referencia para la designación de alelos, se utilizan las escaleras alélicas (en inglés, *allelic ladder*). Una escalera alélica es una mezcla artificial de todos los alelos comunes presentes en las poblaciones humanas para un marcador STR en particular. Todos los alelos contenidos en la escalera alélica deben ser secuenciados y nominados de acuerdo con las reglas usadas para STRs, y deben ser preparados con el mismo cebador de las muestras analizadas. De esta

manera, las escaleras alélicas son generadas por combinación, bien de ADN genómico o bien de productos de PCR específicos para cada locus, y pueden ser construidas en el laboratorio u obtenidas comercialmente [33].

#### **I.4.4. Mutaciones de los STRs**

El patrón de mutación de los microsatélites es producido, en la mayoría de los casos, por alteraciones en su longitud, producidas por la ganancia o pérdida de unidades de repetición.

El principal mecanismo que conduce a este cambio en la longitud es el deslizamiento de la enzima ADN polimerasa, lo que hace que el alelo correspondiente gane o pierda una o varias repeticiones en tándem, siendo las más frecuentes las inserciones o deleciones de una sola unidad de repetición. La tasa de mutación de los microsatélites autosómicos y del cromosoma Y oscila entre  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  por locus y por generación [34, 35].

La probabilidad de que se produzca mutación se relaciona con la estructura y la longitud de las unidades de repetición. Por un lado, las repeticiones homogéneas son más susceptibles a sufrir mutaciones que las repeticiones irregulares intercaladas. Por otro lado, los alelos con mayor número de repeticiones tienden a mutar con una frecuencia mayor. Además, las mutaciones son mayores en la línea paterna que en la materna. Esta diferencia se asocia al número y tipos de divisiones celulares que se llevan a cabo durante la gametogénesis [35].

#### **I.4.5. Bases de datos y Grupos de Trabajo Internacionales de los STRs**

Las bases de datos surgen ante la necesidad de la comparación automatizada a gran velocidad de perfiles de ADN para resolver investigaciones criminales. Se caracterizan por incluir un núcleo universal común de 7 loci STRs (FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51 y D21S11). La primera base de datos de STRs autosómicos surgió en Reino Unido en 1995, la NDNAD (*National DNA Database*), que originalmente almacenó los datos de 6 STRs (FGA, TH01, VWA, D8S1179, D18S51 y D21S11). La base de datos de Austria, Alemania y Países Bajos, fue introducida en 1998, e incluyen los 6 STRs anteriormente citados. En 1999 se amplió el número a 10 STRs de la base de datos de Reino Unido, que incluyó los STRs D3S1358, D16S539, D2S1338, y D19S433. En la actualidad la base de datos de Alemania, la GCL (*German Core Loci*) incluye los STRs: D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, VWA, TH01, FGA, y el loci SE33 [36].

El FBI (*Federal Bureau of Investigation*) propuso en Norte América una base de datos denominada CODIS (*Combined DNA Index System*) que incluye un total de 13 STRs (FGA, TH01,

VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, D16S539, D13S317, CSF1PO, TPOX, D7S820 y D5S818) [36].

También es bien conocida la base de datos de la Organización Internacional de Policía (Interpol), denominada ISSL (*Interpol Standard Set of Loci*), la cual, está constituida por el núcleo de 7 STRs (FGA, TH01, VWA, D3S1358, D8S1179, D18S51 y D21S11).

Además se extendieron las bases de datos europeas (ESS, *Extended European Standard Set*) con la inclusión de alelos de STRs D12S391, D1S1656, D2S441, D10S1248 y D22S1045.

Los STRs incluidos en cada base de datos se encuentran resumidos en la página web <http://www.cstl.nist.gov/strbase/coreSTRs.htm>.

Muchos países europeos acordaron cooperar en la investigación de la delincuencia transfronteriza, la lucha contra el terrorismo y la inmigración ilegal mediante el Tratado de Prüm. Este tratado tiene como objetivo compartir la información incluida en las distintas bases de datos [37].

La YHRD (*Y Chromosome Haplotype Reference Database*, [www.yhrd.org](http://www.yhrd.org)) es una base de datos que almacena los haplotipos del cromosoma Y. En un principio contenían los 8 Y-STRs que constituyen el haplotipo mínimo (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385ab) [38]. Este haplotipo ha sido aumentado con la incorporación de otros polimorfismos del cromosoma Y (DYS438, DYS439, DYS437, DYS460, GATA A10, DYS461, DYS635, GATAH4) con el objetivo de aumentar el poder de discriminación en las investigaciones forenses [39].

Ante la necesidad de una continua revisión, introducción, validación y mejora de las técnicas de obtención de perfiles genéticos, existen Grupos de Trabajo Internacionales como el EDNAP (*European DNA Profiling Group*, <http://www.isfg.org/ednap/ednap.htm>) y el ENFSI (*Network of Forensic Science Institute*, [www.enfsi.eu](http://www.enfsi.eu)), así como nacionales, como el NIST (*National Institute of Standards and Technology*, <http://www.nist.gov>). Mediante ejercicios colaborativos, promueven el intercambio de información para fomentar la estandarización y reproducibilidad de las nuevas tecnologías y metodologías en el campo forense.

#### **I.4.6. Métodos de análisis de los STRs**

Gracias al progreso en Biología Molecular se ha producido un gran avance en los métodos de análisis de STRs en los laboratorios de Genética Forense.

La utilización de la técnica PCR multiplex, que permite amplificar varias secuencias específicas de ADN simultáneamente, ha permitido incrementar y mejorar los procedimientos para la obtención de perfiles genéticos de ADN. Esta técnica, además de proporcionar la información de varios loci en una sola reacción, presenta la ventaja de utilizar menor cantidad de ADN y de reactivos, disminuyendo de esta manera el tiempo de análisis [40]. Una reacción multiplex consiste en combinar en una única reacción todos los pares de cebadores de los STRs que queremos amplificar simultáneamente, junto con el resto de reactivos de la reacción. La PCR multiplex posee la resolución suficiente como para distinguir alelos del STR que se diferencien incluso en una sola base (ej., los alelos 9.3 y 10 del STR TH01) [17].

Los productos de PCR pueden ser detectados por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida (electroforesis convencional), o bien, a través de un capilar relleno de polímero (electroforesis capilar) [41].

Los geles de agarosa y poliacrilamida se diferencian en el grado de resolución. Los geles de agarosa permiten separar fragmentos grandes, desde 200 pb hasta 50 kb, y los de poliacrilamida permiten separar moléculas de ADN pequeñas (5-500 pb), que difieren en tamaño en apenas 1 pb. Son éstos, por tanto, al poseer mayor grado de resolución, los que van a permitir separar los alelos de los microsatélites [42, 43].

La electroforesis capilar presenta mayor eficacia, en comparación con la electroforesis convencional, al permitir la inyección, separación y detección de los fragmentos de un número alto de muestras de una manera totalmente automatizada. El uso de capilares presenta diversas ventajas: no es necesaria la utilización de un gel soporte como medio; la disipación de calor es muy efectiva, lo que permite la aplicación de voltajes mayores en la electroforesis, que se traduce en una reducción del tiempo de análisis y una mayor resolución [41].

Las muestras se van a procesar de una en una, con lo que junto a cada muestra se cargará un patrón interno, denominado estándar interno, que contiene fragmentos de ADN de tamaños conocidos. En la actualidad, con la aparición de equipos con múltiples capilares se pueden cargar desde 1 muestra, hasta 96 muestras en paralelo [44- 46].

Estos equipos van a detectar los fragmentos a través de un láser de argón, con lo que es necesario que los productos amplificados estén marcados con diferentes fluorocromos. En el genotipado de loci STRs este marcaje se va a realizar en el extremo 5' del cebador directo o inverso. Esta técnica, por lo tanto, permite la separación de los fragmentos en función de su

tamaño, registrando tanto la fluorescencia emitida por el cebador de cada amplicón, como el tamaño de cada uno de los fragmentos y del estándar interno [46].

Una vez que se han identificado los picos y colores de los fragmentos, es el programa informático el que se va a encargar, mediante la realización de un cálculo de regresión y en base al tiempo de migración de los fragmentos del estándar interno, de determinar el tamaño en pares de bases de cada alelo [46].

## **I.5. ADN MICROSATÉLITE DEL CROMOSOMA X EN GENÉTICA FORENSE**

### **I.5.1. De la Genética Clínica a la Genética Forense**

La experiencia acumulada en el análisis molecular de enfermedades ligadas al sexo mediante estudios de marcadores del cromosoma X en Genética Clínica, ha promovido que los laboratorios de Genética Forense comiencen a utilizar estos marcadores para identificación de individuos.

Estos análisis se basan en el hecho de que los hombres transmiten una copia del cromosoma X, en ausencia prácticamente de recombinación, a todos sus descendientes femeninos, por lo que, si éste sufre enfermedades genéticas, tales como la hemofilia, la distrofia muscular de Duchenne, la deficiencia en G6PD (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) o daltonismo, todas sus hijas y algunos de los miembros varones de la siguiente generación, al tratarse de enfermedades ligadas al sexo, heredarán el gen defectuoso localizado en el cromosoma X [47].

Este contexto puede ser extrapolado a la Genética Forense y explicaría la utilidad del estudio de los microsatélites localizados en el cromosoma X, en casos complejos de análisis de parentesco que no pueden resolverse con el estudio de marcadores genéticos autosómicos y del cromosoma Y. Así, el estudio de microsatélites del cromosoma X posee un interés especial en situaciones en las que el padre no está disponible y se trate de descendencia femenina [47, 48].

En la década de los 90, se describieron dos microsatélites del cromosoma X, HPRTB y ARA [49-51], de cuyo estudio se dedujeron las primeras fórmulas para realizar los cálculos estadísticos correspondientes de los STRs del cromosoma X de interés forense [51, 52]. Poco después, los STRs DXS6807 [53], DXS9898 [54], DXS10011 [55], DXS101 [56] y DXS6789 [57] se añadieron a la lista de microsatélites del cromosoma X útiles en Genética Forense.

A partir de este momento comenzó el interés por desarrollar reacciones multiplex que permitiesen el análisis simultáneo de varios microsatélites del cromosoma X. Con este propósito, en el año 2002, nuestro laboratorio desarrolló una multiplex constituida por 2 STRs (DXS7423 y DXS8377) [58], y en ese mismo año otra multiplex formada por 5 microsatélites (HPRTB, DXS101, ARA, DXS7423 y DXS8377) [59].

Otro de los desafíos de la Genética Forense fue la investigación de grupos de STRs que se localizasen lo suficientemente cerca entre sí en el cromosoma X para heredarse en bloque como haplotipos, y de esta forma reconstruir pedigríes familiares [47, 48]. Fue el grupo de R. Szibor *et al.* [60] el que describió, en el año 2002, el primer grupo de ligamiento del cromosoma X, DXS7424-DXS101, con haplotipos estables de generación en generación, dentro de una misma familia.

### **1.5.2. Características del cromosoma X**

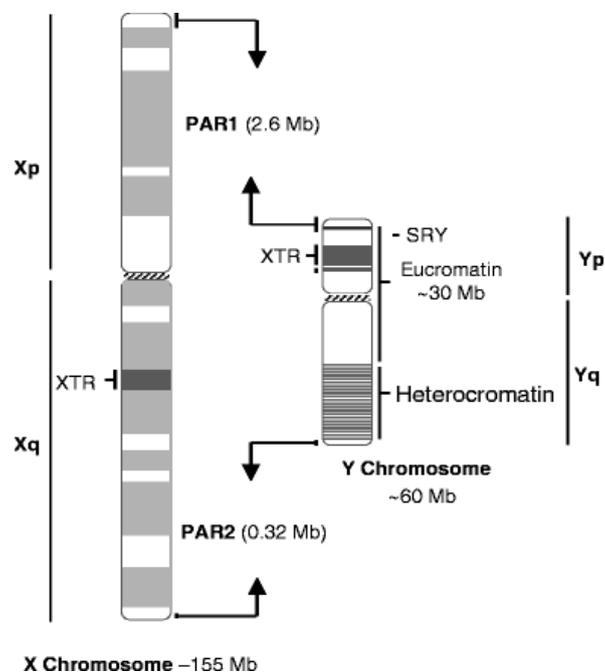
El cromosoma X es de tamaño mediano y submetacéntrico, abarca 155 Mb y representa el 5% del total del material genético de las células. Es un cromosoma muy activo que contiene aproximadamente del orden de 1100 genes. Tan sólo un 1,7% de este cromosoma codifica para proteínas funcionales, presentando un elevado contenido de ADN no codificante repetitivo [61].

Mientras que los hombres son individuos hemicigóticos para el cromosoma X, al poseer una sola copia de este cromosoma, las mujeres contienen dos cromosomas X homólogos. De acuerdo con la hipótesis de Lyon, en cada célula somática femenina, uno de los dos cromosomas X se silencia en una fase temprana del desarrollo y es genéticamente inactivo. Esto explica, en primer lugar, la compensación de la dosis de productos genéticos ligados al cromosoma X entre hombres y mujeres, y, en segundo lugar, por qué las monosomías, trisomías y polisomías del cromosoma X son compatibles con la vida de los individuos [62].

El cromosoma X inactivo se reactivará sólo en las células germinales de las mujeres, por lo tanto solamente entre los cromosomas X homólogos de las mismas se va a producir recombinación meiótica. Las madres transmitirán tanto a sus descendientes masculinos como femeninos, bien una copia exacta de uno de sus cromosomas X, o bien, un cromosoma recombinante, producto de la recombinación homóloga entre los dos cromosomas maternos [63].

En los hombres, el cromosoma X está exento de recombinación en la mayor parte de su longitud, a excepción de las zonas pseudoautosómicas PAR1, situada en el extremo del brazo corto, de 2,6 Mb de longitud, y PAR2, situada en el extremo del brazo largo, de 320 Kb de longitud. Estas regiones contienen 14 genes y 4 genes, respectivamente, y recombinan con sus regiones homólogas situadas en los extremos del cromosoma Y (Figura 1). Los padres transmitirán prácticamente sin recombinación, el cromosoma Y a sus hijos, y el cromosoma X a todas sus hijas. De esta manera, todos los hermanos comparten el alelo del cromosoma Y, y todas las hermanas al menos un alelo por cada marcador del cromosoma X, a no ser que ocurra una mutación [63- 65].

Figura 1. Representación esquemática de las regiones pseudoautosómicas PAR1 y PAR2 de los cromosomas sexuales X e Y [65].



### **I.5.3. Importancia del estudio de los microsatélites del cromosoma X en la práctica forense**

Los microsatélites localizados en el cromosoma X se consideran una herramienta útil en Genética Forense ya que nos ofrecen el potencial necesario cuando el análisis de los marcadores autosómicos y del cromosoma Y es insuficiente, especialmente en casos complejos de parentesco [48, 65, 66]. El hecho de que los padres transmitan una copia entera del cromosoma X en ausencia de recombinación, excepto en regiones pseudoautosómicas, a todos sus descendientes femeninos, nos permite determinar su haplotipo directamente. Esta

característica permite exclusiones de paternidad, si el presunto padre no está disponible, y si se trata de descendencia femenina, ya que las dos presuntas hermanas o hermanastras de padre deberán compartir al menos un alelo de cada locus del cromosoma X [59, 66-70]. Además los STRs del cromosoma X son útiles para confirmar otro tipo de parentesco más distante, como es el caso de abuela paterna y nieta, ya que ésta comparte al menos un alelo idéntico del STR estudiado con su abuela [66].

Esta facilidad de haplotipaje implica por tanto que el cromosoma X entero pueda ser trazado a través de grandes pedigrees. Podemos resumir por tanto [71]:

- El tipaje del cromosoma X en varones revela directamente su haplotipo.
- Los varones transmiten el cromosoma X entero a sus hijas, con lo que el haplotipo del cromosoma X paterno puede ser detectado en sus hijas.
- Todas las hermanas comparten el haplotipo del cromosoma X paterno. Por tanto, los alelos del cromosoma X no compartidos por hermanas deben de ser de origen materno.
- El tipaje del cromosoma X de 2 o más hermanas revela en ambas el haplotipo del cromosoma X del padre y alelos presentes en los cromosomas X de la madre.
- En los dos casos anteriores, se puede revelar el haplotipo materno, solamente cuando no se produzca recombinación entre sus cromosomas X homólogos.
- Los haplotipos de grupos de microsatélites que se heredan en bloque continúan sin variación en los alelos de sus loci a través de varias generaciones. Como resultado, éstos son una herramienta potente para estudiar grados más distantes de parentesco.

#### **I.5.4. Parámetros estadísticos de interés en Genética Forense**

Cuando se estudia la variabilidad en la distribución de los polimorfismos de ADN, a menudo se suelen observar características específicas para cada grupo poblacional. Es muy importante, por ello, conocer una serie de parámetros estadísticos, los cuales miden la eficacia forense de los marcadores genéticos analizados y con los que se van a sustentar los cálculos de probabilidades en las pericias forenses.

*Frecuencia alélica o génica:* La proporción relativa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en una población dada. Se expresa en tanto

por ciento o en tanto por mil, y se calcula dividiendo el recuento de cada alelo por el número total de alelos analizados [17].

Frecuencia genotípica: Es la proporción relativa de un genotipo en una población dada. Se define como genotipo a la constitución de alelos para un marcador genético específico [17].

Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW):

Según esta ley, en una población de tamaño lo suficientemente grande (para que se transmita una muestra grande de gametos y así se incremente la probabilidad de que las frecuencias alélicas representen fielmente a la población), panmíctica (todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse siendo este apareamiento al azar), y sin procesos de selección, mutación o migración, las frecuencias alélicas o génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. Esta ley postula, en primer lugar, que las frecuencias alélicas en un locus no cambian de una generación a otra (equilibrio de las frecuencias alélicas); en segundo lugar, que las frecuencias genotípicas están determinadas de manera predecible por las frecuencias alélicas (equilibrio de las frecuencias genotípicas); y en último lugar, que el equilibrio es neutro, con lo que si se perturba la población en equilibrio, éste se restablecerá en una sola generación de apareamiento al azar con nuevas frecuencias alélicas y si todos los requisitos restantes se mantienen.

Como las poblaciones naturales difícilmente se encuentran en equilibrio estricto, hay que determinar si las desviaciones observadas en la muestra pueden atribuirse al azar o por procesos de mutación, selección, migración, que estén desviando la población de la situación de equilibrio [17].

Índice de Homocigosidad (h): Puede ser definida como la fracción de individuos homocigóticos para un determinado locus en el total de la población [72].

$$h = \frac{n_i}{N_i}$$

donde  $n_i$  = número de individuos homocigóticos analizados  
 $N_i$  = número total de genotipos analizados

Índice de Heterocigosidad (HET):

Representa la probabilidad de que dos alelos del mismo locus tomados al azar de la población sean distintos. La heterocigosidad observada para un locus se define como el número de individuos heterocigóticos observados, respecto al total analizado, y la heterocigosidad

esperada es la proporción de heterocigóticos que se esperaría encontrar si la población se encontrase en equilibrio de Hardy-Weinberg. Cuando el número de loci no es elevado, ni están elegidos al azar, este valor no es indicativo de la variabilidad real, aunque tienen validez para conocer la estructura de la población y realizar comparaciones con otras poblaciones [72].

La heterocigosidad observada ( $HET_{obs}$ ) es calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$HET_{obs} = \frac{n_i}{N_i}$$

donde  $n_i$  = número de individuos heterocigóticos analizados  
 $N_i$  = número total de genotipos analizados

Y la heterocigosidad esperada ( $HET_{esp}$ ) de acuerdo con la fórmula:

$$HET_{esp} = 1 - \sum p_i^2$$

donde  $p_i$  = frecuencia génica del alelo  $i$  de un locus para varios alelos en la población

#### Poder de Discriminación (PD):

El poder de discriminación (PD), determina la probabilidad de que un marcador o conjunto de marcadores sean capaces de diferenciar genéticamente a individuos no relacionados tomados al azar. El valor del PD de cada marcador localizado en el cromosoma X difiere entre hombres y mujeres. En el caso de muestras pertenecientes a mujeres, con la utilización de microsatélites del cromosoma X se puede conseguir un rendimiento similar que en el caso de utilizar marcadores autosómicos, pero en el caso de muestras pertenecientes a hombres, el valor PD obtenido será más bajo, debido a que sólo se utiliza un alelo por cada STR usado [47, 51].

El PD en mujeres y en hombres se calcula de la siguiente manera:

$$PD_{mujeres} = 1 - 2(\sum p_i^2) + \sum p_i^4$$

$$PD_{hombres} = 1 - \sum p_i^2$$

siendo  $p_i$  la frecuencia del alelo  $i$  en una población de  $n$  muestras

El contenido de información polimórfica (PIC):

Mide la capacidad discriminadora de los loci. Su valor depende del número de alelos y de la distribución de frecuencias. Valores mayores de 0,5 son muy informativos, entre 0,25- 0,5 medianamente informativos y menores de 0,25 poco informativos [73].

$$PIC = 1 - (\sum p_i^2) - \sum \sum 2p_i^2 \cdot p_j^2$$

donde  $p_i$  = frecuencia del alelo  $i$  para el locus estudiado  
 $p_j$  = frecuencia del alelo  $(i+1)$

La probabilidad de exclusión (MEC):

Se define como la probabilidad de que un marcador genético conduzca a la exclusión de un sospechoso. Para los marcadores del cromosoma X, este parámetro es relevante en ausencia de padre cuando se dispone en su lugar de la abuela paterna, en casos que implican la investigación de una hija como en tríos padre/madre/hija, y en dúos familiares padre/hija en ausencia de la madre. También en test de maternidad que involucre a dúos madre/hijo [48].

Este parámetro para microsatélites del cromosoma X se calcula usando las siguientes fórmulas:

- Cuando la madre y la hija son tipadas (padre-madre-hija):

$$MEC_{\text{trío}} = 1 - \sum p_i^2 + \sum p_i^4 - (\sum p_i^2)^2$$

- Cuando sólo la hija es tipada y no la madre (padre-hija):

$$MEC_{\text{dúo}} = 1 - 2(\sum p_i^2) + \sum p_i^3$$

siendo  $p_i$  la frecuencia del alelo  $i$  en una población de  $n$  muestras

**I.5.5. Mutación en microsatélites del cromosoma X**

Uno de los requisitos que deben cumplir los microsatélites para su utilización en las investigaciones de parentesco, es poseer una baja tasa de mutación, en un rango entre  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  por locus y por generación [35]. Hasta el momento, se ha podido observar una tasa de mutación similar a la de los cromosomas autosómicos y a la del cromosoma Y ( $2,09 \times 10^{-3}$  por meiosis). Este valor está influenciado por la estructura y la longitud de la unidad de repetición del STR analizado [35, 48, 50].

### **I.5.6. Aplicaciones de los STRs del cromosoma X en Genética Forense**

Los análisis de microsatélites del cromosoma X van a ser útiles tanto para resolver casos forenses de identificación, como para determinar la existencia de parentesco biológico, básicamente en paternidades en ausencia de algún miembro familiar, como puede ser casos en los que faltan uno o ambos progenitores, pero existen abuelos y tíos.

En lo que se refiere al análisis de indicios biológicos, los estudios de microsatélites del cromosoma X resultarán especialmente útiles, e incluso más eficaces que los estudios de microsatélites autosómicos, cuando se trate de identificar un perfil de una muestra femenina en una evidencia que contenga una mezcla de ADN masculino y femenino. Serán útiles para resolver casos criminales, por ejemplo, en la demostración de células de la piel o células vaginales femeninas en el agresor [47, 48]. En este caso, los alelos de los marcadores del cromosoma X de la muestra femenina, pueden ser completamente enmascarados por los alelos de la muestra masculina solamente si la mujer es homocigótica y coincidente en todos los loci con el hombre, suceso poco probable.

En lo referente al análisis de parentesco, la principal ventaja que presenta el estudio de los STRs localizados en el cromosoma X, está basada en su gran utilidad para resolver casos de parentesco en los que la información proporcionada por el estudio de los marcadores autosómicos utilizados en rutina es limitada o insuficiente, como puede ser [47, 48, 65]:

- En determinación de parentescos (dúos o tríos) cuando la descendencia es femenina pues el poder de exclusión para los X-STRs es más alto que el obtenido para loci autosómicos [48, 65]. De esta manera, el análisis de loci localizados en el cromosoma X permite resolver los casos en los que entre los resultados obtenidos por el análisis de microsatélites autosómicos, se observan 1-3 incompatibilidades entre padre e hija del total de 15-17 STRs analizados. En estos casos, las exclusiones detectadas sólo pueden explicarse por dos motivos, bien porque ha ocurrido una mutación de padre a hija, o bien, porque el presunto padre es un pariente cercano a la hija tipada.
- En casos de parentesco con descendencia femenina cuando los dos supuestos padres son parientes de primer grado, por ejemplo padre e hijo. En tales casos, los X-STRs son altamente informativos debido a que el padre y el hijo no comparten alelos idénticos de los marcadores del cromosoma X por descendencia, debido a que el hijo los hereda del cromosoma X de su madre.

- En pruebas de paternidad padre/hija con interrupción del embarazo. En estos casos, es el material obtenido del feto el que va a ser sometido a la prueba. En la mayor parte de las veces, este material va a ser contaminado con el ADN de la madre, por lo que si este feto es de sexo femenino, el estudio de los marcadores del cromosoma X puede servir de complemento de los autosómicos, presentando un poder de exclusión *a priori* mayor e incrementando el potencial del análisis.
- En la investigación de casos de incestos padre-hija los microsatélites del cromosoma X serían más resolutivos que los autosómicos, ya que, en los casos en los que la hija se queda embarazada del mismo padre, el tipaje de su descendencia femenina no mostraría ningún alelo adicional de los STRs del cromosoma X hallados en la hija.
- En pruebas de maternidad madre/hijo, el estudio de estos marcadores incrementan el poder de exclusión obtenido por marcadores autosómicos, como sucede en pruebas de padre/hija. Estos análisis son frecuentes cuando se identifican restos humanos a partir del tipaje de los familiares de las víctimas. Además tales pruebas han comenzado a tener mayor importancia desde que la sociedad ha empezado a registrar un número importante de paternidades ilegítimas.
- En pruebas de parentesco, donde el padre no está disponible para el análisis y, como consecuencia, es necesario tipar a los parientes cercanos. Tales casos se presentan cuando los individuos requieran una prueba de afiliación del difunto padre por motivo de herencia, o simplemente por necesitar responder a la pregunta de quién es su ancestro común. El tipaje de familiares es muy importante en ciertos contextos tales como guerras, desastres de masas y casos de migraciones. En estas circunstancias los X-STRs son de gran relevancia y pueden, en algunas ocasiones, ser más eficaces que los microsatélites autosómicos. Un ejemplo es cuando se trata de dos hermanas o hermanastras que cuestionan su parentesco, ya que ambas compartirán al menos un alelo del X-STR. En estos casos, únicamente el análisis de marcadores del cromosoma X pueden permitir la exclusión de parentesco sin necesidad de tipar a otros parientes cercanos. La clave para resolver este tipo de casos es tipar, si fuera posible, a la abuela paterna, ya que investigándola a ella, pueden ser determinados todos los alelos del cromosoma X del presunto padre. De hecho, cuando la abuela paterna es tipada, este tipo de casos no se consideran incompletos. Reconstruir el genotipo de la abuela es posible en los casos en los que haya varios hijos disponibles para el estudio y además,

que éstos hayan heredado diferentes alelos. De esta manera, si los hermanos del presunto padre tienen diferentes alelos para un determinado locus, significa que la madre es heterocigótica para ese locus. Por otro lado, si los hermanos presentan alelos idénticos, la madre puede ser homocigótica o heterocigótica para dicho locus.

Una de las limitaciones de los análisis de los marcadores de cromosoma X es que en algunos casos de parentesco como puede ser padre-hija, en los que existe más de un varón en la familia, en ocasiones sólo podemos deducir que el supuesto padre pertenece a ese linaje, debido a que el haplotipo del cromosoma X puede ser compartido por alguno de sus familiares. Además, no siempre se puede reconstruir el perfil a través del tipaje de familiares cercanos. Este aspecto va a depender tanto de los familiares que estén disponibles, como de que posean entre ellos alelos iguales o diferentes para un determinado X-STR.

La presencia de anomalías como el Síndrome de Turner (X0) [74], el Síndrome de Klinefelter (XXY) [75], u otras como la feminización testicular [76], afecta a la capacidad de determinar relaciones de parentesco mediante el análisis de X-STRs [47, 48].

### **1.5.7. Ligamiento y desequilibrio de ligamiento en el cromosoma X**

Los análisis simultáneos de microsatélites localizados en el mismo cromosoma requieren saber la localización exacta de cada marcador respecto al resto, ya que estos marcadores pueden recombinar durante la meiosis con una frecuencia que corresponde a la distancia genética entre ellos [77].

Debido a que los hombres son hemicigóticos para el cromosoma X, en los análisis de los STRs del cromosoma X, se revelan alelos únicos y haplotipos al mismo tiempo. En cambio, en las mujeres, al producirse recombinación entre los cromosomas homólogos durante la meiosis, el uso adecuado de haplotipos en test de parentesco requiere conocer el ligamiento genético, además del conocimiento de las frecuencias haplotípicas específicas de la población estudiada [69, 77, 78]. Estos parámetros se tendrán en cuenta a la hora de calcular las probabilidades de parentesco, debido a que pueden tener impacto en la interpretación estadística de resultados [79].

El ligamiento genético hace referencia a la segregación conjunta de loci físicamente próximos, en un mismo cromosoma. La vía clásica para estudiar el ligamiento entre marcadores genéticos, consiste en analizar la segregación de sus alelos a través de pedigríes familiares y su análisis se basa en estimar la frecuencia de recombinación ( $\theta$ ) entre los dos loci. Si es  $< 0,5$  se

considera que los loci están ligados y si  $\theta \geq 0,5$  los loci se transmiten de manera independiente. El método estadístico utilizado es el cálculo de LOD o Z (logarithm of the Odds, logaritmo de las probabilidades), y un valor de  $\text{LOD} \geq 2$ , constituye una evidencia de ligamiento. Las frecuencias de recombinación meiótica son estimadas entre cada par de marcadores y transformadas en tanto por cien, a distancias genéticas medidas en cM (centimorgan) [47, 48]. La distancia genética de 1cM (1 recombinación / 100 meiosis) corresponde aproximadamente a una distancia física de 1Mb [67]. La frecuencia de recombinación, no sólo va a depender de la distancia genética entre marcadores, sino también de la localización física de los mismos en el cromosoma X, mientras que regiones alrededor del centrómero presentan frecuencias de recombinación bajas ( $<1$  cM/Mb), regiones cerca del telómero presentan frecuencias altas ( $>2$ cM/Mb), especialmente los marcadores situados en la región Xq28 [80, 81].

El desequilibrio de ligamiento (LD, *linkage disequilibrium*) se refiere a la cosegregación no aleatoria de los alelos de diferentes loci entre los sujetos de una misma población a nivel poblacional. Cuando los alelos de diferentes marcadores se encuentran próximos entre sí, no existe una segregación independiente de los mismos, lo cual trae consigo que a nivel poblacional se observen genotipos comunes entre individuos. El valor de LD se estima a partir de las frecuencias alélicas y haplotípicas observadas en la población, y este valor va a medir la desviación de estas frecuencias observadas, con respecto a las esperadas, cuando los loci segregan de manera aleatoria [82].

Además, se ha observado que el desequilibrio de ligamiento entre STRs va a variar de unas poblaciones a otras, estando influenciado por otros fenómenos, tales como, selección natural y mutación, la fuerza evolutiva que actúa junto a la selección natural cambiando las frecuencias alélicas de las poblaciones en el tiempo (deriva genética), el proceso de colonización natural o artificial de un nuevo territorio (efecto fundador), o la mezcla o estratificación de las poblaciones [83, 84].

Es muy importante calcular el desequilibrio de ligamiento entre los microsatélites estudiados en las diferentes poblaciones y tener en cuenta que, cuando existe desequilibrio de ligamiento entre STRs del cromosoma X, las frecuencias haplotípicas, utilizadas para el cálculo de probabilidad de parentesco, tienen que ser estimadas directamente de las muestras de la población específica, con lo que no pueden ser calculadas a partir del producto de las frecuencias alélicas correspondientes por separado de cada marcador [85, 86].

Mientras que la mayoría de las frecuencias alélicas de los STRs de uso forense oscilan entre 0,05-0,40, las frecuencias de haplotipos, formados por 2 ó 3 microsatélites, a pesar de existir en ocasiones desequilibrio de ligamiento entre ellos, se encuentran en el rango entre 0,001-0,02. Por lo tanto, en un test de identificación, cuando 2 o más personas, comparten un haplotipo poco frecuente, hay una elevada probabilidad de parentesco [80, 87].

### **1.5.8. Microsatélites del cromosoma X de uso forense**

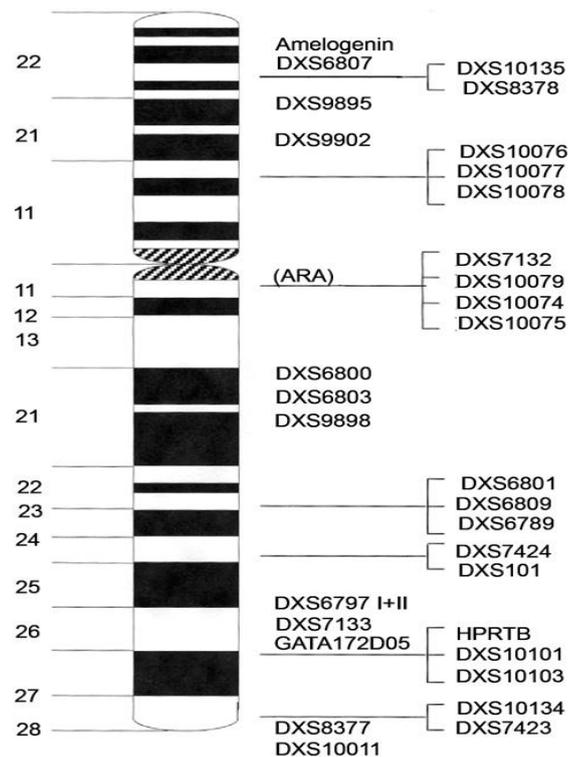
En el año 2005, se publicó la primera base de datos online de STRs del cromosoma X (<http://www.chrx-str.org/>), la cual contiene gran cantidad de información de los principales microsatélites utilizados para propósitos forenses, estudios de antropología evolutiva y otras investigaciones genéticas [88].

Esta página web presenta la siguiente información detallada para cada STR:

- Localización citogenética en el cromosoma X.
- Distancia física del marcador, medida en Mb, a la región telomérica del brazo corto de cromosoma X según la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- Distancia genética del marcador, medida en cM, a la región telomérica del brazo corto del cromosoma X según la base de datos de deCODE (<http://www.marshfieldclinic.org/>), y la interpolada por regresión usando Rutgers Map v.2. (<http://compgen.rutgers.edu/>).
- Información detallada de la estructura de cada STRs e información de la composición de los diferentes alelos con su respectiva nomenclatura encontrada en la población humana.
- Tipaje de hasta 4 líneas celulares (K562, NA3657, NA9947A, NA9948) de cada STR [89].
- Frecuencias alélicas de las diferentes poblaciones, resultado de la recopilación de datos publicados en artículos, cuyos autores, para la designación alélica, siguen las recomendaciones del ISFG.
- Parámetros genéticos poblacionales que caracterizan a cada marcador (HET, PIC, PD, MEC, etc...).

Se han descrito más de 50 STRs del cromosoma X con utilidad en Genética Forense, de los cuales la mayoría están constituidos por unidades de repetición tetranucleótidas. En la figura 2 se ilustra a través de un idiograma, la distribución de los principales X-STRs [47].

Figura 2. Distribución de los principales X-STRs de uso forense en el cromosoma X según Szibor (2007) [47].



Hasta la actualidad se han descrito varios multiplexes, que permiten el análisis simultáneo de varios STRs del cromosoma X. En la Tabla 1 aparece detallado los STRs incluidos en varias reacciones multiplex. Estas reacciones han permitido que se disponga de bases de datos de frecuencias alélicas de los X-STRs de la mayoría de la población mundial.

Tabla 1. Principales reacciones multiplex descritas en la literatura. Se detalla el año de publicación, el número y STR incluidos en cada reacción y la referencia respectiva en cada caso.

AÑO	Nº STR	MARCADORES DEL MULTIPLEX	REFERENCIA
2002	2	DXS7423, DXS8377	[58]
2002	5	HPRTB, DXS101, ARA, DXS7423, DXS8377	[59]
2003	4	Mentype Argus X-UL kit ( DXS7132, DXS7423, DXS8378, HPRTB)	[90]
2003	3	DXS6800, DXS101, DXS8377	[91]
2003	4	DXS101, DXS8377, HPRTB, STRX	[92]
2004	5	GATA172D05, HPRTB, DXS8377, DXS101, HUMARA	[93]
2005	7	DXS6789, HUMARA, DXS10011, DXS7423, HPRTB, DXS6807, DXS101	[94]
2005	3	DXS6801, DXS6809, DXS6789	[85]
2005	2 de 5	DXS9898, DXS6807, HPRTB, DXS101, ARA; DXS7133, DXS10011, DXS7424, DXS8377, DXS8378	[95]
2005	5	DXS101, HPRTB, DXS8377, DXS981, DXS6789	[96]
2006	3	DXS10079, DXS10074, DXS10075	[86]
2006	2 de 3	DXS7130, DXS7132, DXS6789; DXS9895, DXS9898, GATA172D05	[67]
2006	3	DXS10076, DXS10077, DXS10078	[97]
2006	2 de 3	DXS10079, DXS10074, DXS10075; DXS7132, HumARA, DXS981	[77]
2006	2 de 4	DXS10011, DXS9898, DXS8377, HPRTB DXS7132, DXS6797, GATA172D05, DXS6807	[98]
2006	2 de 6	DXS6789, DXS6809, GATA172D05, DXS101, DXS8378, DXS8377; DXS7132, DXS6800, DXS6801, DXS7424, HPRTB, DXS10011	[99]
2006	5	DXS9905, DXS8076, DXS8114, DXS1002, DXS1050	[100]
2007	12	DXS7132, DXS8378, DXS6809, DXS7133, DXS6789, DXS7424, GATA172D05, HPRTB, DXS7423, GATA31E08, DXS101, DXS6807	[101]
2008	8	Mentype Argus X-8 (DXS10135, DXS8378, DXS7132, DXS10074, HPRTB, DXS10101, DXS10134, DXS7423)	[70]
2008	5	DXS7132, DXS981, DXS6803, DXS6809, DXS6789	[66]
2008	5	DXS8378, DXS6800, DXS101, HPRTB, DXS8377	[102]
2008	3	DXS10146, DXS10134, DXS10147	[103]
2008	11	DXS9895, DXS7132, DXS6800, DXS9898, DXS6789, DXS7133, DXS7130, HPRTB, GATA31E08, DXS7423, DXS10011	[104]
2009	10	DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS9902, DXS6789	[105]
2009	6	DXS8378, DXS6807, DXS7424, DXS7133, DXS8377, DXS7423	[106]
2009	4	DXS9902, DXS6800, DXS6799, DXS7132	[107]
2009	13	DXS6807, DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7424, DXS101, GATA172D05, HPRTB, DXS8377, DXS7423	[108]
2010	6	DXS10161, DXS10159, DXS10162, DXS10163, DXS10164, DXS10165	[80]

AÑO	Nº STR	MARCADORES DEL MULTIPLEX	REFERENCIA
2010	5	DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS7424, DXS101	[109]
2010	7	DXS10101, DXS10102, DXS10103, DXS10104, DXS10105, DXS10106, DXS10107	[110]
2010	4	DXS10079, DXS10103, DXS10146, DXS10148	[87]
2010	2 de 8	DXS7424, GATA172D05, HPRTB, DXS8377, GATA31E08, DXS9895, DXS7423, DXS981 DXS6803, DXS6789, DXS6800, DXS6809, DXS7133, DXS7132, DXS101, DXS6807	[111]
2011	9	DXS6854, DXS9902, DXS6809, GATA172D05, HPRTB, DXS7423, DXS6807, DXS8378, DXS8377	[112]
2011	11	DXS8378, DXS6795, DXS7132, DXS6803, DXS9898, DXS6801, DXS7133, GATA165B12, HPRTB, DXS8377, DXS7423	[113]
2012	12	Argus X-12 PCR Amplification Kit (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148, HPRTB)	[114, 115]
2012	1 de 6 1 de 7	DXS6807, DXS6800, DXS7424, DXS101, GATA172D05, HPRTB DXS8378, DXS9898, DXS6801, DXS6809, DXS7133, DXS8377, DXS7423	[116]
2012	12	DXS6807, DXS8378, DXS9902, DXS6800, DXS6803, DXS6799, DXS6804, GATA172D05, DXS6854, HPRTB, DXS8377, DXS7423	[117]
2012	15	DXS7133, DXS6801, DXS981, DXS6809, DXS7424, DXS6789, DXS9898, DXS7132, GATA165B12, DXS101, DXS10075, DXS6800, GATA31E08, DXS10074, DXS10079	[118]
2012	10	DXS10146, DXS10159, DXS10148, DXS6799, DXS10146, DXS10075, DXS10079, DXS10161, DXS10102, DXS10160	[119]
2012	14	DXS6807, DXS6800, DXS7424, DXS101, GATA172D05, HPRTB DXS8378, DXS9898, DXS6801, DXS6809, DXS6789, DXS7133, DXS8377, DXS7423	[120]

En el año 2003, apareció el primer multiplex comercial disponible Mentype® Argus X-UL PCR Amplification Kit (Biotype, AG, Dresden, Alemania), el cual amplificaba simultáneamente cuatro X-STRs (DXS7132, DXS7423, DXS8378, HPRTB), además de la amelogenina para la determinación del sexo [90]. La amelogenina es un gen que codifica proteínas localizadas en el esmalte dental. En el ser humano existen 2 genes para esta proteína, uno de ellos localizados en el cromosoma X y otro en el cromosoma Y. Sullivan *et al.* [121] detectó una delección de 6pb del intrón 1 del cromosoma X homólogo. Esta es la razón por lo que se van a generar productos de amplificación de 106 y 112 pb para el cromosoma X e Y respectivamente. El análisis simultáneo de estos 2 genes son de gran utilizad para la determinación del sexo.

En Abril del 2005, empezó a estar disponible el Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit (Biotype, AG, Dresden, Alemania), que incrementó el número de STRs analizados a ocho (DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135 y HPRTB), más la amelogenina [70].

En el año 2006 se lleva a cabo un trabajo de colaboración entre diferentes laboratorios de Genética Forense, pertenecientes al Grupo Español y Portugués de la Sociedad Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG), en el que se optimiza un multiplex para el tipado de 10 X-STRs en una misma reacción (DXS8378, DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6809, DXS6789, DXS7133, GATA172D05, GATA31E08 y DXS7423) y se describen las frecuencias alélicas de los países participantes [105].

Actualmente, existe en el mercado el Argus X-12 PCR Amplification Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), que incluye hasta doce marcadores DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10079, DXS10101, DXS10103, DXS10134, DXS10135, DXS10146, DXS10148, HPRTB, más la amelogenina [114, 115].

### **I.5.9. Grupos de ligamiento del cromosoma X de uso forense**

El cromosoma X presenta grupos de microsatélites que, al estar lo suficientemente separados entre sí, se heredan independientemente, y otros grupos de loci que se encuentran estrechamente ligados.

A la hora de utilizar los marcadores del cromosoma X, es importante determinar el grado de ligamiento entre los loci de este cromosoma, y así, a la hora de interpretar los resultados, saber si se deben utilizar las frecuencias de los alelos de estos STRs individualmente o las frecuencias haplotípicas de estos grupos de microsatélites. La utilización de frecuencias haplotípicas para la resolución de casos forenses, necesita a priori, una evaluación de la estabilidad de estos haplotipos y de la independencia entre los grupos de ligamiento en la población que se vaya a analizar [87].

En el año 2007, Szibor *et al.* [47] describieron cuatro grupos de ligamiento en el cromosoma X: DXS10135-DXS8378 (Xq22.2); DXS7132-DXS10074 (Xq12), HPRTB-DXS10101 (Xq26), y DXS10134-DXS7423 (Xq28). Estos microsatélites se pueden amplificar simultáneamente por el Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit (Biotype, AG, Dresden, Alemania) [70].

Cada uno de estos cuatro grupos se expanden menos de 0,5 cM, por lo que se consideran haplotipos estables [47]. Como consecuencia, la recombinación meiótica dentro de cada uno de los cuatro grupos, es menos del 0,5%, con lo que se puede asumir que los marcadores dentro de cada grupo se encuentran estrechamente ligados. Sin embargo, para confirmar esta suposición fue necesario observar la segregación alélica de un número elevado de meiosis en 104 tríos familiares formados por abuelo-madre-hijo [70]. Por otro lado, las distancias entre los

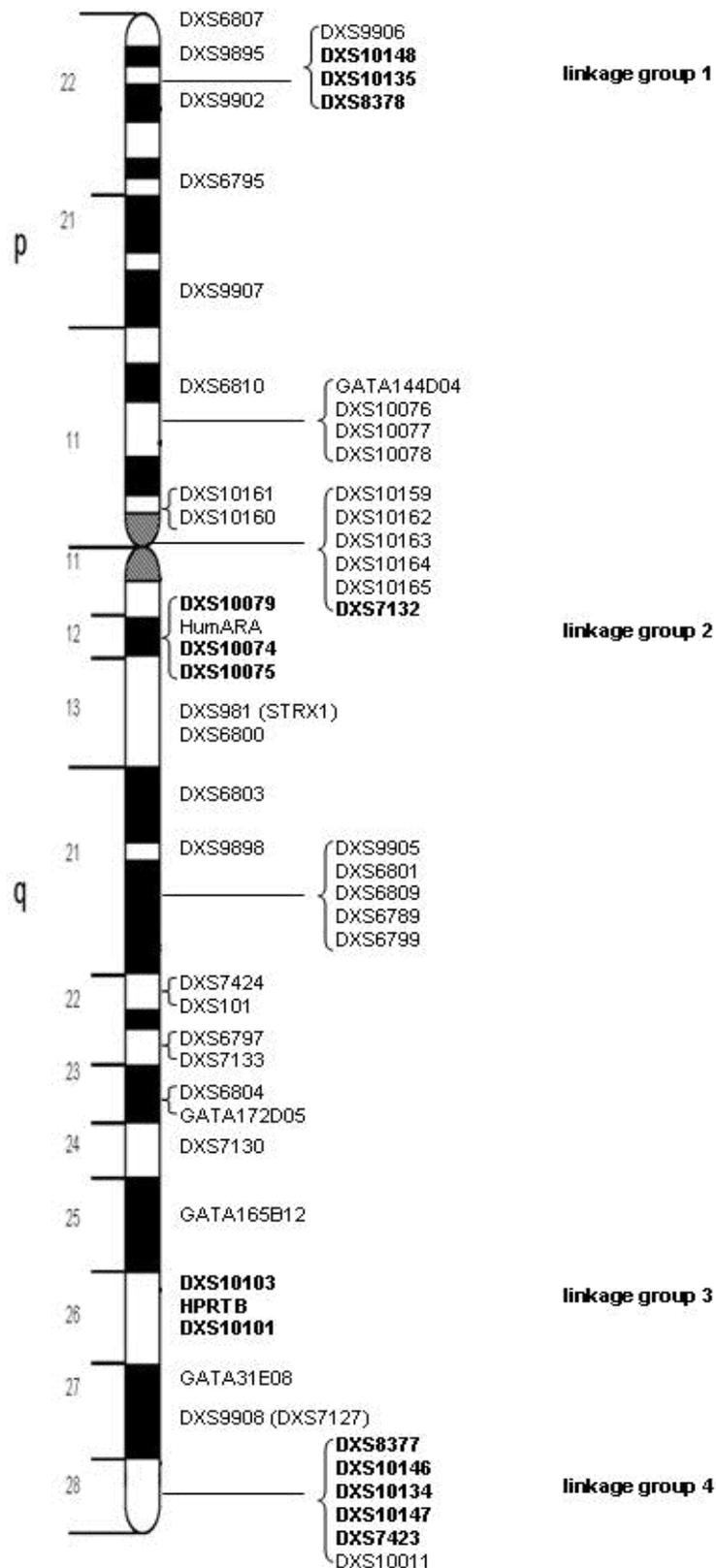
grupos de ligamiento 1 y 2 es de 70,67 cM y entre 2 y 3 es de 58,91 cM; al ser estas distancias entre los grupos mayores de 50 cM, cada grupo se heredaría de forma independiente con respecto al resto. Sin embargo, la distancia entre los grupos 3 y 4 es menor de 35 cM, por lo que se debe considerar que en el 65% de las meiosis femeninas estos microsatélites pueden transmitirse juntos [122].

En el año 2008, el mismo grupo [123], con el propósito de aumentar el poder de discriminación, sugirió la incorporación de STRs a los cuatro grupos de ligamiento. Por ejemplo, DXS10148 al primero, DXS10079 al segundo, DXS10103 al tercero y DXS10146 ó DXS10147 al cuarto grupo de ligamiento. De esta manera se establecieron los siguientes grupos de ligamiento (<http://www.chrx-str.org/>):

- Grupo de ligamiento 1 (DXS10148-DXS10135-DXS8378) en Xp22 [123].
- Grupo de ligamiento 2 (DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075) en Xq12 [87].
- Grupo de ligamiento 3 (DXS10103-HPRTB-DXS10101) en Xq26 [87, 124].
- Grupo de ligamiento 4 (DXS8377-DXS10146-DXS10134-DXS10147-DXS7423) en Xq28 [125].

En la Figura 3 aparece un idiograma del cromosoma X en el que se representan estos cuatro grupos de ligamiento y su localización cromosómica.

Figura 3. Localización de los 4 grupos de ligamiento descritos por Szibor *et al.* [88] (<http://www.chrx-str.org/>). Los STRs que pertenecen a cada grupo de ligamiento aparecen en negrita.



Tres marcadores de cada grupo de ligamiento pueden ser amplificados por el Argus X-12 PCR Amplification Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) [114, 115].

Otros grupos de ligamiento que proveen haplotipos estables son: DXS6801-DXS6809-DXS6789 en Xq21 [85], DXS7424-DXS101 en Xq22 [60] y DXS10076-DXS10077-DXS10078 en Xp11.23 [97]. Además, el grupo DXS10161-DXS10159-DXS10162-DXS10163-DXS10164-DXS10165 en Xp11.21 y Xq11.1 [80], al situarse en la región centromérica con una baja tasa de recombinación, también establece haplotipos estables en las diferentes poblaciones analizadas.

En la base de datos online (<http://www.chrx-str.org/>) aparecen algunas de las frecuencias haplotípicas de los 4 grupos de ligamiento, descritos por Szibor *et al.* [47] en el año 2007, de la población de Ghana, Japón, y la etnia Han de la población China [88, 113, 126]. Además, están disponibles las frecuencias de los bloques haplotípicos DXS10148-DXS10135-DXS8378, DXS7132-DXS10079-DXS10074, DXS10103-HPRTB-DXS10101, DXS10146-DXS10134-DXS7423 de la población de Alemania [88].

En los últimos años, ha habido un auge de publicaciones de las frecuencias de bloques haplotípicos en diferentes poblaciones. En la Tabla 2 queda representado un gran número de grupos haplotípicos del cromosoma X con las poblaciones donde se han llevado a cabo el estudio de sus respectivas frecuencias.

Tabla 2. Grupos haplotípicos del cromosoma X y poblaciones donde se han publicado sus respectivas frecuencias.

GRUPO HAPLOTÍPICOS	POBLACIÓN ESTUDIADA
DXS10135-DXS8378 DXS7132-DXS10074 HPRTB-DXS10101 DXS10134-DXS7423	Alemania, Ghana, Japón [70] China [127], Corea [128], Polonia [129] Hungria [130]
DXS10148-DXS10135-DXS8378	Alemania[115], Corea [87], Argelia [124], Japón [119]
DXS7132-DXS10079-DXS10074 DXS10103-HPRTB-DXS10101	Alemania [115], Corea [87], Argelia [124]
DXS10146-DXS10134-DXS7423	Alemania[115], Corea [87]
DXS10146-DXS10134-DXS10147	Alemania[103]
DXS8377- DXS10146-DXS10134-DXS7423-DXS10011	Argelia [124]
DXS10079-DXS10074-DXS10075	Alemania[86], Italia[131], Río de Janeiro [109]
DXS10076-DXS10077-DXS10078	Alemania [97]
DXS6801-DXS6809-DXS6789	Alemania[85], Italia [99], Pakistán[132], Argelia [124], Brasil [116], China [118]
DXS7424-DXS101	Alemania[60, 95], Italia [99], Pakistán [132], Argelia [124], Taiwán [108], Brasil [116]

GRUPO HAPLOTÍPICOS	POBLACIÓN ESTUDIADA
DXS10161-DXS10159-DXS10162-DXS10163-DXS10164-DXS10165	Alemania [80]
DXS995-DXS8076-DXS8114-DXS1002-DXS1050	Brasil [100]
DXS9898-DXS6789	Taiwán [108]
DXS6809-DXS6789	
DXS8377- DXS7423	China [ 112], Brasil [116]
DXS8378-DXS9902	
DXS6804-GATA172D05	China [ 112, 117]
DXS6807-DXS8378-DXS9902	
DXS10161-DXS10160-DXS10159	
DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075-DXS981	
DXS6809-DXS6789-DXS6799	Japón [119]
DXS10102-HPRTB-DXS10101-DXS10106	
DXS8377-DXS10146-DXS10134-DXS7423	

### **I.5.10. El cromosoma X en genética de poblaciones**

El cromosoma X presenta una serie de características que lo convierten en una herramienta útil en genética de poblaciones. La principal ventaja es que el estudio de los marcadores del cromosoma X aportan datos tanto de los linajes paternos como maternos, a diferencia del estudio de marcadores del cromosoma Y y del ADN mitocondrial, que solamente proporcionan información del linaje masculino y femenino respectivamente.

Además, como las mujeres tienen dos copias del cromosoma X y los hombres una única copia, se convierte en una fuente de interés para estudiar las diferencias genético-poblacionales en los patrones de recombinación, en la tasa de mutación o en la afectación de la selección natural entre hombre y mujer [133].

En los últimos años ha habido un auge de los estudios genéticos de los X-STRs en poblaciones de todo el mundo. De esta manera, se dispone de datos de poblaciones europeas como España, Portugal, Alemania, y de otras poblaciones mundiales como Brasil, Argentina, Puerto Rico, Colombia y EEUU, entre otros [70, 105, 134- 136].

La comparación de frecuencias de poblaciones muy cercanas, por ejemplo entre polacos y húngaros, o entre coreanos y japoneses, parece indicar que las diferencias en la distribución de frecuencias alélicas de los X-STRs parecen ser mínimas [128, 129]. Sin embargo, se observan diferencias significativas cuando se comparan poblaciones más lejanas en el espacio, por ejemplo, la población alemana o ghanesa con la japonesa [100, 128]. Además, se han observado diferencias intrapoblacionales a nivel microgeográfico en regiones europeas con características demográficas diferentes y baja interacción con comunidades vecinas [137-139].

Esta estructura poblacional a nivel microgeográfico se ha observado en la provincia de Cantabria, entre la ciudad costera de Santander, y una comunidad aislada, la población del valle del Pas [137, 139].

Es muy importante disponer de bases de datos específicas de cada grupo poblacional, con lo que existe la necesidad de seguir realizando estudios que permitan determinar las frecuencias alélicas de cada población, la independencia de los loci y la tasa de mutación, entre otros parámetros.

### **I.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ADN ALTAMENTE DEGRADADO**

#### **I.6.1. Limitaciones del análisis de muestras forenses: ADN degradado o en cantidad escasa**

Las muestras que se remiten a los laboratorios de Genética Forense con propósito de identificación pueden proceder de escenas de crímenes, desastres de masas, ataques terroristas etc. En estas circunstancias, el material genético que se consigue aislar puede encontrarse degradado y/o en baja concentración [140].

##### *1.6.1.1. Procesos de descomposición post-mortem y degradación del ADN*

Durante el proceso de descomposición, dependiendo de varios factores internos y externos, tales como la naturaleza de la señal, las características de los tejidos y el estado de desarrollo de los mismos, las células van a seguir una de las dos vías de muerte celular: el proceso de necrosis y , en menor medida, el proceso de apoptosis [140-142].

La necrosis es una muerte celular accidental inducida por causas patológicas (agentes tóxicos, traumáticos, hipóxico, etc.) y caracterizada por un incremento en el volumen celular, una tumefacción de orgánulos citoplasmáticos y una condensación de la cromatina, mientras el núcleo permanece intacto. A continuación, se produce la ruptura y disgregación de las membranas, los orgánulos citoplasmáticos estallan y se liberan enzimas lisosomales, las cuales a pH ácido, son capaces de degradar las biomoléculas. La eliminación de las proteínas histónicas, principales proteínas involucradas en la estructura de la cromatina, por proteasas de los lisosomas facilita en gran medida el proceso de degradación del ADN al azar por endonucleasas [140, 143].

Por su parte, la apoptosis es una muerte celular programada dependiente de energía, caracterizada por la condensación del citoplasma, pérdida de la membrana citoplasmática, segmentación del núcleo y degradación del ADN cromosómico en fragmentos de

aproximadamente 180 pb, a través de la activación de endonucleasas endógenas por un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de las caspasas [141, 144].

Se produce así una degradación de los fragmentos de ADN tanto por nucleasas endógenas liberadas por las propias células como por nucleasas exógenas procedentes de microorganismos o invertebrados del medio ambiente. Estas reacciones enzimáticas van seguidas de procesos mucho más lentos pero persistentes, tales como degradación espontánea del ADN o reacciones no enzimáticas hidrolíticas y oxidativas, capaces de modificar la estructura del ADN [145]. Asimismo, la radiación puede producir varias lesiones en el material genético, incluyendo la ruptura de hebras dobles o sencillas, modificaciones de sus bases, destrucción de sus azúcares, sobrecruzamientos intra- o intercatenarios y formación de dímeros de pirimidinas en la hebra [146].

### 1.6.1.2. Muestras con cantidad de ADN reducido

En muchos casos, las muestras forenses no solamente se caracterizan por su alto grado de fragmentación, sino también por la escasa cantidad de ADN disponible para su análisis. Es el caso de muestras de parafina [147], y de restos biológicos tales como células de contacto [148], pelos telogénicos con o sin raíz [149], huesos [150] y manchas de sangre [151].

El análisis de muestras con cantidades reducidas de ADN o bajo número de copias (*Low Copy Number*, LCN) inicialmente se refería a una concentración menor de 100 pg. Dado que una célula humana diploide contiene aproximadamente 6,6 pg de ADN genómico, ello implica al menos entre 15-17 copias de ADN nuclear [152, 153].

Posteriormente, dicha cantidad fue elevada a 200 pg por estar más cercano al umbral estocástico descrito por Moretti *et al.* [154, 155]. El umbral de efectos estocásticos está basado en la cantidad de ADN molde en la que se observa un notable desbalance en la altura de los alelos correspondientes a un heterocigótico. Estos valores de umbral son relativamente específicos para cada ensayo, producto comercial y metodología utilizada. Un criterio adecuado para la determinación de dicho umbral se basa en la proporción existente entre las alturas de picos de un heterocigótico. Estos valores necesitan ser determinados dentro de cada laboratorio a partir de los estudios de validación adecuados para cada sistema [156]. De modo general, el genotipado de muestras con ADN escaso puede ser definido como el análisis de cualquier muestra de ADN donde los resultados no sobrepasan el umbral estocástico que garantice una interpretación fiable [156, 157].

Debido a la menor fiabilidad del genotipado de muestras con ADN escaso respecto al genotipado convencional, Budowle *et al.* [158] sugirieron que el tipaje de muestras con ADN escaso debería ser utilizado exclusivamente para la identificación de personas desaparecidas, incluyendo víctimas de desastres de masas, así como para la obtención de pistas de investigación a partir de restos humanos. Por el contrario, no recomiendan su utilización en procedimientos criminales.

Por otro lado, debido a la escasa reproducibilidad de los perfiles genéticos obtenidos a partir de muestras con ADN escaso, suelen realizarse réplicas de un mismo análisis, considerando válido el alelo identificado al menos un par de veces [159].

### 1.6.1.3 Amplificación por PCR de ADN degradado y/o en cantidad reducida

Las complicaciones observadas en la amplificación de muestras que contienen ADN degradado o en cantidad reducida son, entre otros: la ausencia de amplificación, la amplificación preferencial de los amplicones de menor tamaño, la aparición de efectos estocásticos y la incorporación de bases erróneas durante el proceso de amplificación.

Las reacciones de PCR multiplex habitualmente están optimizadas a partir de 1 ng de ADN molde no degradado, lo que equivale a 660 copias de ADN genómico diploide, que son sometidas por lo general a 28-30 ciclos de amplificación por PCR [152]. Sin embargo, hay que tener en cuenta algunas cuestiones a la hora de interpretar estos perfiles, debido a que se ha demostrado que en muestras donde la cantidad de copias de ADN es menor de 60 o el ADN se encuentra degradado, un aumento en el número de ciclos de amplificación, produce un aumento tanto de alelos nulos, como del rango de tamaños de bandas tartamudas, además de un incremento en el desbalance de picos heterocigóticos, dificultando de esta manera los análisis forenses [149, 160-162]. Así, en los perfiles obtenidos con una reacción multiplex a partir de ADN degradado y/o escaso se observa una curva donde la altura de los picos es inversamente proporcional al tamaño de los productos de amplificación [156]. De esta manera, a partir de muestras de ADN que no superen el umbral estocástico, es habitual que los cebadores no hibriden con la misma frecuencia en las dos secuencias de ADN de un heterocigoto, lo que da lugar a un desbalance entre ambos alelos o a la pérdida completa de uno de los dos alelos, lo que se conoce como “*allelic dropout*” o alelo nulo, o a la presencia de elevados porcentajes de bandas tartamudas [163].

Otra causa por la que se producen errores de genotipado es la incorporación de bases erróneas (*miscoding lesions*) durante la fase de extensión de la PCR, generados bien por errores de amplificación de la propia enzima Taq polimerasa ( $\sim 2 \times 10^{-4}$ ) [164] o generados por las modificaciones post-mortem producidas en la hebra original de ADN [140]. Otro de los fenómenos frecuentes en las muestras de ADN degradado (debido a su alto nivel de rotura y modificación molecular) es la formación de productos quiméricos, por un fenómeno denominado “*Jumping PCR*”, resultado de la extensión incompleta de las cadenas durante la PCR. Este mecanismo va a tener lugar cuando el sitio de unión del cebador de una de las dos hebras del ADN no se encuentra intacto, hibridándose así con el otro segmento en zonas complementarias y sirviendo como molécula molde para la extensión de la PCR, pues ya están disponibles las zonas de unión de los cebadores. La probabilidad de que se produzca dicho fenómeno depende de la relación entre el número de cadenas de ADN molde modificadas e intactas presentes en el extracto [165].

Asimismo, los extractos de ADN degradado pueden poseer una variedad de inhibidores endógenos y exógenos que a través de una serie de mecanismos modifican la estructura del ADN, pudiendo dificultar el proceso de amplificación [166].

#### 1.6.1.4. Metodología para mejorar el genotipado de muestras con ADN degradado o en cantidad reducida

Debido a la creciente importancia del genotipado de muestras con ADN escaso, se han descrito diferentes métodos destinados a incrementar su sensibilidad, tales como:

- La amplificación del genoma completo previa a la reacción multiplex. Estos métodos utilizan varias secuencias de cebadores al azar y condiciones de hibridación de los cebadores con especificidad baja de la sonda [167].
- El aumento de la señal del marcaje fluorescente de los cebadores de la reacción [156].
- La reducción del volumen de PCR. Este método permite un incremento en la altura de los picos cuando la cantidad de ADN se mantiene constante en un volumen de PCR reducido [168].
- El incremento en el número de ciclos en el protocolo de PCR, normalmente de 28 a 34 ciclos. Este método tiene el inconveniente de que puede incrementar la amplificación inespecífica [169].

- La utilización de formamida en un estado de mayor pureza para la preparación de la muestra sometida a electroforesis capilar [158].
- La limpieza post-PCR de los iones que compiten con el ADN durante la inyección electrocinética [170].
- El incremento del tiempo de inyección en la electroforesis capilar [168].
- La utilización de la PCR anidada que utiliza cebadores que se unen a un fragmento de ADN amplificado con anterioridad [171].

### 1.6.1.5. Herramientas para mejorar el genotipado de muestras con ADN degradado o en cantidad reducida

Las herramientas desarrolladas hasta la fecha con el objetivo de facilitar el análisis de muestras de ADN degradado y mejorar tanto la eficacia de la amplificación como la interpretación de los análisis de mezclas, se basan principalmente en SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) [172, 173] o miniSTRs [161, 163, 174, 175].

#### 1.6.1.5.1. SNPs para identificación de ADN degradado

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs consisten en la sustitución de un nucleótido por otro, dando lugar a variaciones puntuales dentro de la secuencia [172]. El tipaje de SNPs es una herramienta complementaria de gran utilidad cuando el análisis de STRs falla a la hora de dar resultados, o cuando se obtiene un perfil incompleto. Los análisis de SNPs serán aplicados, por tanto, en el tipaje de ADN mitocondrial, en los análisis de linajes del cromosoma Y, en estudios de evaluación de ancestralidad biogeográfica y en la caracterización de determinadas características físicas [176].

Además, cabe destacar que los SNPs son los candidatos ideales para el tipaje de loci en el análisis de muestras altamente degradadas, debido a que poseen una baja tasa de mutación, permiten diseñar reacciones que den lugar a tamaños de amplificado reducidos (entre 50-120 pbs) y además poseen una gran facilidad de adaptación a las tecnologías de alto rendimiento [177, 178]. De esta manera, existen reacciones multiplex de SNPs como el SNPforID [179] o el SNaPshot™ [180], que permiten amplificar hasta 52 polimorfismos, ofreciendo una gran efectividad en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas.

#### *1.6.1.5.2. MiniSTRs para identificación de ADN degradado*

Los miniSTRs son los productos resultantes del rediseño de cebadores, los cuales se unen a regiones más cercanas a la estructura del STR con el propósito de obtener amplicones cuyo tamaño no superen las 150-200 pb [143, 174]. De este modo, se incrementa el número de loci que pueden ser analizados a partir de aquellas muestras con ADN degradado que generan perfiles parciales e incompletos con STRs convencionales. Se denomina “miniSTR multiplex” a la reacción que utiliza cebadores para amplificar principalmente miniSTRs. Asimismo, se ha propuesto la siguiente clasificación en función del tamaño del amplicón amplificado: miniSTRs (<200pb), midiSTR (200- 300 pb), y maxiSTRs (>300 pb) [143].

Los miniSTRs permiten aumentar la sensibilidad del análisis de ADN y van a ser capaces de obtener perfiles completos de muestras cuyas concentraciones estén por debajo de 100 pg/μl de material genético y de muestras de ADN degradado, convirtiéndose, por tanto, en una herramienta útil para aquellas muestras que dan lugar a perfiles parciales mediante el uso de STRs estándar [161, 169, 181]. Además, son útiles para resolver casos de criminalística, debido a que permiten aumentar la probabilidad de coincidencia en casos de identificación de restos cadavéricos, cuando se consigue un perfil parcial, y además no se dispone de los suficientes familiares de la víctima para comparar el perfil genético [182]. Son capaces de mejorar el poder de exclusión en casos donde la víctima no tiene suficientes familiares disponibles, como en desastres de masas, y además pueden proveer discriminación adicional en casos complejos de parentesco, por ejemplo casos de incesto, donde los individuos relacionados compartan un mayor número de alelos [161, 183].

En cambio, uno de los problemas que aparece cuando el rango de productos amplificados es menor de 150 pb es la aparición de moléculas residuales marcadas que suelen proceder, bien, de procesos de síntesis de nucleótidos, o bien, de fallos de los cebadores en las fases de calentamiento y refrigeración de los ciclos de amplificación. En muestras con cantidad reducida de ADN, la relación de la señal de residuos marcados y de los productos que se desean amplificar aumenta (al ocurrir menor amplificación), con lo que el impacto de estas impurezas puede aumentar [174]. No todos los marcadores se pueden rediseñar en formato miniSTRs. Esto puede deberse a la estructura de las regiones flanqueantes, como sucede en algunos marcadores autosómicos, como D7S820, o puede deberse a que el rango de alelos es demasiado amplio, como ocurre en los marcadores FGA y D21S11 [161].

### I.6.1.6. Grupos de Trabajo Internacionales en relación al análisis de ADN degradado

Los grupos de trabajo internacionales EDNAP y ENFSI han coordinado varios ejercicios colaborativos destinados a evaluar la capacidad de análisis a partir de muestras de ADN altamente degradadas mediante las reacciones multiplex convencionales. Como consecuencia, han propuesto el desarrollo de herramientas moleculares para obtener perfiles genéticos completos a partir de este tipo de muestras [173, 184].

Uno de los estudios colaborativos coordinado por EDNAP se llevó a cabo en el año 2006, con el propósito de evaluar la efectividad de la tecnología de los SNPs y miniSTRs para el tipaje de muestras de ADN degradadas a 37°C en un ambiente de humedad del 100% durante un periodo de 12 semanas para muestras de saliva y 16 semanas para muestras de sangre [173]. Para genotipar estas muestras se utilizaron reacciones multiplex en las cuales se aumentó el número de ciclos de amplificación de 28 a 34 [169]; miniSTR multiplex [161]; y el Foren-SNP™ multiplex kit (The Forensic Science Service®, Reino Unido) para el tipaje de SNPs [185].

El aumento del número de ciclos en las reacciones multiplex demostró ser un método de amplificación muy eficaz, obteniendo el mayor número de loci, pero sin embargo se observó un desbalance de heterocigóticos y un aumento en la probabilidad de pérdidas alélicas, aspectos que comprometen la interpretación correcta de las muestras [173].

El Foren-SNP presentó el menor éxito de las técnicas testadas en dicho estudio, de tal manera que se aconsejó utilizar este kit sólo en el caso de que fuese el único SNP multiplex disponible [185]. Por lo tanto, la facilidad de obtener resultados con el uso de Foren-SNPs pudo ser beneficiosa solamente en muestras que no pudieron ser tipadas con el uso de STRs convencionales, tales como huesos, dientes, y tejidos altamente degradados comúnmente, encontrados en desastres de masas [173, 186].

Por lo tanto, el mayor porcentaje de perfiles genéticos completos en este estudio se obtuvo a partir de los ensayos de miniSTRs, los cuales utilizaban 32 ciclos de amplificación en la PCR, un número intermedio entre reacciones multiplex convencionales y genotipado de muestras con ADN escaso [161, 173, 174].

### 1.6.1.7. Recomendaciones de la EDNAP y el ENFSI sobre la incorporación de los nuevos miniSTRs

Como resultado de diferentes ejercicios colaborativos y de una revisión de la literatura, EDNAP y ENFSI hicieron las siguientes recomendaciones [182]:

- Los miniSTRs van a ser la herramienta adecuada para incrementar tanto la robustez como la sensibilidad del análisis de muestras degradadas o con escasa cantidad de ADN [182].
- El papel de los SNPs se relaciona con el análisis de muestras complicadas como huesos, con lo que se recomienda la utilización de cebadores que amplifiquen SNPs para desastres de masas, donde los análisis tienen que tratar con muestras muy comprometidas, pero que pueden ser llevadas a cabo independientemente de las bases de datos nacionales de ADN [187].
- Existe un núcleo de loci utilizados en las bases de datos nacionales, que será reservado y convertido a miniSTRs por el rediseño de cebadores, acercándolos a la región de la estructura del STR [161, 188].
- Los nuevos multiplexes deberían ser equivalentes en sensibilidad a las reacciones multiplexes existentes, lo que significa que se logran perfiles completos por debajo de 250 ng de ADN no degradado usando métodos de PCR estándares [182].
- Es importante reconocer que el objetivo principal no es generar sistemas supersensibles o equivalentes a bajo número de copias, sino facilitar la detección de ADN parcialmente degradado. Este método aumenta el poder de discriminación, lo que mejora la efectividad de las comparaciones entre bases nacionales [182].

EDNAP y ENFSI recomendaron así, el diseño de nuevos STRs multiplexes por implementación de dos estrategias, que deberán ser realizadas de forma paralela: la primera estrategia consiste en la adición de nuevos loci a STRs multiplexes preexistentes; y la segunda estrategia consiste en el rediseño de cebadores de loci existentes, con el propósito de reducir el tamaño de los amplicones. Estas dos estrategias deben converger con el propósito de establecer un multiplex que aumente la probabilidad de identificación de individuos a partir de muestras de ADN altamente degradado [181].

## **1.6.2. Desarrollo de multiplexes de miniSTRs de nueva generación**

### **1.6.2.1. Estrategias para el desarrollo y validación de miniSTR multiplex**

Los pasos a seguir para el desarrollo de multiplexes de miniSTRs se detallan a continuación. En primer lugar, se rediseñan nuevos cebadores lo más próximos a la unidad de repetición de la región STR, con el objetivo de asegurarse la amplificación de material genético degradado. Este paso requiere el estudio de variaciones tipo INDEL (Inserción/Delección) y SNP de las regiones flanqueantes a la unidad de los STRs, para asegurar la unión del cebador en los diferentes grupos poblacionales. A continuación se estandarizan las condiciones de PCR multiplex. Una vez que se ha puesto a punto la reacción multiplex, se crean escaleras alélicas con el propósito de una correcta designación alélica [189, 190]. El último paso a tener en cuenta es la validación de la reacción. La validación se va a basar, principalmente, en los estudios de concordancia, que van a consistir en comparar los resultados proporcionados por miniSTRs con los obtenidos mediante sistemas existentes ampliamente utilizados. Esta comparación no exige ningún cambio ni en la tecnología empleada, ni en el equipamiento de los laboratorios de Genética Forense [181, 182, 186].

Estos estudios de concordancia son muy importantes para verificar que no existan polimorfismos en las posiciones de los cebadores de los miniSTRs. Estas variaciones pueden ser, bien, mutaciones en la región del extremo 3' del cebador, o bien, inserciones o deleciones en las regiones flanqueantes entre el sitio de unión y la estructura del STR. Ambas pueden dar lugar a discordancias y como consecuencia errores en el genotipado de las muestras [152].

### **1.6.2.2. Sistemas multiplexes de miniSTR autosómicos descritos**

Se han desarrollado numerosas reacciones multiplex con miniSTRs autosómicos que permiten obtener perfiles genéticos suficientemente discriminativos a partir de extractos de ADN altamente degradado (Tabla 3).

Tabla 3. Principales reacciones miniSTRs multiplex descritas en la literatura. \*No concordancia con sistemas comerciales [188].

AÑO	NOMBRE	MARCADORES DE LA REACCIÓN MULTIPLEX	REFERENCIA
2003	Miniplex 1	CSF1PO, TH01, TPOX	[174]
	Miniplex 2	D5S818*, D8S1179, D16S539	
	Miniplex 3	FGA, D7S820, D21S11	
	Miniplex 4	VWA*, D13S317*, D18S51	
	Miniplex 5	PentaD, PentaE, D2S1338	
	Big Mini	CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, D7S820, D21S11	
2004	BodePlex 1	D13S317, D21S11, D7S820, D16S539, CSF1PO	[191]
	BodePlex 2	TPOX, FGA, D7S820, D18S51	
	Big Mini	Multiplex 1: TH01, TPOX, CSF1PO Multiplex 2: FGA, D21S11, D7S820	[163]
	Miniplex	Miniplex 1: D10S1248, D14S1434, D22S1045 Miniplex 2: D12S391, D1S1656, TPOX	[182, 190, 192]
2005	Miniplex	Miniplex 1: D10S1248, D14S1434, D22S1045 Miniplex 2: D1S1677, D2S441, D4S2364	[161]
	MiniSGM	TH01, FGA, D18S51, D16S539, D21S1138, Amelogenina	
	MiniNC01	D10S1248, D14S1434, D22S1045	
2006	Pentaplex	TH01, D3S1358, VWA, FGA, Amelogenina	[193]
	Blue Kit	D3S1358, VWA, FGA	
	NC02	D4S2364, D2S441, D1S1677	
	NC03	D3S3053, D6S474, D20S482	
	NC04	D1GATA113, D2S1776, D4S2408	
	NC05	D1S1627, D5S2500, D8S1115	
	NC06	D3S4529, D6S1017, D9S2157	
	NC07	D9S1122, D10S1435, D12ATA63	
	NC08	D17S1301, D18S853, D20S1082	
NC09	D6S1027, D17S974, D11S4463		
	Bioplex-11	D3S1358, D8S1179, D21S11, TH01, FGA, VWA, D2S1338, D12S391, TPOX, D5S818	[149]
2007	Q8	D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33, D8S1179, D18S51, D21S11	[194]
2008	MiniFiler	D7S820, D13S317, D16S539, D21S11, D2S1338, D18S51, CSF1PO, FGA, Amelogenina	[195]
2012	PowerPlex ESX	D3S1358, D8S1179, TH01, VWA, D10S1248, D12S391, D1S1656, D22S1045, D2S441, D19S433, D21S11	[196]
	I-DNA1	TH01, TPOX, CSF1PO, D13S317, D16S539, VWA, D5S818, D3S1358, D7S820, D8S1179, HUMFIBRA (FGA), D18S51, D21S11, D19S433, Amelogenina	[197]
	I-DNA2	D5S818, D7S820, D13S317, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, D2S1338, VWA, Amelogenina	[197, 198]

### 1.6.2.3. Reacciones de miniSTRs del cromosoma X

El análisis de STRs del cromosoma X a partir de ADN degradado, con el objetivo de resolver casos forenses complejos, ha hecho necesario el desarrollo de reacciones multiplex de miniSTRs del cromosoma X.

Concretamente, cabe destacar las dos reacciones multiplex desarrolladas por Asamura y Diegoli [199, 200] (Tabla 4). Asamura *et al.* [199] describieron en el año 2006 dos reacciones multiplex constituidas por 4 STRs del cromosoma X cada una, cuyos amplicones se encontraban en el rango 76-169 pb. Cinco años más tarde, el grupo de Diegoli *et al.* [200] describió dos multiplexes complementarias, constituidas por 7 y 9 STRs respectivamente. Ambos multiplexes poseen además el marcador SRY, cuyos tamaños, en este caso, no sobrepasaban los 191 pb de longitud, para asegurar de esta forma, su éxito en el análisis de muestras forenses complicadas (Tabla 4).

Algunos de los miniSTRs que se encuentran en las reacciones descritas por Asamura y Diegoli se encuentran dentro de los grupos de ligamiento descritos hasta la fecha por Szibor [47]: DXS8378 pertenece al grupo de ligamiento 1, DXS7132 al grupo de ligamiento 2, HPRTB al grupo de ligamiento 3, DXS7423 y DXS10147 al grupo de ligamiento 4. Otros como DXS6789 al grupo de ligamiento DXS6801- DXS6809-DXS6789 localizado en Xq21 [85], y los STRs DXS7424 y DXS101 al grupo de ligamiento DXS7424-DXS101 localizado en Xq22 [60].

Las mejoras más destacadas de estas reacciones miniSTRs multiplex, con respecto al uso de STRs estándar, son el aumento de la sensibilidad y el rendimiento en el análisis de muestras de ADN degradado. Cabe señalar que estas mejoras son similares a las conseguidas con la utilización de reacciones que incluyen miniSTRs autosómicos.

Así, como resultado del análisis del rango de sensibilidad del límite de detección del ADN, en las dos primeras reacciones multiplex descritas se detectó el tipaje de los 8 loci con éxito a partir de 20 pg de ADN, consiguiendo picos que exceden los 100 RFUs (Relative Fluorescence Units). En cambio, con 10 pg hubo alelos nulos en los STRs más grandes (90-115 pb) [199]. En las otras dos multiplexes se obtuvieron perfiles completos (16 STRs +SRY) con tan sólo 200 pg, con pérdida de uno o dos marcadores utilizando 100 pg de material genético [200].

Con respecto al análisis de rendimiento, ambas multiplexes resultaron ser muy eficaces en los análisis de muestras degradadas. En los análisis que se utilizaron los miniSTRs descritos por

Asamura *et al.* [199], al menos 4 loci fueron tipados con éxito en 22 de las 29 muestras de material degradado correspondiente a hígado, piel y músculo de un cadáver en descomposición, manchas de sangre de 27 años de antigüedad conservadas a temperatura ambiente, y dientes y huesos en descomposición. Los microsatélites DXS7423, GATA31E08, DXS7133 y DXS7424 (76-133pb) pudieron ser tipados en más de 20 muestras, mientras que DXS6789 y DXS101 (122-169 pb) pudieron ser tipados en un poco menos de la mitad del total de muestras. En los análisis de ADN degradado analizado por los multiplexes descritos por Diegoli *et al.* [200], se consiguieron perfiles completos a partir de algunas muestras de hueso de 65 años de antigüedad.

Tabla 4. Reacciones miniplex de STRs del cromosoma X descritas en la literatura.

AÑO	MARCADOR	MULTIPLEX	RANGO DE ALELOS	RANGO TAMAÑOS AMPLICON	REFERENCIA
2006	DXS7423	1	12-16	99-115	[199]
	GATA31E08		7-15	101-133	
	DXS6789		14-24	122-162	
	DXS101		21-30	142-169	
	DXS7133	2	6-12	76-100	
	DXS7424		11-18	79-100	
	GATA165B12		8- 13	90-110	
	DXS8378		9-13	95-111	
2011	GATA165B12	1	8-13	92-112	[200]
	DXS7130		9-14, 16, 13.3-18.3	93-136	
	GATA31E08		7-16	95-131	
	DXS6789		14-25	124-168	
	DXS101		14- 31, 33	126- 177	
	DXS7424		9- 20	146- 185	
	DXS9902		7- 14, 10.1-12.1	167-191	
	DXS7423	2	8, 12-17	85- 125	
	DXS6795		6, 8-17	90- 111	
	DXS8378		8- 15	94- 118	
	DXS6803		7-14, 16, 10.3-14.3	102- 130	
	GATA172D05		6- 13	122-150	
	HPRTB		7- 16	148- 176	
	DXS7132		10- 18, 16.3	149- 177	
DXS10147	5-11	165- 185			
	DXS9902		7- 14, 10.1-12.1	167- 191	

En la actualidad pocas reacciones multiplex proporcionan la posibilidad de analizar un número elevado de loci del cromosoma X a partir de extractos de ADN que no superen las 150-200 pb, tamaño habitualmente considerado para loci miniSTRs, ni tampoco las 240 pb, tamaño

característico en el ADN altamente degradado, al ser el correspondiente a una unidad nucleosómica.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos que permitan obtener perfiles genéticos fiables de loci localizados en el cromosoma X, incluso a partir de extractos de ADN altamente degradados.

## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### II.1. JUSTIFICACIÓN

El análisis de marcadores autosómicos se emplea fundamentalmente en el campo de la Genética Forense con el objetivo de obtener perfiles genéticos para resolver casos de criminalística o de parentesco.

Sin embargo, la eficacia de los STR autosómicos se ve reducida en la resolución de determinados casos de parentesco, tales como aquellos en las que la muestra de alguno de los miembros familiares no está disponible y la descendencia es femenina. En estos casos, se hace necesario el análisis del ADN de los individuos mediante herramientas basadas en el análisis de STRs del cromosoma X con el fin de aumentar el número de loci analizados y alcanzar una probabilidad suficiente de parentesco.

En numerosas ocasiones, se añade la circunstancia de que la muestra objeto de estudio posee el ADN altamente degradado. De esta manera, se dificulta el análisis de individualización con los STRs convencionales y se requiere el desarrollo de herramientas moleculares específicas que permitan la obtención de perfiles genéticos a partir de ADN de reducido tamaño. Así, en los últimos años se ha desarrollado y validado un gran número de métodos de análisis basados en la tecnología de SNPs y miniSTRs que proporcionan la posibilidad de analizar fragmentos de ADN que no superen las 150-200 pb.

Hasta la fecha la mayoría de estos estudios se han limitado al análisis de STRs autosómicos, existiendo una cantidad netamente inferior de multiplexes que permiten analizar un número limitado de los miniSTRs del cromosoma X. Además, existe la necesidad de desarrollar métodos que permitan obtener perfiles genéticos fiables de miniSTRs localizados lo suficientemente cerca en el cromosoma X para establecer haplotipos que permanezcan estables en una familia de generación en generación. El desarrollo de este tipo de reacciones puede ser de gran utilidad en la resolución de casos complejos de parentesco con el poder de discriminación suficiente, en especial, a partir de extractos de ADN altamente degradado.

Asimismo, la existencia de una subestructura poblacional dentro de una misma población puede influir en la valoración de la prueba de paternidad, por lo que disponer de los datos de las frecuencias alélicas y haplotípicas de los marcadores del cromosoma X de diferentes grupos, permite hacer una correcta interpretación de este tipo de análisis complejos de parentesco.

### II.2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo de tesis doctoral ha sido el desarrollo de nuevas herramientas moleculares para aumentar la eficacia del análisis de muestras de ADN altamente degradado.

En particular, analizar microsatélites del cromosoma X que se encontrasen lo suficientemente próximos para ser analizados conjuntamente como haplotipos, útiles a la hora de reconstruir la constitución cromosómica de pedigríes familiares.

Para la consecución del objetivo principal se propusieron los siguientes objetivos generales:

- Desarrollar un protocolo de PCR para amplificar seis microsatélites agrupados en dos bloques haplotípicos del cromosoma X en la misma reacción, denominada sextaplex: DXS10079- DXS10074- DXS10075 localizado en Xq12 y DXS6801- DXS6809- DXS6789 localizado en Xq21.
- Desarrollar una nueva reacción multiplex denominada miniX, que permita el análisis de miniSTRs de los microsatélites incluidos en la reacción sextaplex. Se incluyó en la reacción otros 2 microsatélites, DXS7132 y DXS6799, por encontrarse cercanos al primer y segundo bloque respectivamente.
- Comparar los resultados con los loci del cromosoma X (DXS6809, DXS7132 y DXS6789) mediante la reacción decaplex optimizada y validada en un estudio colaborativo del GEP-ISFG.

Estos objetivos generales permitirán cumplir los siguientes objetivos específicos:

- Validar la reacción miniX para su uso en identificación humana. Dicha validación consiste en ensayos de optimización de los conjuntos de cebadores y parámetros de PCR, estudios de concordancia, ensayos de determinación de porcentaje de alelos tartamudos e intensidad relativa entre picos heterocigóticos, y estudios de sensibilidad. Los estudios de concordancia se llevan a cabo comparando el tipaje de los X-STRs compartidos con las reacciones decaplex y sextaplex.
- Explorar la capacidad de análisis de la reacción miniX a partir del análisis de muestras degradadas y comparar la eficacia de esta reacción con las multiplexes decaplex y sextaplex.

- Analizar estadísticamente los 15 X-STRs en las 2 poblaciones de estudio mediante las reacciones miniX, sextaplex y decaplex. La reacción miniX comparte con sextaplex los loci DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809 y DXS6789, y con decaplex los loci DXS7132, DXS6809 y DXS6789, e incluye el locus DXS6799.
- Comprobar si existen diferencias significativas entre la distribución de las frecuencias alélicas de los 2 grupos poblacionales, costa de Cantabria y valle del Pas, con el propósito de una interpretación correcta en el análisis parentesco que involucren personas procedentes de poblaciones aisladas. El estudio incluirá el análisis del equilibrio de HWE y desequilibrio de ligamiento de los microsatélites analizados en las dos subpoblaciones de estudio.
- Estudiar los parámetros de eficacia forense de los 15 X-STRs, para comprobar la utilidad de estas reacciones multiplex en la resolución de casos complejos forenses y/o de parentesco.
- Estudiar la recombinación meiótica entre y dentro de los bloques haplotípicos, a partir de tríos familiares, para comprobar si existe ligamiento entre los loci analizados. A continuación, el objetivo será establecer las frecuencias haplotípicas en hombres y mujeres de los bloques haplotípicos DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 en Xq12 y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 en Xq21 de los dos grupos poblacionales de estudio. Además, se estimará la tasa de mutación para los 15 X-STRs de estudio.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Población de Cantabria: objeto de estudio

La población objeto de estudio en este trabajo es una provincia ubicada en el Norte de España, Cantabria, la cual limita al este con País Vasco, al oeste con Asturias y al sur con las provincias de Palencia y Burgos, pertenecientes a la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Tiene una población de aproximadamente 590,000 habitantes. La distribución poblacional resulta desequilibrada debido a que el 70% de la población se reparte en el 10% de la superficie provincial, localizándose principalmente en las zonas costeras. Solamente las dos ciudades principales, Santander, capital de provincia, y Torrelavega, suman casi la mitad de la población de la provincia [201].

En cambio, la parte sur de Cantabria es un área montañosa con muchos valles, que tradicionalmente han tenido dificultades de comunicación, por lo que sus habitantes han tenido menores oportunidades de interaccionar social y económicamente con el resto de áreas. El ejemplo más representativo lo constituye el valle del Pas, situado en el límite de Cantabria con Burgos, una comunidad aislada dedicada, mayoritariamente, al ganado, con un estilo tradicional de vida seminómada a corta distancia, trasladándose en primavera y verano con el ganado a las montañas y regresando a los valles de partida en invierno [202].

Como consecuencia de este aislamiento, cuando se analiza el material genético de la población del valle del Pas, aún teniendo el mismo lenguaje y las mismas características étnicas que el resto de la población cántabra, se revela una subestructura poblacional a nivel microgeográfico. Estas diferencias son mayores en los microsatélites de los cromosomas sexuales que en los microsatélites autosómicos. La mayor capacidad de los STRs localizados en los cromosomas sexuales para detectar la subestructura de las poblaciones, se debe al menor tamaño de la población efectiva (hay cuatro cromosomas autosómicos por cada 3 cromosomas X y por cada cromosoma Y) lo que resulta en una velocidad mayor de la deriva genética; a la menor frecuencia de recombinación (los cromosomas X sólo recombinan en las meiosis femeninas, y el cromosoma Y sólo recombina con el cromosoma X en regiones teloméricas) y a que las mutaciones en los cromosomas X tienden a ocurrir con menor frecuencia, lo que explica una diversidad genética más baja [69]. Por lo tanto, los cromosomas sexuales son más propensos a mostrar diferencias poblacionales. Así se ha demostrado en algunos estudios de STRs de esta población aislada de Cantabria [137, 139, 202, 203].

### III.2. Selección de las muestras

Para el presente trabajo se utilizaron muestras control de ADN humano, muestras de saliva de individuos de la población en estudio y muestras de ADN altamente degradado a partir de tejidos incluidos en parafina. Todas las personas, incluidas en el estudio, aceptaron participar voluntariamente en el mismo tras la información verbal recibida. Las muestras se registraban y procesaban anónimamente, por este motivo no se recabaron los consentimientos informados escritos.

#### III.2.1. Muestras control de ADN humano

Se utilizaron los ADN controles 9947A del kit AmpFISTR® Yfiler (AB: Applied Biosystems, Foster City, California) y K562 (Promega® Corporation, EEUU), procedentes, respectivamente, de líneas celulares humanas femeninas y masculinas.

#### III.2.2. Muestras de la población

Se tomaron muestras de saliva de un total de 439 individuos sanos, correspondientes a 157 tríos familiares. 365 individuos (agrupados en 116 familias) residían en la ciudad costera de Santander y 74 individuos (agrupados en 22 familias) eran residentes del valle del Pas. En todos los casos, las familias estaban constituidas por abuelo materno, madre y al menos un hijo varón. La Tabla 5 muestra con detalle la constitución de las familias de cada grupo poblacional.

Tabla 5. Familias incluidas en el estudio.

	COSTA DE CANTABRIA	VALLE DEL PAS
<b>NÚMERO DE FAMILIAS</b>	116	22
<b>FAMILIAS CONSTITUIDAS POR 1 NIETO</b>	106	19
<b>FAMILIAS CONSTITUIDAS POR 2 NIETOS</b>	7	2
<b>FAMILIAS CONSTITUIDAS POR 3 NIETOS</b>	2	0
<b>FAMILIAS CONSTITUIDAS POR 4 NIETOS</b>	1	1
<b>NÚMERO TOTAL DE INDIVIDUOS</b>	365	74
<b>NÚMERO DE TRÍOS FAMILIARES</b>	130	27

#### **III.2.3. Muestras de ADN altamente degradado**

Se analizaron 24 muestras de ADN extraídas de hígado y corazón incluidos en bloques de parafina, originarios de autopsias del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Las muestras de tejido permanecieron entre 72-96 horas en formol antes de su inclusión en parafina. Estas muestras fueron recopiladas y mantenidas a temperatura ambiente entre los años 1969 y 2012.

#### **III.3. Extracción de ADN**

Los ADN procedentes de los hisopos de saliva pertenecientes a las muestras poblacionales se obtuvieron mediante extracción por el sistema comercial *illustra blood genomicPrep Mini Spin kit* (GE Healthcare, Barcelona, España) y los procedentes de tejidos incluidos en parafina por el método *cobas® DNA Sample Preparation Kit* (Roche Diagnostics SL, Barcelona, España).

##### **III.3.1. Extracción de ADN a partir de hisopos de saliva**

Se realizó mediante el sistema comercial *illustra blood genomicPrep Mini Spin kit*. En primer lugar, se añadió a la muestra un tampón de lisis y la proteinasa K. El tampón de lisis contiene una sal caotrópica, la cual permitió separar el ADN de sus células, desnaturalizar los componentes proteicos y promover la unión selectiva del material genético a una membrana de sílice contenida en una columna. La proteinasa K fue la encargada de digerir las proteínas de las muestras debido a que es activa incluso cuando en las muestras están presentes inhibidores enzimáticos, tales como el EDTA y detergentes.

A continuación, el resto de orgánulos, membranas, proteínas y resto de contaminantes desnaturalizados fueron fácilmente eliminados por los siguientes lavados de la membrana de sílice con un tampón de lavado que contiene etanol. Finalmente, el ADN fue eludido en un tampón de elución, el cual contiene una baja concentración de sales que permitió que el material genético se separase de la membrana de sílice quedando libre en solución acuosa.

Se siguió el protocolo que se describe a continuación:

##### **A. Preparación de muestra**

- Cortar el hisopo y depositarlo en un tubo estéril de 1,5 ml

##### **B. Lisis de las células**

- Añadir 200 µl de tampón fosfato salino (PBS)

- Añadir 20 µl de proteinasa K
- Añadir 400 µl de tampón de lisis
- Mezclar por vórtex durante 15 segundos
- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente
- Dar un pulso de centrifuga durante unos segundos

#### **C. Unión del ADN a la membrana de sílice de las columnas**

- Cargar la muestra en una columna con tubo colector
- Centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto
- Decantar el sobrenadante

#### **D. Lavado 1**

- Añadir 500 µl de tampón de lisis
- Centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto
- Decantar el sobrenadante

#### **E. Lavado 2**

- Añadir 500 µl de tampón de lavado
- Centrifugar a 13300 rpm durante 3 minutos
- Decantar el sobrenadante

#### **F. Elución**

- Cambiar el tubo colector por un tubo estéril de 1,5 ml
- Añadir 150 µl de tampón de elución precalentado a 70°C en estufa
- Incubar 1 minuto a temperatura ambiente
- Centrifugar a 11000 rpm durante 1 minuto
- Recoger sobrenadante (DNA) y almacenar a 4°C ó a -20°C para su almacenamiento a largo plazo

#### **III.3.2. Extracción de ADN a partir de bloques de parafina**

El método de extracción con el sistema comercial *cobas*<sup>®</sup> *DNA Sample Preparation Kit* permite procesar muestras de tejido fijados en formol e incluidos en parafina. Una sección de tejido de 5 micras desparafinado con xileno fue lisado, mediante incubación a temperatura elevada, con una proteasa y un tampón de lisis con agente caotrópico, permitiendo la liberación de los

ácidos nucleicos y la protección de las DNAsas. A continuación, se añadió isopropanol a la mezcla, que es de esta manera centrifugada en una columna que contiene un filtro constituido por una fibra de vidrio. Durante la centrifugación, el ADN genómico se unió a la superficie del filtro, mientras que otras sustancias como sales, proteínas y otras impurezas fueron eliminadas. Los ácidos nucleicos adsorbidos fueron lavados y a continuación eluidos con una solución acuosa.

Se siguió el protocolo que se describe a continuación:

#### **A. Desparafinación de tejidos**

- Depositar una sección de 5 micras de tejido en un tubo eppendorf que contenga 500  $\mu$ l de xileno. Mezclar por vórtex durante 10 segundos
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Añadir 500  $\mu$ l de etanol absoluto y mezclar por vórtex durante 10 segundos
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos y decantar el sobrenadante sin tocar el pellet. Si está flotando, centrifugar de nuevo 1 minuto a la misma velocidad
- Añadir 1 ml de etanol absoluto y mezclar por vórtex durante 10 segundos
- Centrifugar a 13000 rpm durante 2 minutos y decantar el sobrenadante sin tocar el pellet. Si está flotando, centrifugar de nuevo 1 minuto a la misma velocidad
- Secar el pellet a 56 °C, al menos durante 10 minutos, con los tubos abiertos hasta que se evapore el etanol

#### **B. Extracción de ADN de tejidos**

- Añadir 180  $\mu$ l de tampón de lisis y 70  $\mu$ l de proteinasa K sobre el tubo con tejido
- Mezclar por vórtex durante 30 segundos. Verificar que el tejido está sumergido en el líquido
- Incubar a 56°C durante 1 hora
- Mezclar por vórtex durante 10 segundos. Verificar que el tejido está sumergido en el líquido
- Incubar a 90°C durante 1 hora
- Enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Dar un pulso de centrífuga de 3 segundos

- Añadir 200 µl de tampón de lisis/unión y homogeneizar mediante pipeteos de aspiración/dispensación hasta conseguir que la muestra sea homogénea
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos
- Añadir 100 µl de isopropanol y homogeneizar mediante pipeteos de aspiración/dispensación
- Transferir todo el líquido del tubo mediante pipeteo a la columna con tubo colector
- Centrifugar a 5400 rpm durante 1 minuto
- Retirar y decantar el tubo de desecho y sustituirlo por uno nuevo
- Añadir 500 µl de tampón de lavado I
- Centrifugar a 5400 rpm durante 1 minuto
- Decantar el sobrenadante
- Añadir 500 µl de tampón de lavado II
- Centrifugar a 5400 rpm durante 1 minuto
- Retirar y descartar el tubo colector y sustituirlo por uno nuevo
- Centrifugar a 13 000 rpm durante 1 minuto
- Retirar y descartar el tubo colector y colocar la columna en un tubo eppendorf
- Añadir 100 µl de tampón de elución en el centro del filtro sin tocarlo
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Centrifugar a 5400 rpm durante 1 minuto para recoger el ADN extraído en el tubo eppendorf

#### **III.4. Cuantificación de ADN**

La cuantificación de la concentración de ADN de una muestra es un proceso muy importante a la hora de llevar a cabo un gran número de técnicas de Biología Molecular. Con respecto al proceso de amplificación de ADN, tanto el exceso como el defecto de la cantidad de material genético pueden influir en el análisis de la muestra, hasta el punto de comprometer la obtención de resultados concluyentes. Por ello, el conocimiento de la cantidad de ADN obtenida a partir de la extracción, fue una cuestión crucial para realizar el siguiente paso.

La cuantificación de las muestras de ADN utilizadas para la optimización de las reacciones multiplex se realizó por fluorimetría mediante Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, California), y el resto de muestras de la población por espectrofotometría mediante el NANODROP ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware).

#### **III.4.1. Cuantificación de ADN mediante fluorimetría**

Este método consiste en emplear colorantes específicos que se vuelven fluorescentes cuando se unen específicamente al ADN. Estas sustancias fluoróforas son específicas para sus moléculas diana y no se unen a contaminantes como fenol, cloroformo, y/o nucleótidos libres. El resultado es una lectura de fluorescencia la cual es proporcional a la cantidad exacta de ADN detectada. Para medir la fluorescencia se utilizó el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, California). La cantidad exacta de ADN se determinó mediante la comparación de la muestra problema con muestras de cantidad de ADN conocidas. El ensayo es altamente selectivo para ADN de doble cadena y permite determinar concentraciones de ADN entre 0,2 y 100 ng utilizando tan sólo 1 microlitro de muestra.

Esta técnica presenta la ventaja de que el ARN no compite con el ADN en la unión al colorante, con lo que la cantidad de éste en la muestra no interfiere en el resultado, pero no proporciona ninguna información de la pureza del mismo.

Se siguió el siguiente protocolo:

##### **A. Preparación de la mezcla fluorocromo - tampón**

- Diluir el fluorocromo en el tampón del kit 1:200

##### **B. Preparación de las muestras estándares**

- Diluir el estándar 1 y 2 en la mezcla inicial fluorocromo- tampón 1:20

##### **C. Preparación de la muestra**

- Diluir la muestra en la mezcla fluorocromo-tampón 1:100
- Mezclar por vórtex durante 2-3 segundos
- Incubar durante 2 minutos

##### **D. Calibración del fluorímetro QUBIT usando los estándares 1 y 2**

##### **E. Lectura de las muestras problema**

##### **F. Cálculo de la concentración final de la muestra**

$$\text{Concentración} = ((QF \times 100) / 1000) \times \text{factor de dilución (ng/}\mu\text{l)}$$

### **III.4.2. Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría**

Este método se basa en la determinación de la absorción de luz ultravioleta por las bases aromáticas nitrogenadas que contienen los ácidos nucleicos. En esta cuantificación se emplea un espectrofotómetro y se realizan lecturas de absorbancia a diferentes longitudes de onda. La lectura a 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos de la muestra. Se toma como referencia que una densidad óptica medida a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de ADN.

El espectrofotómetro además de valores de concentración también permite obtener valores de relación ADN/proteínas y ADN/solventes orgánicos mediante las medidas de absorbancia a las longitudes de onda  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  respectivamente, las cuales aportan información sobre la pureza del ADN extraído. Un ADN de doble cadena de gran pureza da lugar a valores entre 1,8- 2.

La contaminación del ADN genómico con ARN o proteínas puede afectar negativamente al resultado y el ratio  $A_{260}/A_{280}$  dar valores significativamente más bajos que los anteriores. Esta técnica permite detectar concentraciones entre 2ng/µl- 3700 ng/µl de ADN de doble cadena.

### **III.5. Análisis de STRs del cromosoma X**

#### **III.5.1. Microsatélites del cromosoma X incluidos en este estudio**

En la Tabla 6 se detalla información sobre los microsatélites incluidos en nuestro estudio, según la información recogida en la base de datos (<http://www.chrx-str.org/>). En la 2ª columna se detalla el número de acceso a GenBank según la información recogida en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), en la 3ª y 4ª columna aparece la estructura de la repetición del STR con sus respectivos rangos de alelos y la 5ª, 6ª y 7ª columna hacen referencia a la localización citogenética, localización física en Mb según NCBI, y la localización genética en cM interpolada por regresión usando Rutgers Map v.2. respectivamente [88].

Tabla 6. Información del número de acceso a GenBank según la información recogida en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e información detallada de la estructura de la repetición, rango de alelos, localización citogenética, física y genética de los microsatélites incluidos en el estudio según la información recogida en la base de datos (<http://www.chrx-str.org/>) [88].

X-STRs	Acceso a Genbank	Estructura de la repetición	Rango de alelos	Localización citogenética	Localización Física (Mb) NCBI	Localización genética (cM) Rutgers Map v.2
DXS8378	G08098.1	(CTAT) <sub>8-14</sub>	8-14	Xp 22.31	9,330	20,21
DXS9902	627261.1	(TAGA) <sub>8-16</sub>	8-16	Xp 22.2	15,234	32,32
DXS7132	G08111.1	(TCTA) <sub>11-17</sub>	11-17	centrómero	64,572	90,75
DXS10079	[204]	(AGAA) <sub>10-21</sub> AGAG (AGAA) <sub>3</sub> (AGAA) <sub>5</sub> AGA (AGAA) <sub>10</sub> AGAG (AGAA) <sub>3</sub> (AAGA) <sub>7-10</sub>	14-25 19.3 7-10	Xq12	66,632	90,82
DXS10074	AL356358.19	(AAGA) <sub>10-18</sub> AAGG (AAGA) <sub>2</sub> AA (AAGA) <sub>13</sub> AAGG (AAGA) <sub>2</sub> (TAGA) <sub>5</sub> TGA (TAGA) <sub>7</sub> (TAGA) <sub>4</sub> TGA (TAGA) <sub>9-11</sub> (TAGA) <sub>5</sub> TGA (TAGA) <sub>11-16</sub>	13-21 16.2 12 13-15 16-21	Xq12	66,894	90,83
DXS10075	[204]	(TAGA) <sub>5</sub> TGA TAGA TA (TAGA) <sub>10</sub> (TAGA) <sub>5</sub> TGA (TAGA) <sub>9</sub> TGA (TAGA) <sub>2</sub> (TAGA) <sub>5</sub> TGA (TAGA) <sub>3</sub> TGA (TAGA) <sub>12-13</sub>	16.2 16.3 20.3, 21.3	Xq12	66,915	90,83
DXS9898	L29742.1	(TATC) <sub>2</sub> -(ATC)-(TATC) <sub>8-13</sub> (TATC) <sub>2</sub> -(ATC)-(TATC)-(ATC)-(TATC) <sub>5</sub>	10- 15 8.3	Xq21.31	87,682	101,29
DX6801	G09742.1	(ATCT) <sub>6-12</sub> -N7-(ATCT) <sub>2</sub> (CTAT) <sub>7</sub> (ATCT) <sub>3</sub> -N <sub>9</sub> -(TATC) <sub>3</sub> (ATCT) <sub>3</sub> - N <sub>10</sub> -(ATCT) <sub>11-13</sub> (CTAT) <sub>8-9</sub> (ATCT) <sub>3</sub> -N <sub>9</sub> -(TATC) <sub>3</sub> (ATCT) <sub>5</sub> - N <sub>10</sub> -(ATCT) <sub>11</sub> (CTAT) <sub>8-9</sub> (ATCT) <sub>3</sub> -N <sub>9</sub> -(TATC) <sub>3</sub> (ATCT) <sub>5</sub> - N <sub>10</sub> -(ATCT) <sub>13</sub> (CTAT) <sub>9</sub> (ATCT) <sub>3</sub> -N <sub>9</sub> -(TATC) <sub>3</sub> (ATCT) <sub>5</sub> - N <sub>10</sub> -(ATCT) <sub>14-17</sub> (CTAT) <sub>10</sub> (ATCT) <sub>3</sub> -N <sub>9</sub> -(TATC) <sub>3</sub> (ATCT) <sub>5</sub> - N <sub>10</sub> -(ATCT) <sub>17</sub>	8-14 27-29 30-31 32-33 34-37 38	Xq21.32	92,378	106,08
DXS6809	G08112.1	(TATG) <sub>8</sub> (TATC) <sub>6</sub> (TATG) <sub>9-11</sub> (TATC) <sub>6</sub> (TATC) (TATG) <sub>7</sub> (TATC) <sub>9</sub> (TATC) (TATG) <sub>10</sub> (TATC) <sub>7</sub> (TATC) (TATG) <sub>9</sub> (TATC) <sub>9</sub> (TATC) (TATG) <sub>10</sub> (TATC) <sub>9-13</sub> (TATC) (TATG) <sub>11</sub> (TATC) <sub>13</sub>	14 15-17 17v 18 19 20-24 25	Xq21.33	94,825	108,12
DXS6789	G08105.1	(TATC) <sub>8-14</sub>	8-14	Xq21.33	95,336	108,47
DXS6799	L30412.1	(TATC) <sub>8-14</sub>	8-14	Xq21.33	97,265	110,71
DXS7133	G08113.1	(ATAG) <sub>9-14</sub>	7-14	Xq22.3	108,928	118,18
GATA172D05	AC003014.1	(TAGA) <sub>5-12</sub>	5-12	Xq23	113,061	124,36
GATA31E08	G08104.1	(AGAT) <sub>7-16</sub>	7-16	Xq27.1	140,062	160,54
DXS7423	AC109994.2	(TCCA) <sub>3</sub> TCTGTCCT(TCCA) <sub>9-15</sub>	12-18	Xq28	149,460	184,19

La amplificación de los microsatélites del cromosoma X incluidos en el estudio se realizó por la técnica PCR mediante tres reacciones:

- Una reacción multiplex denominada decaplex que amplifica 10 X-STRs simultáneamente, la cual se optimizó y validó en un estudio colaborativo del GEP-ISFG [105].
- Una reacción multiplex denominada sextaplex que amplifica 6 X-STRs simultáneamente, la cual se desarrolló y optimizó en nuestro propio laboratorio.
- Una reacción multiplex que emplea 8 miniSTRs del cromosoma X, denominada miniX, la cual se desarrolló y validó en nuestro propio laboratorio.

### III.5.2. Amplificación por PCR mediante la reacción decaplex

#### III.5.2.1. Componentes de la reacción

La reacción de amplificación decaplex incluye un Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemania), y un Primer Mix, con las 10 parejas de cebadores para amplificar los X-STRs: DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS9902 y DXS6789 (Tabla 7). Cada pareja de cebadores se encuentra a una concentración de 0,2  $\mu$ M.

Tabla 7. Secuencias de los cebadores, marcaje fluorescente de uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores, rango de alelos y tamaño de los amplificadores de los X-STRs de la reacción decaplex [65, 105].

X-STR	Secuencia de cebadores (5'-3')	Marcaje fluorescente 5'	Rango de alelos	Tamaño de los amplificadores (pb)
<b>DXS8378</b>	TTAGGCAACCCGGTGGTCC	6-FAM <sup>TM</sup>	8-14	106-130
	ACAAGAACGAAACTCCAACCTC	-		
<b>DXS9898</b>	CGAGCACACCTACAAAAGCTG	6-FAM <sup>TM</sup>	8.3-15	152-177
	TAGGCTCACCTCACTGAGCA	-		
<b>DXS7133</b>	CACTTCCAAAAGGGGAAAAA	6-FAM <sup>TM</sup>	7- 14	185- 213
	ACTTGTACTTGGTGGGAGGAA	-		
<b>GATA31E08</b>	GCAAGGGGAGAAGGCTAGAA	6-FAM <sup>TM</sup>	7-16	224-260
	TCAGCTGACAGAGCACAGAGA	-		
<b>GATA172D05</b>	TAGTGGTGATGGTTGCACAG	VIC <sup>®</sup>	5-12	104-132
	ATAATTGAAAGCCCGGATTC	-		
<b>DXS7423</b>	GTCTTCCTGTCATCTCCAAC	VIC <sup>®</sup>	12-18	175-199
	TAGCTTAGCGCCTGGCACATA	-		
<b>DXS6809</b>	TCCATCTTTCTCTGAACCTTC	VIC <sup>®</sup>	27-38	230-274
	TGCTTTAGGCTGATGTGAGG	-		
<b>DXS7132</b>	TCCCCTCATCTATCTGACTG	NED <sup>TM</sup>	11-17	124-148
	CACTCCTGGTGCCAACTCT	-		
<b>DXS9902</b>	CTGGGTGAAGAGAAGCAGGA	NED <sup>TM</sup>	8-16	170-202
	GGCAATACACATTCATATCAGGA	-		
<b>DXS6789</b>	CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA	NED <sup>TM</sup>	14-25	249-293
	ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG	-		

*III.5.2.2. Protocolo de amplificación*

Se amplificaron los 10 X-STRs a partir de 1ng de ADN molde utilizándose el protocolo de la reacción de amplificación detallada en la Tabla 8.

Tabla 8. Protocolo de reacción de amplificación decaplex.

REACTIVOS	VOLUMEN $\mu$ L
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5
10X Primer Mix (2 $\mu$ M cada cebador)	1
Agua bidestilada estéril	3
ADN molde (1ng/ $\mu$ l )	1
Volumen final	10

Por cada amplificación se utilizaron dos controles de amplificación, un control negativo (agua bidestilada estéril) con el fin de detectar posibles contaminaciones de ADN externo, y un control positivo utilizado como referencia para el tipaje de las muestras.

*III.5.2.3. Condiciones de amplificación*

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 9700 PCR System (AB), en las siguientes condiciones (Tabla 9):

Tabla 9. Condiciones de amplificación de la reacción decaplex.

	Desnaturalización Inicial	10 ciclos			20 ciclos			Extensión final
<b>Temperatura</b>	95 °C	94 °C	60°C	72°C	94 °C	58°C	72°C	60°C
<b>Tiempo</b>	15 min	30 s	90 s	60 s	30 s	90 s	60 s	60 min

**III.5.3. Amplificación por PCR mediante la reacción sextaplex**

La reacción sextaplex incluye 6 X-STRs agrupados en dos bloques haplotípicos: DXS10079-DXS10074-DXS10075 localizado en Xq12 y DXS6801-DXS6809-DXS6789 localizado en Xq21.

### III.5.3.1. Componentes de la reacción

La reacción de amplificación sextaplex incluye un Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemania) y las 6 parejas de cebadores a una concentración de 10  $\mu$ M para amplificar los X-STRs: DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809 y DXS6789.

Las secuencias de los cebadores correspondían a las publicadas previamente por el grupo de Szibor *et al.* [85, 86]. Para reducir la adenilación incompleta, se añadieron en los extremos 5' una G y una cola GTTT a los cebadores inversos DXS10079 y DXS10074 respectivamente [86] (Tabla 10).

Teniendo en cuenta los tamaños de los productos amplificados, el cebador para DXS6809 fue marcado con el fluorocromo VIC<sup>®</sup> (verde), el cebador para DXS6789 con NED<sup>™</sup> (amarillo), y los cebadores para DXS10074, DXS10075, y DXS10079 con el fluorocromo PET<sup>®</sup> (rojo) (Tabla 10).

Tabla 10. Secuencias de cebadores [85, 86], marcaje fluorescente de uno de los oligonucleótidos de cada pareja de cebadores, rango de alelos y tamaño de los amplificados de los X-STRs de la reacción sextaplex. La base **G** y la cola **GTTT** añadidas a la secuencias DXS10079 y DXS10075 respectivamente aparecen en negrita [86].

X-STR	SECUENCIA DE CEBADORES (5'-3')	MARCAJE FLUORESCENTE 5'	Rango de alelos	Tamaño de los amplificados (pb)
<b>DXS10079</b>	AGATTGTGCCAATGCTCTCC <b>GTTT</b> GCCTGTGTTGTAACATCCTT	PET <sup>®</sup> -	14- 25	271- 315
<b>DXS10074</b>	ACTTCCTACTGCCCCACCTT <b>GTTT</b> CCCCCTCAGAGAGCTGACACA	PET <sup>®</sup> -	7- 21	171- 227
<b>DXS10075</b>	AGGAGGGGCCTAGACAAGTG CAGATTATGCTTGGGCCTGT	PET <sup>®</sup> -	12- 21.3	218- 257
<b>DXS6801</b>	CATTCCTCTAACAAGTCTCC CAGAGAGTCAGAATCAGTAG	PET <sup>®</sup> -	8- 14	113- 137
<b>DXS6809</b>	TCCATCTTTCTCTGAACCTTCC TGCTTTAGGCTGATGTGAGG	VIC <sup>®</sup> -	27- 38	230- 274
<b>DX6789</b>	CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG	NED <sup>™</sup> -	14- 25	249- 293

### III.5.3.2. Protocolo de amplificación

La concentración de ADN y la concentración óptima de cebadores se optimizaron mediante el estudio de los electroferogramas. En este sentido, el análisis de 3 ng de ADN mediante la reacción sextaplex con una concentración inicial de cada cebador de 10  $\mu$ M, alcanzó un equilibrio entre la intensidad de la señal y la ausencia de solapamiento entre las señales correspondientes a diferentes fluorocromos. El protocolo de la reacción de amplificación se detalla en la Tabla 11.

Tabla 11. Protocolo de reacción de amplificación sextaplex.

REACTIVOS	VOLUMEN $\mu\text{L}$
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5
Cebador (10 $\mu\text{M}$ )	1
ADN molde (3ng/ $\mu\text{l}$ )	1
Volumen final	18

#### III.5.3.3. Condiciones de amplificación

A continuación, se procedió a optimizar las condiciones de amplificación de la reacción PCR multiplex (temperatura de hibridación de los cebadores, número de ciclos y tiempo de extensión) en un termociclador GeneAmp® 9700 PCR System (AB). Los mejores resultados se obtuvieron en las siguientes condiciones (Tabla 12).

Tabla 12. Condiciones de amplificación de reacción sextaplex.

	Desnaturalización Inicial	10 ciclos			20 ciclos			Extensión final
Temperatura	95° C	94 °C	60°C	72°C	94 °C	58°C	72°C	60°C
Tiempo	15 min	30 s	90 s	60 s	30 s	90 s	60 s	60 min

#### III.5.4. Análisis de los fragmentos amplificados por electroforesis capilar

##### III.5.4.1. Preparación de la muestra

Se mezclaron por muestra, 24,5  $\mu\text{l}$  de Hi-Di Formamide (AB) con 0,5  $\mu\text{l}$  de Gene Scan 500 Liz (AB). A continuación, se añadió 1,5  $\mu\text{l}$  de producto de PCR. Las muestras fueron desnaturalizadas por calentamiento a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente enfriadas a 4°C.

##### III.5.4.2. Condiciones de análisis

La detección y separación de los productos amplificados fue llevada a cabo por electroforesis capilar en el analizador genético ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (AB) usando el polímero POP-4™ (AB), que funciona de soporte para la separación de los fragmentos, y el tampón EDTA 10X (AB) para establecer el campo eléctrico. El voltaje de electroforesis utilizado fue 15 kV y el tiempo de inyección 5 segundos. Los tamaños de los productos amplificados se determinaron

automáticamente usando el programa GeneMapper ID® Analysis software 3.2. (AB). A continuación, a estos productos amplificados se les asignaron sus correspondientes alelos. La designación de los alelos se realizó comparando los tamaños de los productos amplificados de las muestras con los tamaños de los productos amplificados correspondientes a las líneas celulares k562 (Promega® Corporation, EEUU) y 9947A (AB) cuyo tipaje es conocido previamente. Además, en el caso de la reacción sextaplex, se construyó una escalera alélica con el objetivo de facilitar dicha designación.

#### *III.5.4.3. Construcción de la escalera alélica para la reacción sextaplex*

La construcción de la escalera alélica para una reacción multiplex consiste en elaborar una escalera individual para cada STR incluido en la reacción. La construcción de las escaleras alélicas para cada locus se programó mediante la selección de individuos de diferentes genotipos con el objetivo de incluir tantos alelos distintos presentes en las poblaciones humanas como fuera posible.

En una primera etapa, se coamplificaron cada una de las muestras individualmente utilizando los mismos cebadores de la reacción multiplex y se generó una mezcla artificial que contuviera cada producto amplificado producido anteriormente. El volumen de cada producto amplificado fue ajustado con el fin de obtener una escalera con las alturas de sus alelos bien equilibradas.

En una segunda etapa, se diluyó cada escalera alélica individual obtenida, con agua destilada entre 1/100-1/1000 000 y a continuación se reamplificaron cada una de ellas de nuevo utilizando los mismos cebadores.

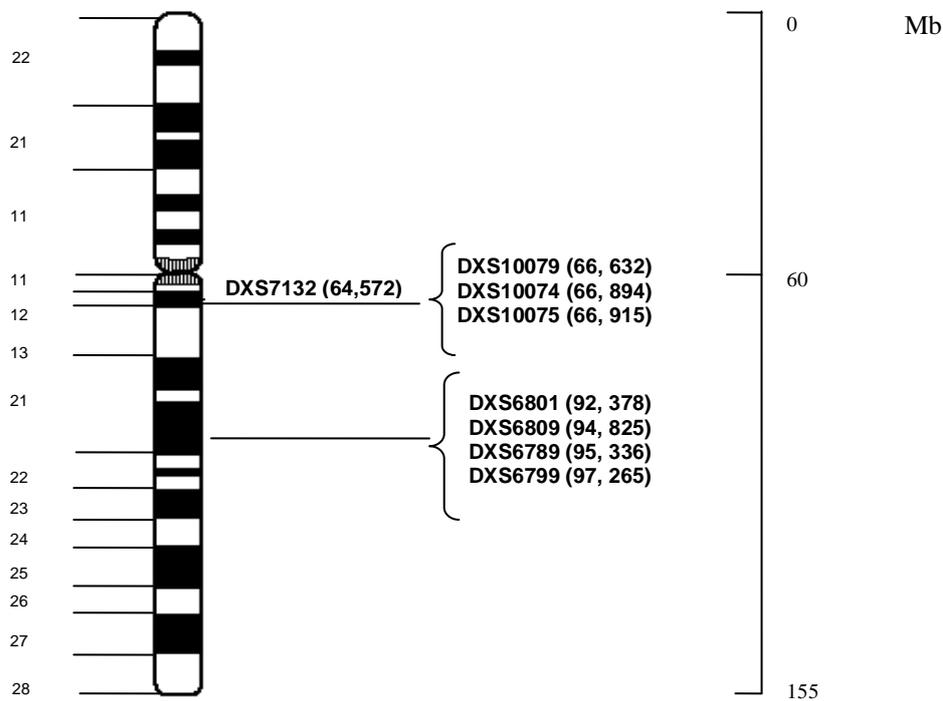
Una vez que se construyó cada escalera alélica para cada STR, en una tercera etapa, se mezclaron todas las escaleras individuales conjuntamente en un mismo tubo, con el propósito de obtener una escalera alélica para la reacción sextaplex. La escalera alélica se preparó y se cargó en el secuenciador de igual manera que las muestras problemas.

### **III.6. Desarrollo de una reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X**

#### **III.6.1. Selección y diseño del conjunto de cebadores**

Se seleccionaron ocho microsatélites del cromosoma X para rediseñarlos como “miniSTRs”: seis de ellos agrupados en los bloques haplotípicos, DXS10079-DXS10075-DXS10074 [86] y DXS6801-DXS6809-DXS6789 [85], y los otros dos STRs, DXS7132 y DXS6799, elegidos por estar localizados cercanos al primer y segundo bloque respectivamente (Figura 4).

Figura 4. Localización de los STRs en las bandas correspondientes del cromosoma X. Los números en paréntesis representan su posición física (en Mb) ([www.chrx-str.org](http://www.chrx-str.org)).



Se utilizó el programa Perlprimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) para rediseñar los nuevos cebadores que amplificasen los 8 loci STRs en base a las secuencias de referencia, cuyos números de acceso a GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se recogen en la Tabla 6. Las secuencias de los STRs DXS10079 y DXS10075 fueron obtenidas de un trabajo del grupo de Szibor *et al.* [204].

El software incluye la posibilidad de especificar los valores de los parámetros de amplificación requeridos para que los cebadores proporcionen la amplificación de sus secuencias diana. Las principales consideraciones que se tuvieron en cuenta a la hora de diseñar cebadores fueron las siguientes: una temperatura de hibridación ( $T_m$ , “*melting temperature*”) que se encontrase en el rango de 57- 63°C, con una diferencia entre cebador directo e inverso de 1- 2°C; una longitud de la secuencia que estuviera comprendida entre 18- 30 bases, y un porcentaje de bases guanina y citosina entre 40-60%. Entre los cebadores que diseñó el programa se seleccionaron aquellos con un extremo 3’ más estable, para evitar en la medida de lo posible la formación de estructuras secundarias. Se utilizó *BLAST primers*, con el fin de asegurar que las secuencias no presentaban homología con otras secuencias diana en el genoma humano.

Las regiones flanqueantes a los STR analizados se estudiaron mediante SNPblast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snpblastByChr.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snpblastByChr.html)) con el fin de evitar posiciones variables en la

región de unión de todos los cebadores diseñados. Se diseñaron cebadores capaces de producir amplificadas que en ningún caso excedieran las 200 pb y que abarcasen todos los alelos pertenecientes a cada microsatélite en particular, en base a la información recogida en ChrX-STR.org 2.0 (<http://www.chrx-str.org>) (Tabla 6). Se espaciaron los rangos de alelos de los loci adyacentes en tamaño, al menos 8 pb, con el fin de evitar solapamientos entre alelos correspondientes a loci diferentes, para asegurar así un correcto genotipado.

Se llevaron a cabo amplificaciones de cada locus, utilizando reacciones que incluían los cebadores sin marcar, y posteriormente se comprobaron dichas amplificaciones en geles de agarosa al 2%. Además, la línea celular K562 fue secuenciada para confirmar la amplificación de cada X-STR diana. La secuenciación se llevó a cabo en las siguientes fases:

**A. Reacción de amplificación**

- Se amplifica la muestra con cada pareja de cebadores por separado utilizándose una reacción de amplificación preparada con los siguientes reactivos (Tabla 13). Se ajustan los volúmenes de los reactivos en el laboratorio a partir de las cantidades recomendadas por el fabricante.

Tabla 13. Reactivos para la primera fase de amplificación en el proceso de secuenciación.

REACTIVOS	VOLUMEN $\mu$ L
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	25
Cebador (10 $\mu$ M )	1,5
ADN molde (3ng/ $\mu$ l )	3
Agua estéril	19
Volumen final	50

- La amplificación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp® 9700 PCR System (AB), en las siguientes condiciones (Tabla 14):

Tabla 14. Condiciones de amplificación.

	Desnaturalización Inicial	10 ciclos			28 ciclos			Extensión final
<b>Temperatura</b>	95° C	94 °C	60°C	72°C	94 °C	58°C	72°C	60°C
<b>Tiempo</b>	15 min	30 s	90 s	60 s	30 s	90 s	60 s	60 min

**B. Comprobación de la amplificación**

Se comprobó que los fragmentos de ADN fueron amplificados, en una electroforesis en gel de agarosa 2% utilizando la tinción de bromuro de etidio y observación bajo luz UV.

**C. Fase de purificación (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, Hilden, Alemania)**

Antes de llevar a cabo la secuenciación de los productos de PCR fue importante purificarlos, con el objetivo de que los restos de dNTPs, cebadores, productos de PCR parcialmente amplificados o todos aquellos componentes que pudiesen interferir en la reacción de secuenciación fuesen eliminados. Este protocolo se basó en la purificación a través de una membrana de sílice, que permitió la adhesión del ADN en la presencia de una alta concentración de sales y un valor de  $\text{pH} \leq 7,5$ , mientras que el resto de contaminantes atravesaron la membrana.

Se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

- Cargar en columna 5  $\mu\text{l}$  de tampón de purificación por cada microlitro amplificado
- Centrifugar 13000 rpm durante 1 min
- Decantar el sobrenadante
- Añadir 750  $\mu\text{l}$  de tampón de lavado
- Centrifugar 13000 rpm durante 1 min
- Decantar el sobrenadante
- Volver a centrifugar
- Decantar el sobrenadante
- Colocar la columna en un tubo eppendorf
- Añadir 30  $\mu\text{l}$  de tampón de elución (10mM TRIS pH 8,5)
- Incubar 2 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar 1 minuto para recoger el producto amplificado purificado en el tubo eppendorf

**D. Reacción de secuenciación (dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (AB))**

Esta fase se basa en la incorporación de dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorocromos diferentes a una cadena de ADN durante el proceso de copiado de la misma. La reacción de secuenciación necesita la hebra molde, un solo cebador de la pareja y una mezcla adecuada de la enzima Taq polimerasa, el cofactor  $\text{MgCl}_2$  y

tampón de la enzima, los cuatro dNTPs y los cuatro ddNTPs marcados (Terminator Ready Reaction Mix).

Se llevó a cabo dos reacciones por cada pareja de cebadores (en nuestro caso 16 reacciones) utilizándose una reacción de secuenciación preparada con los siguientes reactivos (Tabla 15). Los volúmenes de los reactivos se ajustaron en el laboratorio, a partir de las cantidades recomendadas por el fabricante.

Tabla 15. Reactivos para la reacción de secuenciación.

REACTIVOS	VOLUMEN $\mu$ L
Terminator Ready Reaction Mix	6
DMSO	1
Cebador (10 $\mu$ M )	1
Producto amplificado	10
Volumen Final	18

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp<sup>®</sup> 9700 PCR System (AB), en las siguientes condiciones (Tabla 16):

Tabla 16. Condiciones de amplificación de la reacción de secuenciación.

		25 ciclos		
Desnaturalización inicial		Desnaturalización	Hibridación	Extensión
<b>Temperatura</b>	94° C	96 °C	50°C	60°C
<b>Tiempo</b>	3 min	10 s	5 s	4 min

#### E. Reacción de precipitación

A continuación, fue necesario llevar a cabo una purificación para retirar los restos de cebadores, exceso de sales y marcadores que producen fluorescencia residual en la lectura de las secuencias.

Para ello se utilizó un protocolo de precipitación del ADN con etanol:

- Añadir 19  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 2mM y 55  $\mu$ l de etanol a cada tubo de reacción de secuenciación
- Centrifugar 20 minutos a 14 000 rpm
- Decantar sobrenadante

- Añadir 250 µl de etanol 75%
- Centrifugar 14 000 rpm
- Decantar etanol
- Secar el exceso en estufa a 37-40 °C durante 10 minutos

#### **F. Preparación de la muestra para secuenciar**

Una vez terminada la precipitación, se prepararon las muestras, para ser cargadas en el secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (AB), de la siguiente manera:

- Añadir por muestra 30 µl de Hi-Di Formamide (AB)
- Esperar 10 minutos para despegar el pellet
- Mezclar por vórtex y dar un spin
- Desnaturalizar las muestras por calentamiento a 95°C durante 5 minutos e inmediatamente enfriarlas a 4°C

#### **G. Análisis de las muestras**

Para el análisis de las secuencias se usó el programa *AB DNA Sequencing Analysis software v.5.2.* (AB).

#### **III.6.2. Optimización del conjunto de cebadores**

La optimización del conjunto de cebadores consistió en las siguientes fases. En una primera fase de optimización, se efectuaron amplificaciones PCR singleplex de cada locus y en una segunda fase, se ensayaron diversos conjuntos de cebadores. Es en una tercera fase, cuando se agruparon los loci en reacciones PCR y los cebadores directos de dichas reacciones se marcaron en el extremo 5' con los fluorocromos 6-FAM™ (azul), NED™ (amarillo), VIC® (verde), PET® (rojo) (AB). Por último, los distintos conjuntos de cebadores se agruparon en una única reacción PCR multiplex.

#### **III.6.3. Optimización de la reacción de amplificación**

La reacción miniX incluía Multiplex PCR master Mix (Qiagen) cuya cantidad fue ajustada en el laboratorio de acuerdo a las cantidades recomendadas por el fabricante, 8 parejas de cebadores (uno de cada pareja marcado en el extremo 5') a diferentes concentraciones, ADN molde a 0,5 ng/µl y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 10 µl (Tabla 17).

Tabla 17. Reactivos para la amplificación de miniSTRs.

REACTIVOS	VOLUMEN $\mu$ L
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5
Primer Mix	1,58
ADN molde (0,5 ng/ $\mu$ l )	1
Agua estéril	2,42
Volumen final	10

Se analizó el rendimiento de la amplificación en un termociclador GeneAmp® 9700 PCR System (AB), en diferentes condiciones de temperaturas de hibridación: 57 °C, 58 °C, 60,5 °C, 61,8 °C y 63 °C, a distintos números de ciclos: 28, 29, 30, 31 y 32 ciclos y a tiempos de extensión final de 30, 45, 60 y 90 minutos. Los mejores resultados se obtuvieron en las siguientes condiciones (Tabla 18).

Tabla 18. Condiciones de amplificación de miniX.

		30 ciclos			
Desnaturalización Inicial		Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
Temperatura	95° C	94 °C	58°C	72°C	60°C
Tiempo	15 min	30 s	90 s	60 s	60 min

#### III.6.4. Análisis de los fragmentos amplificados por electroforesis capilar

Se analizó una alícuota de 2  $\mu$ l de cada producto amplificado mezclada con 9  $\mu$ l de Hi-Di™ Formamide (AB) y 0,3  $\mu$ l de GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (AB). Tras la desnaturalización de los amplificados (5 minutos a 95 °C) se enfriaron (5 minutos a 4 °C) y se separaron en un ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (AB). Los resultados de la electroforesis fueron analizados mediante el software Genmapper versión 3.2 (AB).

#### III.6.5. Construcción de la escalera alélica para la reacción miniX

La construcción de la escalera alélica para la reacción miniX se realizó tal y como se detalla en el apartado *Construcción de escalera alélica para la reacción sextaplex*.

**III.7. Validación de la reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X**

Una vez desarrollada la reacción multiplex denominada miniX, se procedió a su validación de acuerdo con el *Guidelines- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SGWDAM)* [205]. Dicha validación consistió en estudios de concordancia, estudios de sensibilidad, ensayos de determinación de porcentaje de alelos tartamudos, y determinación de la intensidad relativa entre picos heterocigóticos (del inglés, *Peak Height Ratio, PHR*).

**III.7.1. Estudios de concordancia**

Se compararon los resultados obtenidos por cada una de las tres reacciones descritas anteriormente (miniX, decaplex, sextaplex). Para este estudio se realizó una comparación del tipaje de las madres pertenecientes a cada uno de los tríos familiares. MiniX comparte 3 de sus 8 STRs con decaplex (DXS7132, DXS6809 y DXS6789), y 6 con sextaplex (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809 y DXS6789) (Tabla 19).

Tabla 19. X-STRs que constituyen la reacción miniX. El símbolo ✓ indica los STRs compartidos por la reacción miniX con las reacciones decaplex y sextaplex.

X-STR miniX	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799
decaplex	✓					✓	✓	
sextaplex		✓	✓	✓	✓	✓	✓	

**III.7.2. Determinación del porcentaje de alelos tartamudos**

Durante el proceso de amplificación por PCR, se va a producir el deslizamiento de la enzima ADN polimerasa que va a generar lo que se denominan bandas tartamudas, que son productos alélicos que se diferencian del alelo verdadero tan sólo en una unidad de repetición [155]. La determinación de bandas tartamudas se llevó a cabo tanto en individuos homocigotos como en heterocigotos que diferían en tamaño en más de 4 pb, y se efectuó calculando el porcentaje de la altura del pico de la banda tartamuda respecto a la altura del pico real.

**III.7.3. Determinación de la intensidad relativa entre picos heterocigóticos (PHR, *Peak Height Ratio*)**

El cálculo de la intensidad relativa de picos heterocigóticos (PHR) se realizó dividiendo la altura del pico menor de los picos entre la altura del pico mayor de cada locus. Se calculó en los individuos heterocigóticos para cada locus, cuyos alelos diferían en dos o más unidades de repetición, para evitar de esta manera la interferencia de las bandas tartamudas [206].

#### **III.7.4. Estudios de sensibilidad**

Con el propósito de determinar la sensibilidad de miniX, se realizaron diluciones seriadas de la línea celular K562 (Promega® Corporation, EEUU) por duplicado, para obtener muestras con concentraciones de ADN de 1000 pg, 500pg, 200 pg, 100 pg, 75 pg, 62,5 pg, 50 pg, 25 pg, 20pg, 10 pg y 5pg.

#### **III.8. Estudio comparativo de la eficacia en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas con miniX con respecto a los métodos decaplex y sextaplex**

La eficacia en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas se realizó mediante el tipaje de 24 muestras de ADN procedentes de tejidos incluidos en parafina, los cuales se caracterizan por una fragmentación generalizada del material genético.

Estas muestras de ADN se analizaron mediante miniX para comprobar la eficacia de la reacción en muestras degradadas y se realizó un estudio comparativo de su capacidad de análisis respecto a las reacciones decaplex y sextaplex. Cada reacción fue realizada con la misma cantidad de ADN (3ng) y con el mismo número de ciclos (30 ciclos).

La intensidad de la señal de un alelo se relaciona con la fiabilidad de la misma, de modo que habitualmente no se realizan genotipados basados en alelos cuya altura no supere las 50-100 RFUs. Sólo se consideraron como STRs analizados con éxito, aquellos en los que se lograba genotipar la totalidad de los alelos presentes en esa muestra. Al no disponer de muestras de referencia se tomaron como análisis completo de un STR aquellos casos en los que se ha logrado obtener dos alelos para una misma muestra o cuando en todos los resultados obtenidos mediante las diferentes reacciones se ha detectado un único alelo.

En primer lugar, se calculó el porcentaje de muestras que pudieron ser tipadas (%) con cada una de las 3 reacciones (miniX, decaplex y sextaplex) descartando aquellos alelos de altura inferior a 50 RFUs.

En segundo lugar, se evaluó el rendimiento en el análisis de las muestras de ADN fragmentadas en base a dos variables: primera, al porcentaje de muestras en las que se logró genotipar cada STR, considerando aquellos alelos con altura comprendida entre 50-200 RFUs y segunda, al porcentaje de muestras en el que el genotipado corresponde a alturas de alelos superiores a 200 RFUs.

Además, se compararon los tamaños de los productos amplificados y se calculó el porcentaje de muestras que pudieron ser tipadas en su totalidad (%) con cada una de estas 3 reacciones,

para cada STR compartido por ambas, con el objetivo de entender los alelos recuperados con el rediseño de miniSTRs.

### **III.9. Valoración forense de los STRs del cromosoma X**

#### **III.9.1. Frecuencias alélicas**

Cada parámetro estadístico fue calculado para cada grupo poblacional independientemente (costa de Cantabria y valle del Pas). Las frecuencias alélicas fueron estimadas mediante el programa GenAIEX (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx>) utilizando sólo los datos genotípicos de las madres de los tríos familiares del estudio.

#### **III.9.2. Comparación entre las poblaciones de estudio**

Para comprobar si existían diferencias significativas entre la distribución de las frecuencias alélicas de los 2 grupos poblacionales se utilizó el test exacto de Fisher, aplicando la extensión de Monte Carlo (nivel de confianza del 95%) con el programa SPSS (SPSS Inc., Chicago, Illinois). El coeficiente de coancestralidad interpoblacional ( $F_{st}$ ) fue estimado mediante el análisis de la varianza (AMOVA) con el programa Arlequin versión 3.1.

#### **III.9.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg**

Mediante el programa GenAIEX (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx>) también se calcularon las posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en las muestras femeninas.

#### **III.9.4. Análisis del desequilibrio de ligamiento**

El análisis del desequilibrio de ligamiento entre cada par de loci en las muestras femeninas se calculó con el programa GDA [207].

#### **III.9.5. Parámetros de eficacia forense**

Los parámetros de eficacia forense calculados fueron: la homocigosidad ( $h$ ), la heterocigosidad esperada ( $H_{esp}$ ), el contenido de información polimorfa (PIC), el poder de discriminación en mujeres ( $PD_{mujeres}$ ) y en hombres ( $PD_{hombres}$ ), la probabilidad de exclusión a priori (PE), el poder de exclusión según se trate de tríos que involucren padre-madre-hijo ( $MEC_{trío}$ ) o solamente padre-hijo ( $MEC_{dúo}$ ). Las fórmulas en cada caso fueron las propuestas por Desmarais [51] y se calcularon en la web Forensic ChrX Research version 2.0 [88].

$$h = \frac{n_i}{N_i}$$

$$HET_{esp} = 1 - \sum p_i^2$$

$$PIC = 1 - (\sum p_i^2) - \sum \sum 2p_i^2 \cdot p_j^2$$

$$PD_{mujeres} = 1 - 2(\sum p_i^2)^2 + \sum p_i^4$$

$$PD_{hombres} = 1 - \sum p_i^2$$

$$MEC_{trío} = 1 - \sum p_i^2 + \sum p_i^4 - (\sum p_i^2)^2$$

$$MEC_{dúo} = 1 - 2(\sum p_i^2) + \sum p_i^3$$

donde  $n_i$  = número de individuos homocigóticos analizados  
 $N_i$  = número total de genotipos analizados  
 $p_i$  = frecuencia del alelo  $i$  en una población de  $n$  muestras  
 $p_j$  = frecuencia del alelo  $(i+1)$

Se calculó el poder de discriminación combinado (CPD) tanto en mujeres como en hombres, a efectos de comparar los tres sistemas valorados, asumiendo la hipótesis (irreal) de que no están ligados, según la fórmula:

$$CPD = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - P_{di})$$

El  $P_{di}$  corresponde al poder de discriminación en mujeres y en hombres y se calcula según las fórmulas descritas anteriormente.

En primer lugar, este valor se calculó para los sistemas miniX, decaplex y sextaplex teniendo en cuenta los loci incluidos en cada sistema. En segundo lugar, se tuvieron en cuenta los microsatélites compartidos y no compartidos por miniX y decaplex cuyos productos amplificados fuesen inferiores a 220 pb: DXS7132, DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809, DXS6789 y DXS6799 para miniX, y DXS8378, DXS7132, DXS9898, DXS9902, GATA172D05, DXS7423 y DXS7133 para decaplex. En tercer lugar, se tuvieron en cuenta solamente los microsatélites compartidos por ambos sistemas cuyos productos amplificados fuesen inferiores a 220 pb: DXS7132, DXS6809 y DXS6789 para miniX, y DXS7132 para decaplex.

Posteriormente, se realizó el mismo cálculo para miniX vs sextaplex teniendo en cuenta, de igual forma, solamente aquellos microsatélites cuyos productos amplificados fuesen inferiores a 220 pb pero en este caso, únicamente los microsatélites compartidos por ambos sistemas:

DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809 y DXS6789 para miniX, y DXS10074 y DXS6801 para sextaplex.

### **III.9.6. Estudio de la segregación meiótica**

Para estudiar la existencia de recombinación en las meiosis maternas, se observó la transmisión de los haplotipos a través de los 157 tríos familiares, por comparación de los haplotipos de las madres con los de sus respectivos hijos. La existencia de recombinación fue observada entre los bloques haplotípicos y dentro de cada uno de ellos. La frecuencia de recombinación es estimada según la fórmula:

$$\theta = \frac{\text{número de recombinaciones}}{\text{número de meiosis informativas}}$$

y transformada a distancia genética, medida en centimorgan (cM), usando la fórmula de Haldane [208],

$$\text{Distancia} = - \frac{1}{2} \ln (1 - 2\theta)$$

Se consideraron meiosis informativas para el conjunto del bloque, cuando la madre es heterocigótica para los 4 STRs del bloque haplotípico, y parcialmente informativas si dos loci que delimitan una región son heterocigóticos para esos loci.

### **III.9.7. Frecuencias haplotípicas de los grupos de ligamiento analizados**

Se calcularon las frecuencias haplotípicas tanto en los abuelos maternos como en las madres pertenecientes a los tríos familiares analizados, para cada grupo de ligamiento propuesto e independientemente para cada grupo poblacional en estudio. Debido a la hemicigosidad del cromosoma X en los abuelos maternos, sus haplotipos fueron establecidos directamente, y los haplotipos en las madres se establecieron por la comparación del genotipo de la madre con el del abuelo materno.

Se calcularon las frecuencias haplotípicas de los siguientes grupos de ligamiento observados en 113 cromosomas masculinos y en 228 cromosomas femeninos para el grupo poblacional de la costa de Cantabria; y observados en 22 cromosomas masculinos y 44 cromosomas femeninos para la población del valle del Pas. Además se detalló el número de haplotipos observados, el haplotipo observado con mayor frecuencia y el número de haplotipos únicos para cada caso. La diversidad haplotípica para cada bloque fue calculada según la fórmula  $1 - \sum p_i$  donde  $p_i$  es la frecuencia haplotípica individual.

**III.9.8. Estudio de mutaciones de los X-STRs**

Las mutaciones fueron estudiadas en ambas meiosis (abuelo materno- madre y madre-hijo). El incremento o aumento de una repetición fue supuesta en base a la observación de la variación de tamaño en 4 pb del producto amplificado. El análisis global de los 15 X-STRs tipados por las tres reacciones del estudio (miniX, decaplex, sextaplex) permitió aclarar en todos los casos, si había ocurrido una mutación o una recombinación entre cada par de STRs perteneciente a cada bloque haplotípico.

La tasa de mutación global se calculó dividiendo el número de mutaciones observadas, entre las que se incluía el número de mutaciones en el abuelo materno (por comparación de su genotipo con el de la madre) más el número de mutaciones en la madre (por comparación de su genotipo con el del hijo), entre el número total de meiosis (meiosis del abuelo materno y meiosis de la madre).

La tasa de mutación por loci, se calculó dividiendo la tasa de mutación global entre el número de loci analizados.

## **IV. RESULTADOS**

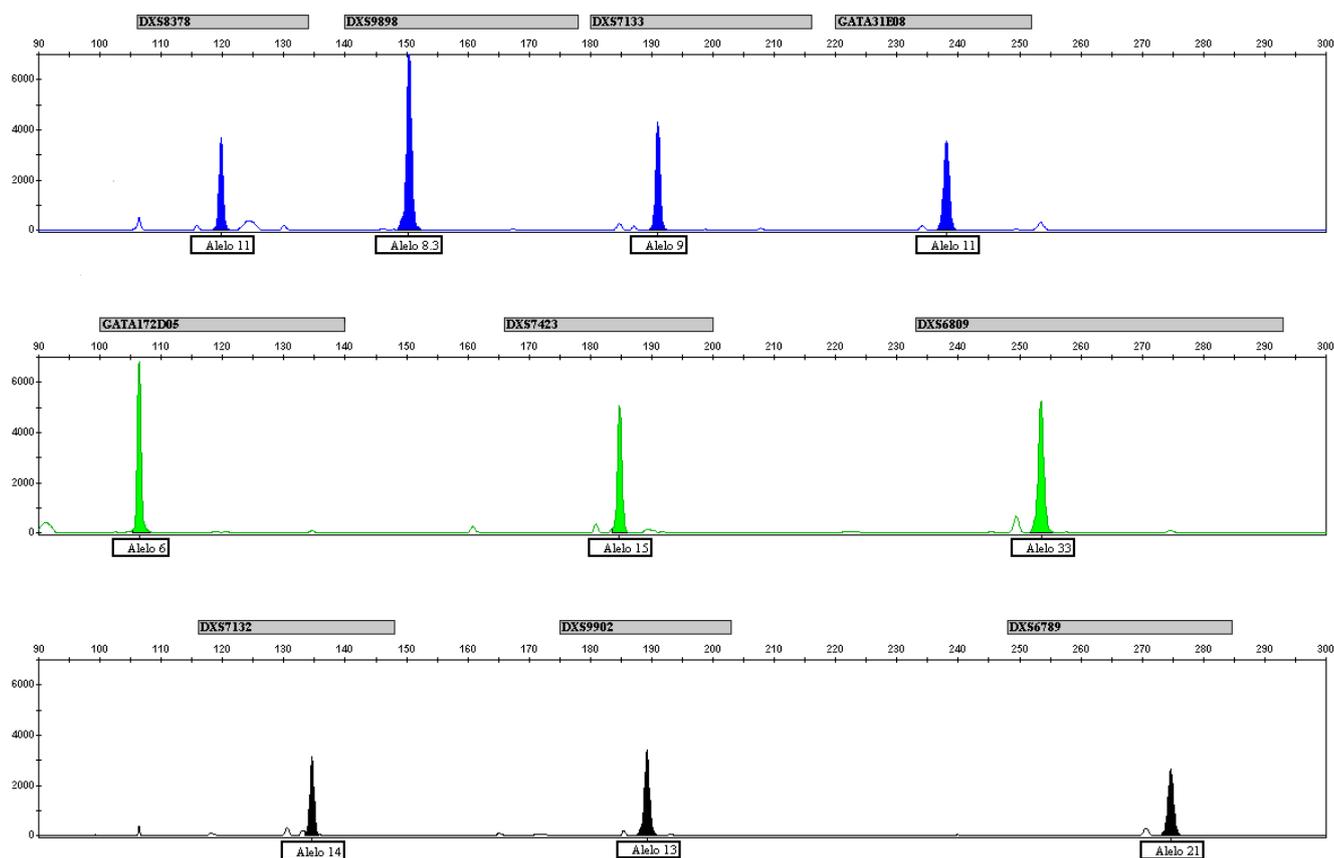
## IV. RESULTADOS

### IV.1. Análisis de STRs del Cromosoma X

#### IV.1.1. Análisis de 10 X-STRs mediante reacción decaplex

Los 10 STRs fueron amplificados (Figura 5) mediante el multiplex optimizado y validado en un estudio colaborativo del GHEP-ISFG [105], obteniéndose el genotipo de estos loci del cromosoma X en la totalidad de 439 individuos (365 residentes en la ciudad costera de Santander y 74 procedentes del valle del Pas).

Figura 5. Electroferograma típico de la reacción decaplex propuesta por Gusmão *et al.* [105]. El eje X representa el tamaño de los productos amplificados en pb y el eje Y representa la altura de los picos en RFUs (*Relative Fluorescence Units*). Los picos de 4 pb más pequeños que el pico principal representan las bandas tartamudas. En los recuadros situados debajo de cada pico se indica el nombre correspondiente de cada alelo.

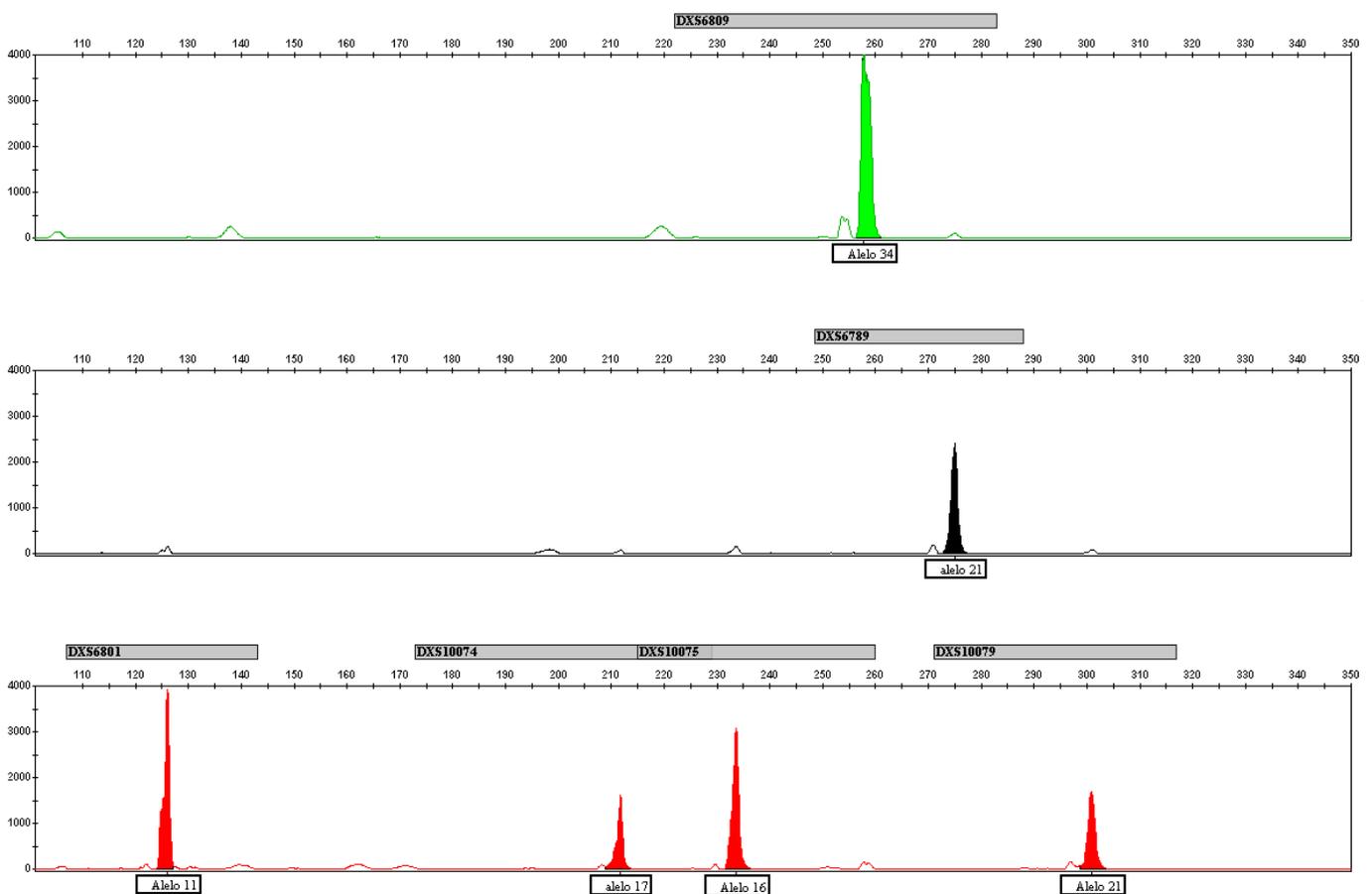


#### IV.1.2. Análisis de 6 X-STRs mediante reacción sextaplex

Los 6 STRs fueron amplificados con éxito en una única reacción mediante el sistema multiplex, en este caso, desarrollado y validado por nuestro propio laboratorio (Figura 6). Análisis

repetidos de muestras de ADN tomadas al azar, daban resultados consistentes. Se genotiparon en total, al igual que con el sistema decaplex, 439 individuos (365 residentes en la ciudad costera de Santander y 74 procedentes del valle del Pas).

Figura 6. Electroferograma típico de la reacción sextaplex desarrollada por nuestro laboratorio. El eje X representa el tamaño de los productos amplificados en pb y el eje Y representa la altura de los picos en RFUs. Los picos 4 pb más pequeños que el pico principal representan las bandas tartamudas. En los recuadros situados debajo de cada pico se indica el nombre correspondiente de cada alelo.



La concentración de cada cebador fue testada entre 0,1- 0,5  $\mu\text{M}$ . Para concentraciones cercanas a 0,1  $\mu\text{M}$  se consiguió amplificar solamente los marcadores DXS6809 y DXS6789.

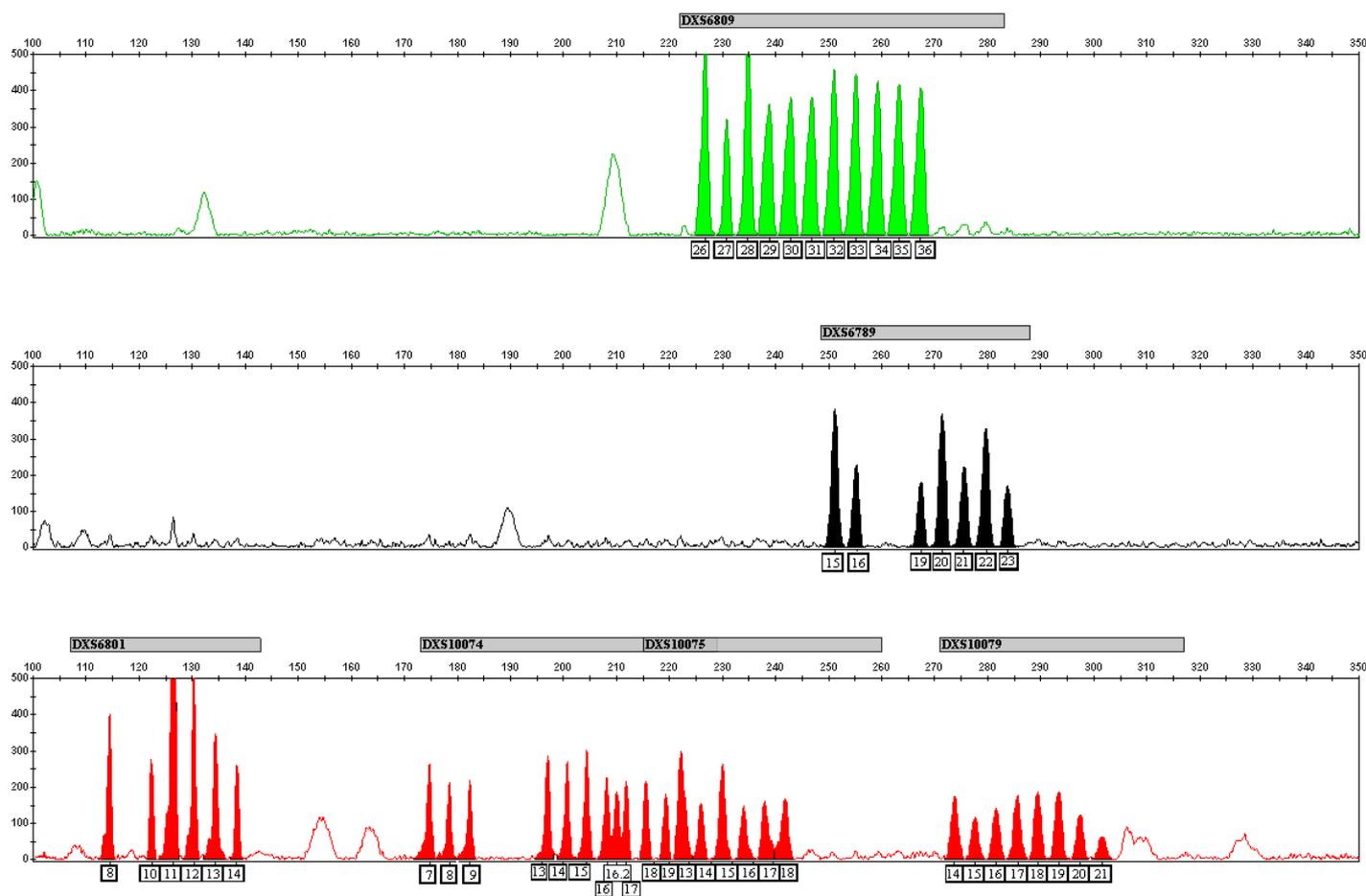
Entre 3-5 ng de ADN molde y una concentración final de 0,5  $\mu\text{M}$  de cada cebador en la reacción PCR, fueron necesarios para obtener resultados fiables (sin pérdidas alélicas ni marcado desbalance entre picos heterocigóticos). Aunque la concentración de los cebadores fue optimizada, la eficiencia de algunas amplificaciones (DXS6801) parece verse afectada por la descongelación y congelación de los mismos.

Las temperaturas de hibridación de los cebadores estuvieron comprendidas entre 54,5 °C y 63,6 °C. Aunque se consiguieron resultados satisfactorios con 10 ciclos a 60°C seguidos de 18-22 ciclos a 58°C, los mejores resultados en la amplificación se consiguieron con 10 ciclos a las temperaturas de 60 °C, seguidos de 20 ciclos a la temperatura de 58 °C.

Las alturas de las bandas tartamudas encontradas fueron en la mayoría de los casos menores del 10% de la altura del alelo verdadero.

La designación de alelos estuvo en concordancia con las recomendaciones propuestas por la ISFG (*International Society for Forensic Genetics*) [33]. Para esta correcta designación alélica se elaboró una escalera alélica tal y como se describe en la sección *Materiales y Métodos* (Figura 7). La escalera alélica contenía el mayor número de posibles alelos presentes en las poblaciones de estudio para cada X-STR incluido en la reacción sextaplex.

Figura 7. Escalera alélica para la reacción sextaplex. La designación alélica de cada locus corresponde al cuadrado debajo de su respectiva señal.



Se encontró una diferencia de 6 pb de los tamaños de los productos amplificados de los alelos cortos (Alelo 7- Alelo 10) del microsatélite DXS10074, entre los descritos por el grupo de Szibor *et al.* [86] y los obtenidos por nuestro grupo [210] (Tabla 20). De esta manera, la designación de los alelos cortos se corroboró por secuenciación, siguiendo el protocolo *dRhodamine Terminator Cycle Sequencing kit* (AB), tal y como se describe en la sección *Materiales y Métodos*.

Tabla 20. Comparación de los tamaños de productos amplificados obtenidos entre el grupo de Szibor *et al.* [86] y el grupo de Zarrabeitia *et al.* [210] utilizando los mismos cebadores para el locus DXS10074.

ALELOS	Estructura repetición	Pb	
		Szibor [86]	Zarrabeitia [210]
7	(AAGA) <sub>7</sub>	165	171
8	(AAGA) <sub>8</sub>	169	175
9	(AAGA) <sub>9</sub>	173	179
10	(AAGA) <sub>10</sub>	177	183

Se comparó el genotipado de 516 alelos de los microsatélites DXS6809 y DXS6789 obtenidos por las reacciones decaplex y sextaplex de las madres pertenecientes a los tríos familiares del estudio. Entre los resultados obtenidos no se encontraron discordancias, lo que supone una concordancia del 100% entre las dos reacciones multiplex.

## **IV.2. Desarrollo de una reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X**

### **IV.2.1. Selección y diseño del conjunto de cebadores**

Se diseñaron 37 cebadores de entre los que se eligieron aquellos capaces de producir amplificadores del menor tamaño posible, que en ningún caso excedieran de 200 pb, cuyas temperaturas de fusión estuvieran comprendidas entre 57,5 y 60,5 °C y que hibridaran en regiones carentes de SNPs e INDELS descritos hasta la fecha en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Fue necesario el diseño de cebadores degenerados para el locus DXS10075, para asegurar la hibridación al sitio de unión del cebador, debido a la presencia de un SNP, rs945048, que consiste en una transversión A/T cercana a la unidad de repetición. El uso de estos cebadores permitió la amplificación, evitando posibles alelos nulos, sin alterar el rendimiento de la amplificación.

Además, para evitar la adenilación incompleta se utilizó la adición de una guanina al extremo 5' del cebador inverso del locus DXS10075. Se consiguió que los amplificadores se extendiesen de 101 a 219 pb con el propósito de abarcar el amplio número de alelos que aparecen descritos en los principales grupos poblacionales según la información recogida en ChrX-STR.org 2.0 (<http://www.chrx-str.org>) (Tabla 21).

Tabla 21. Número de acceso a GenBank, rango de alelos, tamaño del producto amplificado (pb), y secuencias de los cebadores diseñados en dirección 5' a 3' para la amplificación de cada STR en la combinación denominada miniX. La variación (rs945048 A/T) de la secuencia de los cebadores degenerados (*degenerate primers*) aparece subrayada y la base **G** añadida a la secuencia aparece en negrita para el locus DXS10075. En la última columna aparece el marcaje fluorescente.

LOCUS	Acceso a Genbank	RANGO DE ALELOS	Tamaño de los amplificados (pb)	SECUENCIA( 5-3´)	Marcaje fluorescente
DXS6799	L30412.1	8-14	101-125	ACTAGCAA <b>A</b> CTGAATTTAGTAATGTG TAACTACTTGCACATGGGATG	6-FAM™
DXS10074	AL356358.19	7-21	137-193	TACATGGACTTCTACTGC ATACTGAATATAAGCTGATTTGTTCTA	6-FAM™
DXS6789	G08105.1	14-25	106-150	AAGTTGGTACTTAATAAACCCCTC AGAACCAATAGGAGATAGATGG	NED™
DXS6809	G08112.1	27-38	175-219	CATGACTAGATTATGTAGGAATTTGG TGTGAGGAAGAGATAGAGGA	NED™
DXS7132	G08111.1	11-17	106-130	CCCTCTCATCTATCTGACTG CTCTATTAGTCAACGTTCTCC	VIC®
DXS6801	G09742.1	8-14	150-174	CATAATCACATGAGTCATTTCTC ATCTGTATTAGTTATGAGTTCCAG	VIC®
DXS10075	[204]	12-21.3	101-140	AG <u>T</u> TATTGCAGAGAAGAATCATATC AG <u>A</u> TATTGCAGAGAAGAATCATATC <b>G</b> ACTACCTCTGCTCCCTT	PET®
DXS10079	[204]	14-25	147-191	GTGACCAAGTGAGACCAA TTGTTGAGAACTTTTGCATCA	PET®

#### IV.2.2. Optimización del conjunto de cebadores

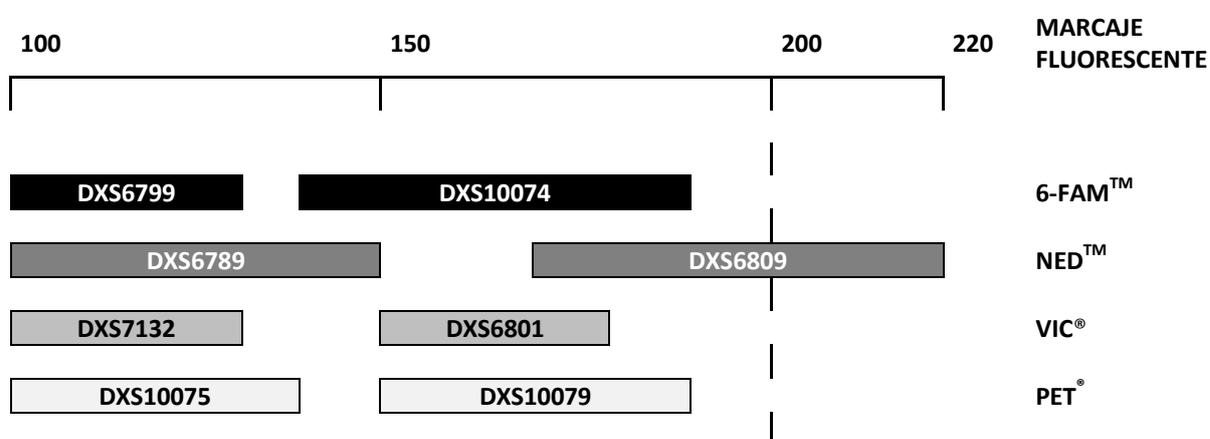
Tras efectuar amplificaciones PCR singleplex de cada locus y ensayar diversos conjuntos de cebadores en multiplex, se seleccionaron 4 reacciones de PCR duplex (duplex A: DXS6799 y DXS10074; dúplex B: DXS6789 y DXS6809; dúplex C: DXS7132 y DXS6801 y dúplex D: DXS100075 y DXS10079). Las reacciones PCR duplex seleccionadas permitían espaciar los rangos de alelos de los loci adyacentes en tamaño, con el objetivo de evitar solapamientos entre alelos correspondientes a diferentes loci.

Los cebadores directos de la reacciones dúplex A, B, C y D se marcaron respectivamente con los marcadores fluorescentes 6-FAM™, NED™, VIC® y PET® (AB). La única excepción la

constituye el locus DXS10075 de la reacción D, en este caso se marcó el cebador inverso con PET®.

Por último, se agruparon los distintos conjuntos de cebadores en una única reacción de PCR multiplex que permite la amplificación de 8 loci STRs, mediante amplicones con tamaño entre 101 y 219 pb. En la Figura 8 se representa el resultado final de la estrategia en el diseño de cebadores para miniX. La reacción miniX comparte 3 X-STRs con la reacción decaplex (DXS7132, DXS6809 y DXS6789) y 6 con la reacción sextaplex (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS809 y DXS6789).

Figura 8. Estrategia en el diseño de cebadores para los 8 STRs incluidos en miniX.



#### IV.2.3. Optimización de la reacción multiplex

La optimización de la reacción de amplificación y de sus parámetros, tales como la concentración óptima de cebadores y de ADN molde, temperatura de hibridación, número de ciclos y tiempo de extensión, se realizó mediante el estudio de los electroferogramas en los que se evaluó la altura de los picos, el balance en heterocigosis de los mismos y la adenilación incompleta.

La concentración de cada pareja de cebadores fue testada entre 0,04  $\mu$ M y 0,6  $\mu$ M. Por debajo de la concentración óptima se observó un aumento en la altura de los picos a medida que se aumentaba la concentración de cebadores. Mientras que a su vez, en concentraciones superiores a la considerada óptima se detectó un aumento tanto del desbalance en heterocigosis como de la adenilación incompleta. Las concentraciones óptimas para cada pareja de cebadores se recogen en la Tabla 22.

Tabla 22. Resumen del intervalo de las concentraciones testadas de los cebadores y la concentración final ( $\mu\text{M}$ ) a la que se emplea cada pareja de los cebadores de miniX.

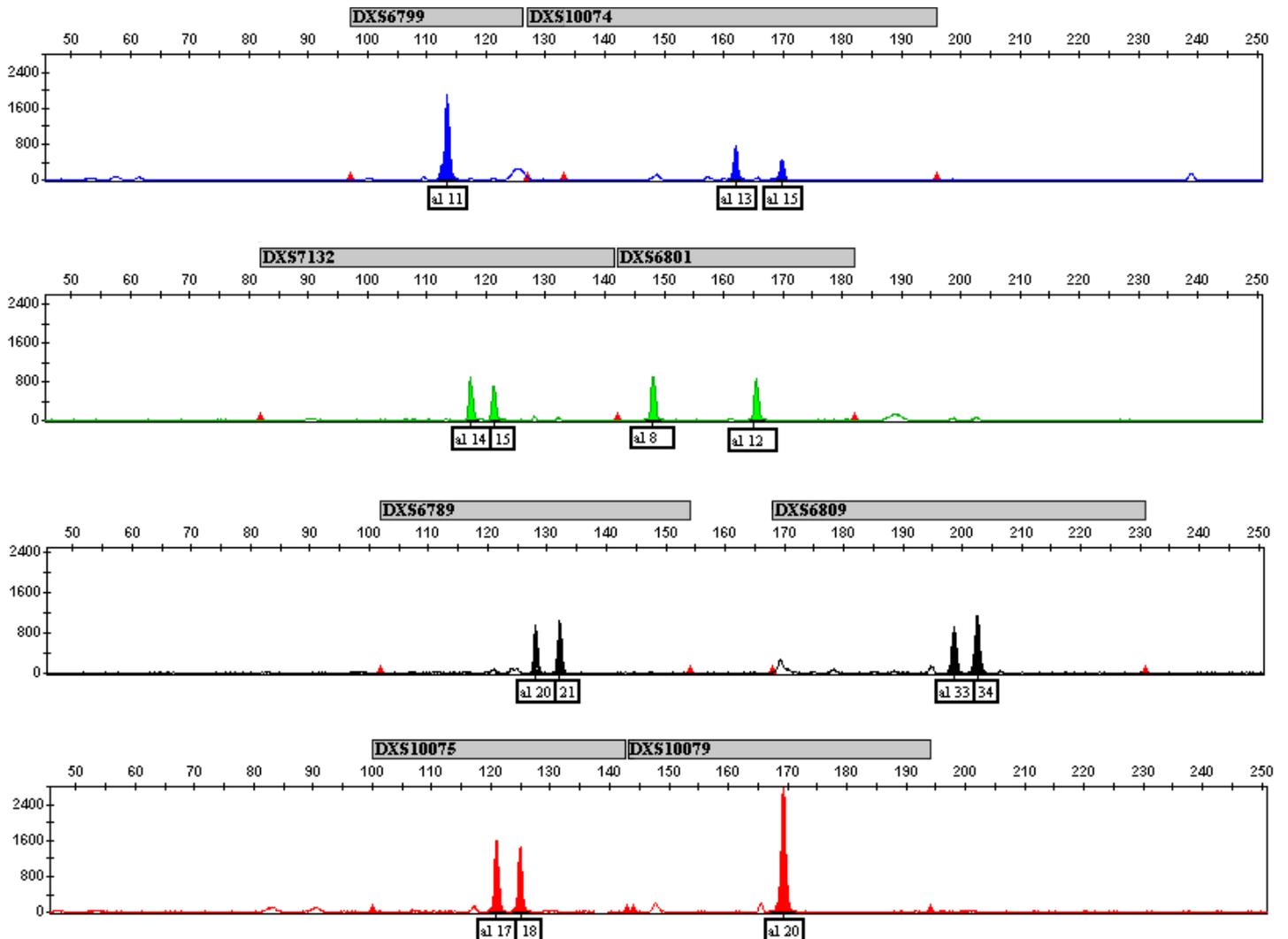
LOCUS	Intervalo concentración de cebadores ( $\mu\text{M}$ )	Concentración óptima de cebadores ( $\mu\text{M}$ )
DXS6799	0,04-0,14	0,08
DXS10074	0,30-0,40	0,32
DXS6789	0,08-0,16	0,08
DXS6809	0,26-0,60	0,60
DXS7132	0,06-0,12	0,06
DXS6801	0,10-0,20	0,12
DXS10075	0,08-0,60	0,16
DXS10079	0,08-0,42	0,16

Además, las intensidades de los loci analizados mediante miniX se equilibró alrededor de 2500 RFUs en homocigóticos, y 1500 RFUs en heterocigóticos, en el análisis de 0,5 ng de ADN, para alcanzar un equilibrio entre la intensidad de la señal y la ausencia de solapamiento entre las señales correspondientes a diferentes fluorocromos.

La amplificación multiplex ofrece resultados aceptables en un amplio rango de temperaturas de hibridación, entre 57-63°C. El aumento de temperatura de hibridación produjo una disminución gradual de la adenilación incompleta, pero también de la altura de los picos. Los mejores resultados se obtienen a 58°C.

Respecto al número de ciclos se obtienen resultados satisfactorios con 28-32 ciclos. El aumento del número de ciclos incrementó de forma generalizada la altura de los picos y la adenilación incompleta. En este sentido, los resultados más equilibrados correspondieron a 30 ciclos. En la Figura 9 se muestra un electroferograma de la reacción miniX.

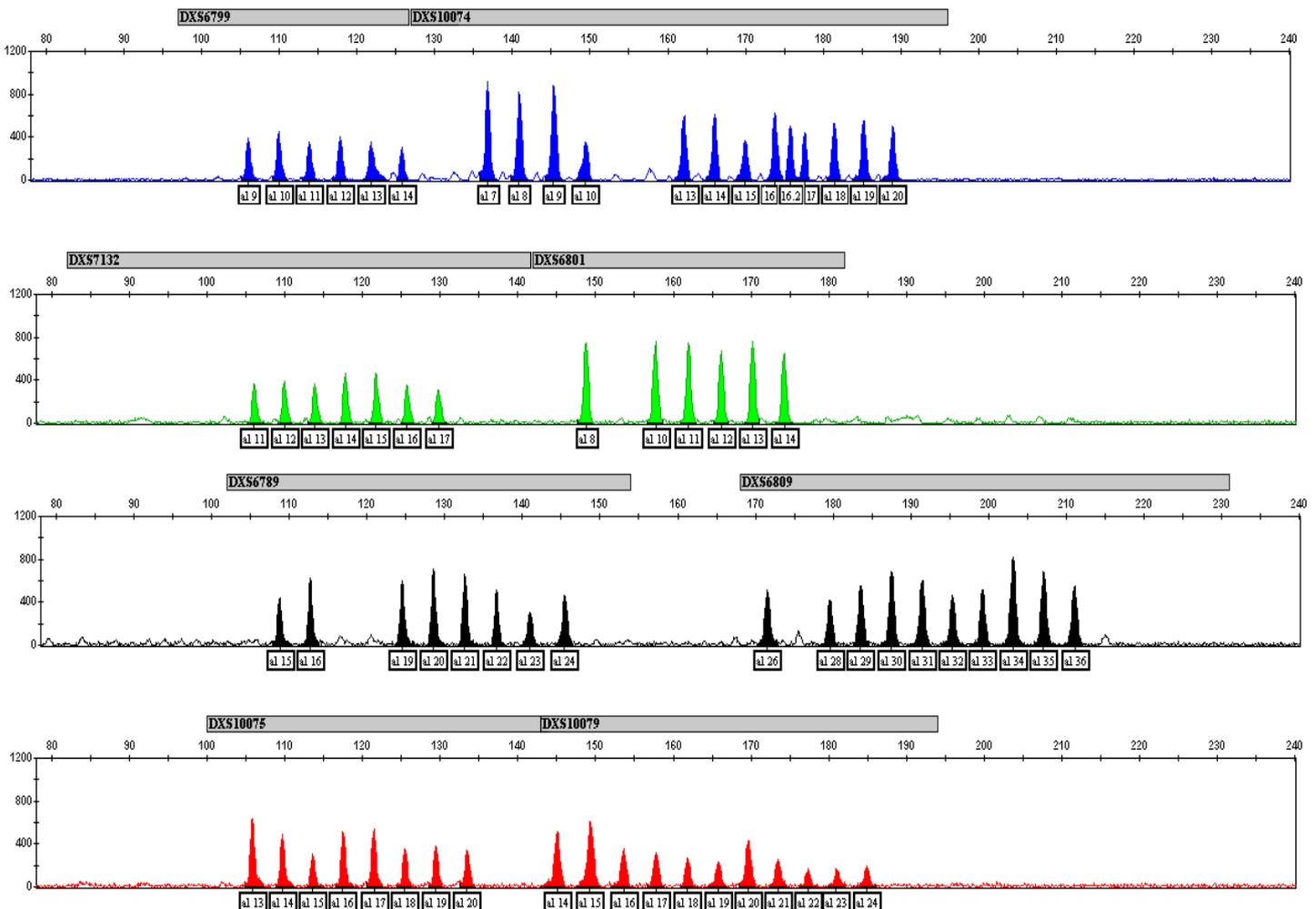
Figura 9. Electroferograma típico de la reacción miniX desarrollada por nuestro laboratorio. El eje X representa el tamaño de los productos amplificados en pb y el eje Y representa la altura de los picos en RFUs. Los picos de 4 pb más pequeños que el pico principal, representan las bandas tartamudas. En los recuadros situados debajo de cada pico se indica el nombre correspondiente de cada alelo.



#### IV.2.4. Escalera alélica para la reacción miniX

Para una correcta designación alélica se elaboró una escalera alélica tal y como se describe en la sección *Materiales y Métodos* (Figura 10). La escalera alélica contenía el mayor número de posibles alelos presentes en las poblaciones de estudio para cada X-STR incluido en la reacción miniX.

Figura 10. Escalera alélica para la reacción miniX. La designación alélica de cada locus es asignada en un cuadrado debajo de su respectiva señal.



### IV.3. Validación de la reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X

#### IV.3.1. Estudios de concordancia

Los estudios de concordancia se llevaron a cabo mediante el análisis del genotipado de las madres pertenecientes a los tríos familiares del estudio. Se compararon los resultados obtenidos en el genotipado de 773 alelos obtenidos por miniX y decaplex [105], y la comparación del genotipado de 1516 alelos obtenidos mediante miniX y sextaplex. Entre los resultados obtenidos no se encontraron discordancias, lo que supone una concordancia del 100% entre las tres reacciones multiplex. Este resultado demuestra la fiabilidad de la reacción miniX.

### IV.3.2. Determinación del porcentaje de alelos tartamudos

Los picos correspondientes a alelos tartamudos, resultado del deslizamiento de la polimerasa, se traducen en la mayoría de los casos en un pico 4 pb menor que el alelo real. Los resultados para cada locus con miniX se recogen en la Tabla 23.

Tabla 23. Altura de alelos tartamudos (% del alelo real) de loci STRs analizados con miniX.

	n	Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<b>DXS6799</b>	405	6,3	5,9	2,3	1,9	18,3
<b>DXS10074</b>	494	5,2	4,8	2,7	0,5	18,2
<b>DXS6789</b>	416	10,5	10,2	2,2	2,4	18,5
<b>DXS6809</b>	436	11,6	11,2	2,7	4,6	22,1
<b>DXS7132</b>	423	8,0	7,9	2,6	1,2	17,9
<b>DXS6801</b>	408	5,0	4,7	1,8	0,5	13,4
<b>DXS10075</b>	396	8,2	7,7	3,0	2,0	17,9
<b>DXS10079</b>	465	7,2	6,8	2,5	0,6	19,8

El valor medio más bajo fue observado en el locus DXS6801 ( $5,0 \pm 1,8$ ) y el valor más alto en DXS6809 ( $11,6 \pm 2,7$ ). Estos bajos porcentajes favorecen el genotipado correcto de las muestras.

### IV.3.3. Determinación de la intensidad relativa entre picos heterocigóticos (PHR, *Peak Height Ratio*)

Los valores registrados se encuentran en un rango comprendido entre 77- 83% (Tabla 24). Los valores más bajos y más altos fueron observados en el locus DXS6809 ( $77,6 \pm 13,8$ ) y en el locus DXS10075 ( $83,1 \pm 10,1$ ) respectivamente. Por ello se puede concluir que en general, miniX presenta un buen balance de los alelos en heterocigosis.

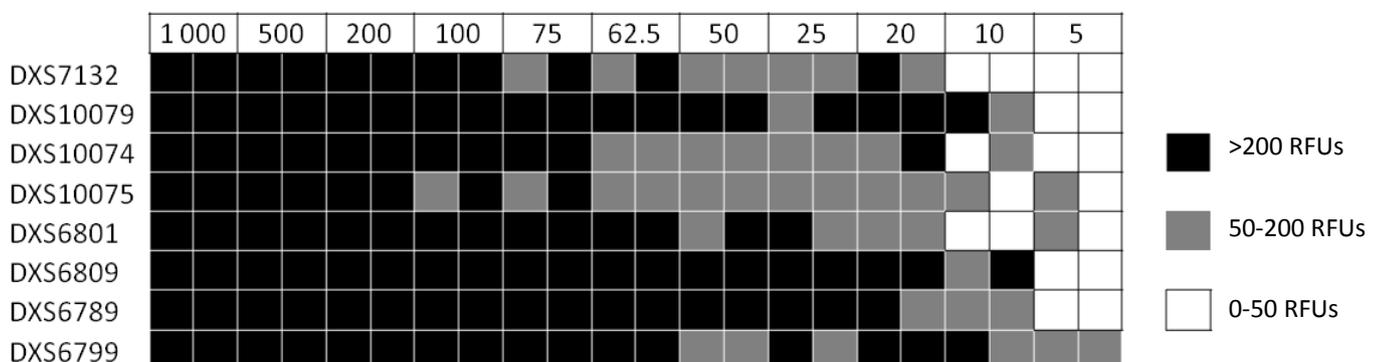
Tabla 24. Intensidad relativa entre picos para cada locus STR analizado con miniX.

	n	Media	Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<b>DXS6799</b>	25	82,0	84,9	11,0	56,4	99,7
<b>DXS10074</b>	91	78,4	79,7	13,0	42,9	99,8
<b>DXS6789</b>	48	82,4	83,7	10,9	59,4	99,8
<b>DXS6809</b>	58	77,6	77,4	13,8	48,0	99,6
<b>DXS7132</b>	50	81,5	82,3	12,6	55,7	98,8
<b>DXS6801</b>	29	81,5	81,7	11,6	58,9	97,9
<b>DXS10075</b>	29	83,1	85,7	10,1	57,9	94,7
<b>DXS10079</b>	77	81,8	82,4	13,0	53,2	99,9

**IV.3.4. Estudio de sensibilidad**

La cantidad mínima de ADN que permitió obtener perfiles completos mediante el análisis de miniX fue 20 pg. Incluso cantidades de ADN en el rango de 10 a 20 pg permitieron el análisis de 5 loci STR (un núcleo fijo de 4 loci STRs: DXS6799, DXS6789, DXS6809 y DXS10079; y DXS10075 o DXS10074, en función de la réplica) con alelos cuya intensidad estuvo comprendida en el rango 52- 466 RFUs. Los dos loci STR restantes (DXS7132, DXS6801) presentaron pérdidas alélicas por efectos estocásticos o no ofrecieron resultados a más de 50 RFUs en ninguno de los duplicados (Figura 11).

Figura 11. Estudio de sensibilidad usando miniX. En las columnas se representan las cantidades de ADN (pg) por duplicado, y en las filas, los microsatélites incluidos en miniX. Las cuadrículas corresponden a cada réplica y se indican con los colores negro, gris o blanco según la altura de los picos de los alelos genotipados. El color negro indica que la altura se encuentra por encima de 200 RFUs, el color gris entre 50-200 RFUs y el color blanco indica que se encuentra por debajo de 50 RFUs. Los valores 50 y 200 corresponden a los valores del umbral PAT (*Peak Amplitude Threshold*) y del MIT (*Match Interpretation Threshold*) que fueron establecidos para el análisis [206].



#### **IV.4. Estudio comparativo de la eficacia en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas con miniX con respecto a los métodos decaplex y sextaplex**

Los análisis de muestras de tejidos incluidos en parafina permitieron comparar la eficacia de miniX en muestras de ADN altamente degradadas con respecto a las reacciones decaplex y sextaplex. Se consiguió tipar todos los loci en un 83,3% con miniX, en un 70,8% por decaplex, y en un 29,2% con sextaplex del total de muestras analizadas. Sólo 7 muestras del total (29,2%) pudieron ser tipadas en la totalidad de sus loci por las tres reacciones, correspondiendo todas ellas a muestras recopiladas entre los años 2001-2012, 9 muestras (37,5% del total) recopiladas entre 1969 y 2009 fueron tipadas en su totalidad con miniX y decaplex, y 4 muestras (16,6% del total), una de ellas con más de 30 años de antigüedad, fueron tipadas solamente con miniX en la totalidad de su loci, obteniéndose en la mayoría, un genotipado incompleto con decaplex y ningún amplificado por sextaplex. Sólo en 4 muestras (16,6% del total), recopiladas entre 1969-1986, el genotipado fue incompleto cuando se utilizó miniX (Tabla 25).

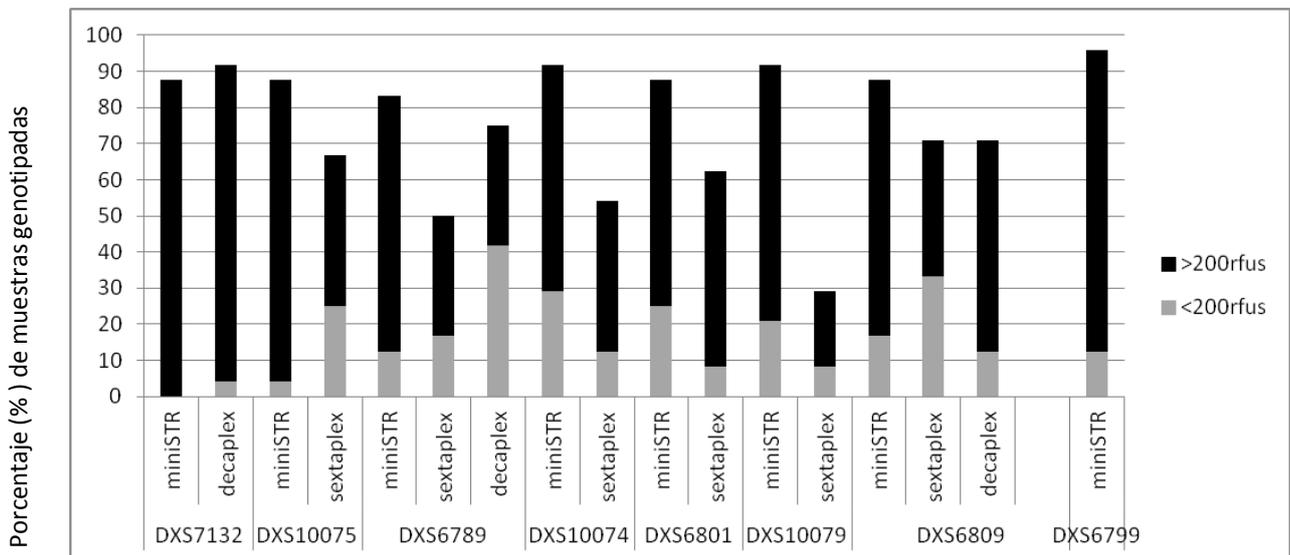
Tabla 25. El número de loci y el porcentaje (%) del total de STRs tipados con éxito con miniX, decaplex y sextaplex en cada una de las muestras de ADN procedente de tejidos incluidos en parafina. La segunda columna muestra el año en el cual cada muestra fue recopilada.

MUESTRA	AÑO	MiniX		decaplex		sextaplex	
		número de loci tipados	% de loci tipados	número de loci tipados	% de loci tipados	número de loci tipados	% de loci tipados
1	2012	8	100	10	100	6	100
2	2012	8	100	10	100	6	100
3	2012	8	100	10	100	6	100
4	2012	8	100	10	100	6	100
5	2009	8	100	10	100	4	66,7
6	2008	8	100	10	100	6	100
7	2007	8	100	10	100	3	50
8	2006	8	100	10	100	6	100
9	2005	8	100	4	40	0	0
10	2004	8	100	10	100	5	83,33
11	2001	8	100	10	100	6	100
12	2000	8	100	10	100	5	83,3
13	1996	8	100	7	70	1	16,7
14	1996	8	100	10	100	5	83,3
15	1994	8	100	10	100	4	66,7
16	1992	8	100	10	100	2	33,3
17	1986	1	12,5	0	0	0	0
18	1984	0	0	0	0	0	0
19	1982	4	50	10	100	2	33,3
20	1982	8	100	9	90	0	0
21	1975	8	100	4	40	0	0
22	1970	8	100	10	100	3	50
23	1969	8	100	10	100	3	50
24	1969	6	75	4	40	0	0
Media			89,1		82,5		54,9
Desviación estándar			27,9		32,6		46,4

Cuando se comparó con detalle el rendimiento de miniX con respecto a decaplex y sextaplex, en base a la altura de los alelos genotipados, se observó que miniX presenta un mayor rendimiento global que decaplex en 2 de los loci compartidos (DXS6809 y DXS6789), con la excepción del microsatélite DXS7132, que fue genotipado mediante decaplex en el 91,6% de las muestras respecto a un 87,5% en el caso de miniX. Si bien, en este locus, dicha diferencia corresponde a alelos cuyas alturas no superan las 200 RFUs.

Por otro lado, miniX muestra un rendimiento global superior a sextaplex en los 6 loci STR compartidos y, en todos los casos, un mayor porcentaje de alelos por encima de las 200 RFUs de altura (Figura 12).

Figura 12. Comparación del rendimiento obtenido entre los loci compartidos por miniX, decaplex y sextaplex de las 24 muestras de tejidos incluidos en parafina en base a la altura de los alelos en RFUs.



En la Tabla 26 se muestra el tamaño de los productos amplificados de los microsatélites compartidos por miniX y decaplex (DXS7132, DXS6809 y DXS6789), y se hace una comparación del porcentaje (%) de muestras tipadas con cada una de las dos reacciones. Se puede observar que para los 3 X-STRs los tamaños de los amplificados son inferiores y en 2 de los 3 microsatélites (DXS6809 y DXS6789) se obtiene un porcentaje superior de muestras genotipadas con miniX. De igual manera, se muestra el tamaño de los productos amplificados de los STRs compartidos por miniX y sextaplex (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809 y DXS6789). En este caso, los tamaños de los productos amplificados de miniX son menores en todos los loci, exceptuando en el DXS6801 que es 37 pb inferior en sextaplex. Cuando se compara el porcentaje de muestras genotipadas por estas 2 reacciones, se demuestra que el porcentaje obtenido por miniX es superior en todos los casos. El incremento de muestras genotipadas con el rediseño de miniSTRs se encuentra entre 8,3-16,7% en el caso del decaplex y entre el 16,7-62,5% en el caso del sextaplex. No se hace mención al microsatélite DXS6799 al no estar incluido ni en la reacción decaplex ni en la reacción sextaplex.

Tabla 26. Tamaño de los amplicones y porcentaje (%) de muestras tipadas con éxito con miniX, decaplex y sextaplex para cada STR compartido.

X-STR	miniX		decaplex		sextaplex	
	Tamaño del amplificado	% de muestras tipadas	Tamaño del amplificado	% de muestras tipadas	Tamaño del amplificado	% de muestras tipadas
DXS7132	106-130	87,5	124-148	91,7		
DXS10079	147-191	97,7			271-315	29,2
DXS10074	137-193	97,7			171-227	54,2
DXS10075	101-140	87,5			218-257	66,7
DXS6801	150-174	87,5			113-137	62,5
DXS6809	175-219	87,5	230-274	70,8	230-274	70,8
DXS6789	106-150	83,3	249-293	75,0	249-293	50,0
Media		89,8		72,8		59,7

En el análisis de estas muestras degradadas se detectaron dos alelos silentes. Una de las muestras degradadas fue genotipada como heterocigótica para el microsatélite DXS6809 (32/33) por miniX y como homocigótica (33/33) para decaplex. De la misma manera, una muestra de ADN degradada fue genotipada como heterocigótica para DXS6789 (21/24) por miniX y decaplex y, como homocigótica (21/21) por sextaplex.

#### **IV.5. Valoración forense de los STRs del Cromosoma X**

##### **IV.5.1. Frecuencias alélicas**

En las Tabla 27 y 28 se detallan las frecuencias alélicas obtenidas en los 15 X-STRs a partir de 119 madres de la costa de Cantabria y 25 madres del valle del Pas respectivamente mediante el programa GenAIEX (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx>).

Tabla 27. Frecuencias alélicas de 15 X-STRs de 119 madres de la costa de Cantabria. En negrita se indican los alelos más frecuente.

	DXS8378	DXS9902	DXS7132	DXS10079	DX10074	DXS10075	DXS9898	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	DXS7133	GATA172D05	GATA31E08	DXS7423
5													0,000		
6													0,176		
7					0,055							0,004	0,000	0,000	
8	0,000	0,000			0,156			0,017			0,000	0,000	0,198	0,004	
8.3							0,240								
9	0,008	0,000			0,025						0,021	<b>0,437</b>	0,038	0,202	
10	<b>0,391</b>	0,042			0,004		0,008	0,055			0,084	0,151	<b>0,328</b>	0,017	
11	0,328	<b>0,391</b>	0,009				0,185	<b>0,550</b>			<b>0,500</b>	0,366	0,189	0,240	0,004
12	0,240	0,382	0,130			0,000	<b>0,353</b>	0,277			0,315	0,034	0,067	0,147	0,000
13	0,025	0,177	0,277		0,021	0,055	0,172	0,093				0,063	0,008	0,004	<b>0,260</b>
14	0,008	0,008	<b>0,340</b>	0,004	0,038	0,000	0,029	0,008		0,000	0,013	0,000		0,113	0,349
15		0,000	0,189	0,017	0,059	0,008	0,013			0,017				0,017	<b>0,382</b>
16		0,000	0,051	0,029	0,168	0,193				0,008	0,004				0,160
16.2					0,004	0,000									
16.3						0,000									
17			0,004	0,076	<b>0,273</b>	<b>0,488</b>				0,000					0,038
18				0,160	0,122	0,231				0,000					0,000
19				<b>0,261</b>	0,067	0,021				0,021					
19.3				0,000											
20				0,219	0,008	0,004				<b>0,437</b>					
20.3										0,000					
21				0,134	0,000	0,000				0,298					
21.3						0,000									
22				0,092						0,143					
23				0,000						0,059					
24				0,008					0,000	0,013					
25				0,000						0,004					
26									0,004						
27									0,000						
28									0,017						
29									0,008						
30									0,034						
31									0,160						
32									0,160						
33									<b>0,302</b>						
34									0,239						
35									0,063						
36									0,013						
37									0,000						
38									0,000						

Tabla 28. Frecuencias alélicas de 15 X-STRs de 25 madres del valle del Pas. En negrita se indican los alelos más frecuentes.

	DXS8378	DXS9902	DXS7132	DXS10079	DX10074	DXS10075	DXS9898	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	DXS7133	GATA172D05	GATA31E08	DXS7423
5													0,000		
6													0,200		
7					0,060							0,000	0,000	0,000	
8	0,000	0,000			0,020			0,000			0,000	0,000	<b>0,240</b>	0,000	
8.3							<b>0,340</b>								
9	0,120	0,000			0,000						0,000	<b>0,680</b>	0,080	0,160	
10	0,300	0,020			0,000		0,000	0,060			0,060	0,020	<b>0,240</b>	0,020	
11	<b>0,320</b>	0,300	0,000				0,140	<b>0,580</b>			0,280	0,280	0,040	<b>0,260</b>	0,000
12	0,220	<b>0,380</b>	0,180			0,000	0,300	0,320			<b>0,560</b>	0,020	0,200	0,200	0,000
13	0,040	0,300	<b>0,420</b>		0,080	0,060	0,200	0,040			0,100	0,000	0,000	0,220	0,040
14	0,000	0,000	0,240	0,000	0,040	0,020	0,020	0,000		0,000	0,000	0,000		0,140	0,160
15		0,000	0,100	0,020	0,040	0,000	0,000			0,060				0,000	<b>0,540</b>
16		0,000	0,060	0,000	0,120	0,040				0,000	0,000				0,220
16.2					0,000	0,000									
16.3						0,000									
17			0,000	0,040	<b>0,220</b>	<b>0,580</b>				0,000					0,040
18				0,020	<b>0,220</b>	0,300				0,000					0,000
19				0,120	0,180	0,000				0,000					
19.3				0,000											
20				<b>0,360</b>	0,020	0,000				<b>0,380</b>					
20.3						0,000									
21				0,200	0,000	0,000				<b>0,380</b>					
21.3						0,000									
22				0,200						0,080					
23				0,020						0,060					
24				0,020					0,020	0,040					
25				0,000						0,000					
26									0,000						
27									0,000						
28									0,000						
29									0,000						
30									0,080						
31									0,140						
32									0,080						
33									<b>0,260</b>						
34									0,220						
35									0,200						
36									0,000						
37									0,000						
38									0,000						

#### IV.5.2. Comparación entre las poblaciones de estudio

Se tiparon en total 114 y 85 alelos diferentes en la costa de Cantabria y en el valle del Pas respectivamente. Hubo entre 4 y 13 alelos por cada marcador analizado, siendo DXS10074 el que mostró mayor número de alelos (13 en la costa de Cantabria y 10 en el valle del Pas). Se indica en ambas tablas en negrita, los alelos más frecuentes de cada población de estudio, observándose diferencias en algunos marcadores entre las mismas, como en el caso de los microsatélites DXS8378, DXS7132 y DXS10079. En la población de la costa de Cantabria el alelo más frecuentes para el marcador DXS8378 fue el alelo 10 (0,391) y para la población del valle del Pas fue el alelo 11 (0,320); en el caso del DXS7132 el alelo más frecuente fue el alelo 14 (0,340) para la población de la costa de Cantabria y el alelo 13 (0,420) para el valle del Pas; el alelo más frecuente para DXS10079 en la costa de Cantabria fue el 19 (0,261) y para el valle del Pas fue el 20 (0,360). Por otro lado, se pudo identificar el alelo 24 del marcador DXS6809, el alelo 23 de DXS10079 y el alelo 14 del DXS10075 como exclusivos de la población del valle del Pas.

Al comparar la distribución de frecuencias alélicas, se observaron diferencias significativas en 7 de los 15 marcadores analizados: DXS10079 ( $p=0,003$ ), DXS10074 ( $p= 0,018$ ) y DXS10075 ( $p= 0,037$ ) pertenecientes al primer bloque; DXS6809 ( $p= 0,046$ ) perteneciente al segundo bloque; y con respecto al resto de loci analizados por decaplex, había diferencias en DXS8378 ( $p=0,006$ ), DXS7133 ( $p=0,016$ ) y GATA172D05 ( $p=0,004$ ). Sin embargo, no existieron diferencias significativas en los microsatélites: DXS9902, DXS7132, DXS9898, DXS6801, DXS6789, DXS6799, GATA31E08 y DXS7423.

La varianza genética mostró muy poca estructura genética con 98,08% dentro de la población y sólo un 1,92% entre las poblaciones. El valor del coeficiente de coancestralidad ( $F_{st}$ ) calculado por AMOVA para las 2 poblaciones fue 0,019 (1,9%) (Tabla 29).

Tabla 29. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) entre la población de la costa de Cantabria y valle del Pas.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
<b>Entre poblaciones</b>	11,064	0,08280	1,92
<b>Dentro de la población</b>	1207,259	4,22119	98,08
<b>Total</b>	1218,323	4,30399	
<b>Fst</b>	0,01924		

### IV.5.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se obtuvieron los resultados del análisis de las posibles desviaciones del equilibrio de HWE en las muestras femeninas por el programa GenAlex (Tabla 30). En ninguno de los loci analizados se obtuvieron desviaciones significativas, excepto para el marcador DXS6809 ( $p=0,015$ ) en la población de la costa de Cantabria. No obstante, después de aplicar la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples (umbral de significación,  $p<0,0033$ ), este valor no resultó significativo estadísticamente.

Tabla 30. Valores de  $p$  del equilibrio de Hardy Weinberg en las muestras femeninas de las 2 poblaciones de estudio. En negrita se señalan los valores  $p$  inferiores a 0,05.

X-STRs	COSTA DE CANTABRIA	VALLE DEL PAS
<b>DXS8378</b>	0,430	0,218
<b>DXS9902</b>	0,814	0,268
<b>DXS7132</b>	0,979	0,127
<b>DXS10079</b>	0,804	0,637
<b>DXS10074</b>	0,512	0,383
<b>DXS10075</b>	0,982	0,064
<b>DXS9898</b>	0,484	0,164
<b>DXS6801</b>	0,253	0,835
<b>DXS6809</b>	<b>0,015</b>	0,528
<b>DXS6789</b>	0,797	0,993
<b>DXS6799</b>	0,282	0,318
<b>DXS7133</b>	0,571	0,803
<b>GATA172D05</b>	0,643	0,113
<b>GATA31E08</b>	0,928	0,589
<b>DXS7423</b>	0,859	0,841

### IV.5.4. Análisis del desequilibrio de ligamiento

El cálculo del desequilibrio de ligamiento entre cada par de loci se detalla en las Tablas 31 y 32. En la mayoría de las parejas de STRs analizados se obtienen valores de  $p$  superiores a 0,05, lo que indica la independencia de estos marcadores en las poblaciones de estudio. No obstante, se observaron algunos pares de loci con valores de  $p < 0,05$ , y algunos casos con  $p$  valores por debajo del umbral de significación tras el ajuste de Bonferroni ( $p < 0,0005$ ) para 105 comparaciones múltiples.

Tabla 31. Valores de p de desequilibrio de ligamiento entre pares de loci en la población de la costa de Cantabria. En negrita se indican los valores significativos para una  $p < 0,05$  y subrayados se indican los valores significativos tras la corrección de Bonferroni (nivel de significación  $p < 0,0005$  para 105 comparaciones múltiples).

	DXS8378	DXS9902	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS9898	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	DXS7133	GATA172D05	GATA31E08
<b>DXS8378</b>														
<b>DXS9902</b>	0,024375													
<b>DXS7132</b>	0,016250	<b>0,040938</b>												
<b>DXS10079</b>	0,505625	0,788790	0,114687											
<b>DXS10074</b>	0,892500	0,756250	0,356250	<b>0,021875</b>										
<b>DXS10075</b>	0,459062	0,574688	0,207500	0,053437	<b>0,001250</b>									
<b>DXS9898</b>	0,537500	<b>0,026250</b>	0,156875	<b>0,009062</b>	<u><b>0,0003130</b></u>	0,108125								
<b>DXS6801</b>	0,482187	0,512500	<b>0,041563</b>	0,243125	0,151562	0,287187	0,628750							
<b>DXS6809</b>	0,070938	0,300312	0,125625	0,080937	0,105938	0,558438	0,088125	0,565312						
<b>DXS6789</b>	0,483750	0,230625	0,113750	0,503437	<b>0,043125</b>	0,260937	0,708750	0,920937	0,081250					
<b>DXS6799</b>	0,092500	0,856563	0,410938	<b>0,013750</b>	0,436875	0,395313	0,501250	0,125000	0,373437	0,062187				
<b>DXS7133</b>	0,433750	0,474062	0,169375	0,183438	0,435937	0,495625	0,221562	<b>0,017812</b>	0,430937	0,902500	0,053437			
<b>GATA172D05</b>	0,826562	0,070625	0,101875	<b>0,020625</b>	0,281562	0,630313	0,264688	0,345938	0,272500	0,178437	0,130938	0,099375		
<b>GATA31E08</b>	0,383135	0,143437	<b>0,026562</b>	0,175000	<b>0,029375</b>	0,163125	0,512813	0,205000	<b>0,025625</b>	<b>0,006562</b>	0,255313	0,582117	<b>0,038125</b>	
<b>DXS7423</b>	0,158438	0,105625	0,262500	0,629375	<b>0,047500</b>	0,583125	0,264688	0,244688	0,141875	0,592812	0,630000	0,293125	0,086875	0,216250

Tabla 32. Valores de p de desequilibrio de ligamiento entre pares de loci en la población del valle del Pas. En negrita se indican los valores significativos para una  $p < 0,05$  y subrayados se indican los valores significativos tras la corrección de Bonferroni (nivel de significación  $p < 0,0005$  para 105 comparaciones múltiples).

	<u>DXS8378</u>	<u>DXS9902</u>	<u>DXS7132</u>	<u>DXS10079</u>	<u>DXS10074</u>	<u>DXS10075</u>	<u>DXS9898</u>	<u>DXS6801</u>	<u>DXS6809</u>	<u>DXS6789</u>	<u>DXS6799</u>	<u>DXS7133</u>	<u>GATA172D05</u>	<u>GATA31E08</u>
<b>DXS8378</b>														
<b>DXS9902</b>	0,164375													
<b>DXS7132</b>	0,687500	<b>0,039062</b>												
<b>DXS10079</b>	0,095312	0,251563	0,461250											
<b>DXS10074</b>	0,320625	0,760312	0,190625	<b>0,030625</b>										
<b>DXS10075</b>	0,136875	0,229063	0,301563	0,433125	<b>0,030625</b>									
<b>DXS9898</b>	0,311563	0,551250	0,872188	0,051562	0,746875	0,643750								
<b>DXS6801</b>	0,163438	0,091250	<b>0,047813</b>	0,461562	0,440937	0,470625	0,170000							
<b>DXS6809</b>	0,218125	0,458437	0,436250	0,513437	0,510312	0,288750	0,053437	<b>0,013487</b>						
<b>DXS6789</b>	0,181875	0,228780	0,295938	0,191875	0,763750	0,360625	0,099375	0,396250	<b>0,047813</b>					
<b>DXS6799</b>	0,773125	0,126250	0,229687	0,886563	0,352187	0,276562	0,320000	0,392188	0,221250	0,159688				
<b>DXS7133</b>	0,577500	0,544375	0,529687	0,202813	0,972187	0,126875	0,392188	0,165937	0,195000	0,145313	0,641563			
<b>GATA172D05</b>	0,662188	0,305625	0,145000	0,922500	0,210000	0,215625	0,926875	0,449375	0,750625	0,120000	0,236250	0,417812		
<b>GATA31E08</b>	0,808438	0,906563	0,744687	0,482812	0,504062	0,471875	0,498437	0,249375	0,627500	0,522500	0,126562	0,668125	1,000000	
<b>DXS7423</b>	<b>0,009062</b>	0,449062	0,241875	0,868437	0,590000	0,120313	0,906875	0,125938	0,967500	0,184375	0,350625	0,653750	0,696562	0,090625

#### **IV.5.5. Parámetros de eficacia forense**

La eficacia forense de los STRs analizados en cada población fue evaluada mediante el cálculo de los parámetros detallados en las tablas 33 y 34.

En la población de la costa de Cantabria los marcadores más polimórficos fueron DXS10074 y DX10079 con valores de PIC de 0,8278 y 0,8028 respectivamente, mientras que DXS6801 y DXS6799 mostraron menor grado de variabilidad con valores de PIC de 0,5535 y 0,5813 respectivamente. El poder de discriminación para todos los loci analizados fue mayor en mujeres que en hombres. Asimismo, DXS10074 y DXS10079 resultaron ser los marcadores que mostraban los mayores valores de poder de discriminación tanto en mujeres (0,9590 y 0,9470 respectivamente) como en hombres (0,8447 y 0,8253 respectivamente); DXS6801 y DXS6799 los marcadores con menor poder de discriminación tanto en mujeres (0,7916 y 0,8119 respectivamente) como en hombres (0,6089 y 0,6391, respectivamente). (Tabla 33).

Con respecto a los resultados obtenidos del cálculo del poder de exclusión, se observó que en todos los casos, la probabilidad de exclusión a priori es mayor en los casos de parentesco (padre-madre-hija) que en los casos en los que la madre está ausente. Destacaron igualmente como marcadores con mayor poder de exclusión, los marcadores DXS10074 y DXS10079 con poder de exclusión en casos de parentesco de tríos familiares (padre-madre-hija) de 0,8278 y 0,8028 respectivamente, y en casos que sólo se involucre padre-hija de 0,7209 y 0,6866 respectivamente. Y como marcadores con menor poder de exclusión, DXS6801 y DXS6799 tanto en tríos (0,5535 y 0,5813, respectivamente) como en dúos (0,4064 y 0,4354 respectivamente). (Tabla 33).

En la población del valle del Pas, los marcadores más polimórficos fueron DXS10074 y DXS6809 con valores de PIC de 0,8236 y 0,7845, respectivamente, mientras que DXS6801 y DXS7133 mostraron menor grado de variabilidad con valores de PIC de 0,4825 y 0,3850 respectivamente. Asimismo, DXS10074 y DXS6809 mostraron los mayores valores de eficacia forense, con un poder de discriminación de 0,9563 y 0,9377 en mujeres, y 0,8424 y 0,8112 en hombres respectivamente; con un poder de exclusión en casos de tríos familiares (padre-madre-hija) de 0,8236 y 0,7845 respectivamente, y en casos que sólo se involucre padre-hija de 0,7145 y 0,6624 respectivamente. Entre los marcadores que ofrecieron un poder de discriminación menor también se encontraron DXS6801 y DXS7133 con valores en mujeres de 0,7294 y 0,6333 y, en hombres de 0,5560 y 0,4584 respectivamente; con un poder de exclusión en casos de tríos familiares (padre-madre-hija) de 0,4825 y 0,3850 y respectivamente, y en casos que sólo se involucre padre-hija de 0,3402 y 0,2532, respectivamente. (Tabla 34).

Tabla 33. Parámetros de eficacia forense de los 15 X-STRs en la población de la costa de Cantabria.

	DXS8378	DXS9902	DXS7132	DXS10079	DX10074	DXS10075	DXS9898	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	DXS7133	GATA172D05	GATA31E08	DXS7423
<b>PIC</b>	0,6178	0,6041	0,7120	0,8028	0,8278	0,6194	0,7127	0,5535	0,7656	0,6473	0,5813	0,5842	0,7483	0,7688	0,6480
<b>h</b>	0,3188	0,3316	0,2475	0,1747	0,1553	0,3313	0,2471	0,3911	0,2052	0,3047	0,3609	0,3490	0,2190	0,2010	0,2993
<b>HET</b>	0,6812	0,6684	0,7525	0,8253	0,8447	0,6687	0,7529	0,6089	0,7948	0,6953	0,6391	0,6510	0,7810	0,7990	0,7007
<b>PE</b>	0,3998	0,3811	0,5140	0,6469	0,6845	0,3815	0,5148	0,3017	0,5894	0,4211	0,3405	0,3566	0,5642	0,5972	0,4294
<b>PD mujeres</b>	0,8350	0,8257	0,8983	0,9470	0,9590	0,8409	0,8988	0,7916	0,9287	0,8591	0,8119	0,8114	0,9194	0,9294	0,8577
<b>PD hombres</b>	0,6812	0,6684	0,7525	0,8253	0,8447	0,6687	0,7529	0,6089	0,7948	0,6953	0,6391	0,6510	0,7810	0,7990	0,7007
<b>MEC-Trío</b>	0,6178	0,6041	0,7120	0,8028	0,8278	0,6194	0,7127	0,5535	0,7656	0,6473	0,5813	0,5842	0,7483	0,7688	0,6480
<b>MEC-Dúo</b>	0,4713	0,4578	0,5746	0,6866	0,7209	0,4725	0,5751	0,4064	0,6393	0,5037	0,4354	0,4380	0,6174	0,6423	0,5042

PIC. Contenido de información polimórfica; h. Índice de homocigosidad; HET. Índice de heterocigosidad; PE. Poder de exclusión; PD-mujeres. Poder de discriminación en mujeres; PD-hombres. Poder de discriminación en hombres; MEC-Trío. Poder de exclusión en tríos que involucren Padre- madre- hija; MEC-dúo. Poder de exclusión en casos que involucren Padre-Hija.

Tabla 34. Parámetros de eficacia forense de los 15 X-STRs en la población del valle del Pas.

	DXS8378	DXS9902	DXS7132	DXS10079	DX10074	DXS10075	DXS9898	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	DXS7133	GATA172D05	GATA31E08	DXS7423
<b>PIC</b>	0,6984	0,6068	0,6772	0,7414	0,8236	0,5027	0,6873	0,4825	0,7845	0,6454	0,5345	0,3850	0,7654	0,7673	0,5832
<b>h</b>	0,2568	0,3248	0,2800	0,2272	0,1576	0,4320	0,2656	0,4440	0,1888	0,3040	0,4056	0,5416	0,2032	0,2016	0,3688
<b>HET</b>	0,7432	0,6752	0,7200	0,7728	0,8424	0,5680	0,7344	0,5560	0,8112	0,6960	0,5944	0,4584	0,7968	0,7984	0,6312
<b>PE</b>	0,4982	0,3909	0,4599	0,5496	0,6799	0,2542	0,4835	0,2414	0,6200	0,4221	0,2842	0,1536	0,5931	0,5961	0,3300
<b>PD mujeres</b>	0,8892	0,8261	0,8788	0,9170	0,9563	0,7480	0,8824	0,7294	0,9377	0,8569	0,7756	0,6333	0,9273	0,9283	0,8160
<b>PD hombres</b>	0,7432	0,6752	0,7200	0,7728	0,8424	0,5680	0,7344	0,5560	0,8112	0,6960	0,5944	0,4584	0,7968	0,7984	0,6312
<b>MEC-Trío</b>	0,6984	0,6068	0,6772	0,7414	0,8236	0,5027	0,6873	0,4825	0,7845	0,6454	0,5345	0,3850	0,7654	0,7673	0,5832
<b>MEC-Dúo</b>	0,5586	0,4593	0,5350	0,6101	0,7145	0,3584	0,5459	0,3402	0,6624	0,5028	0,3876	0,2532	0,6378	0,6399	0,4347

PIC. Contenido de información polimórfica; h. Índice de homocigosidad; HET. Índice de heterocigosidad; PE. Poder de exclusión; PD-mujeres. Poder de discriminación en mujeres; PD-hombres. Poder de discriminación en hombres; MEC-Trío. Poder de exclusión en tríos que involucren Padre- madre- hija; MEC-dúo. Poder de exclusión en casos que involucren Padre-Hija.

Puesto que todos los loci estudiados están en un mismo cromosoma, es cuestionable el calcular el poder de discriminación combinado, dado que resulta difícil excluir por completo la posibilidad de que exista un desequilibrio de ligamiento entre los loci, con independencia de la significación estadística obtenida en la muestra analizada en este estudio. No obstante, a efectos de comparar los tres sistemas valorados, a continuación hacemos las estimaciones del presunto poder de discriminación combinado de cada uno de ellos, asumiendo la hipótesis (irreal) de que no estuvieran ligados.

Los resultados mostraron que teniendo en cuenta todos los loci incluidos en las multiplexes miniX, decaplex y sextaplex, el poder de discriminación fue más alto en decaplex tanto en mujeres (0,9999999996) como en hombres (0,9999981248), que utilizando miniX (0,9999999861 y 0,9999803329 en mujeres y hombres, respectivamente) y sextaplex (0,9999992742 y 0,9997798808 en mujeres y hombres respectivamente). Sin embargo, a partir de extractos de ADN altamente fragmentados (<220pb), miniX alcanzó un mayor poder de discriminación combinado que decaplex, tanto en el análisis solamente de los loci compartidos, como en el análisis de loci compartidos y no por ambos sistemas. Los valores fueron superiores tanto en mujeres como en hombres. De igual manera, miniX alcanza un poder de discriminación superior a sextaplex cuando se consideraron amplicones por debajo de 220 pb y loci compartidos por ambos sistemas, tanto en mujeres como en hombres (Tabla 35). Este tamaño de 220 pb es similar a los tamaños característicos de los fragmentos presentes en el ADN altamente degradado (240pb).

#### **IV.5.6. Estudio de la segregación meiótica**

Se analizaron los eventos de recombinación en las 157 meiosis. Desafortunadamente, el número de meiosis informativas fue pequeño, debido a que algunas meiosis fueron no informativas, al ser la madre homocigótica en algunos de los loci (Tabla 36). Se encontraron 17 recombinaciones entre los dos bloques, lo que resulta en una distancia genética de 12,8 cM.

Se observaron 2 recombinaciones dentro del primer bloque y 5 dentro del segundo bloque. En el primer bloque se localizaron entre DXS7132 y DXS10079 y entre DXS10074 y DXS10075; y en el segundo bloque se encontró un evento entre DXS6801 y DXS6809, dos entre DXS6809 y DXS6789, y dos entre DXS6789 y DXS6799. Las distancias genéticas calculadas fueron 2,18 cM para el primer bloque y 6,59 cM para el segundo bloque (Tabla 36).

Tabla 35. Poder de discriminación combinado (CPD) cuando se tuvo en cuenta todos los loci incluidos en los multiplexes miniX, decaplex y sextaplex en mujeres y hombres y cuando se consideró tamaños de amplificadores por debajo de 220 pb de todos los loci y sólo de loci compartidos.

CPD	TODOS LOCI			< 220 bp					
				TODOS LOCI		LOCI COMPARTIDOS			
				miniX vs. decaplex		miniX vs. decaplex		miniX vs. sextaplex	
	miniX	decaplex	sextaplex	miniX	decaplex	miniX	decaplex	miniX	sextaplex
<b>MUJERES</b>	0,9999999861	0,9999999996	0,9999992742	0,9999999861	0,9999994392	0,9989754386	0,893000	0,9999992742	0,991455600
<b>HOMBRES</b>	0,9999803329	0,9999981248	0,9997798808	0,9999803329	0,9998521038	0,9845025771	0,752500	0,9997798808	0,939262170

Tabla 36. Eventos de recombinación dentro y entre los bloques haplotípicos, número de meiosis informativas y distancia genética entre cada par de loci y distancia entre los dos bloques haplotípicos DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799.

Número de recombinaciones	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799
<b>Dentro de cada bloque</b>	1	0	1	2	1	2	2	
<b>Entre los bloques</b>	17							
<b>Meiosis informativas</b>	109	114	81	79	98	64		
<b>Distancia genética cM</b>	0,93	0	1,25	1,28	2,08	3,23		
	2,18				6,59			

#### **IV.5.7. Estudio de los haplotipos de los grupos de ligamiento analizados**

##### Costa de Cantabria

Los marcadores DXS7132, DXS10079, DXS10074 y DXS10075 poseen 7, 10, 13 y 7 alelos respectivamente. Teóricamente, este grupo de ligamiento puede dar lugar a 6,370 haplotipos diferentes. Por otro lado, los marcadores DXS6801, DXS6809, DXS6789 y DXS6799 poseen 6, 10, 9 y 7 alelos respectivamente. Teóricamente, este grupo de ligamiento puede dar lugar a 3,780 haplotipos diferentes.

En el análisis de 113 varones, se observaron 92 haplotipos diferentes para el bloque haplotípico DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 y 84 para el bloque DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799. Además se encontraron 73 haplotipos únicos (64,60% del total de la población) en el primer bloque haplotípico y 65 en el segundo bloque (57,52% del total de la población). La diversidad haplotípica en cada caso fue 0,9874 y 0,9846 respectivamente. La presencia del haplotipo más abundante se encontró tanto en el primer grupo de ligamiento como en el segundo en el 3,54% del total de la población (Tabla 37).

Analizando 114 mujeres, se observaron 164 haplotipos diferentes en el primer bloque, y 132 en el segundo bloque. Hubo 121 haplotipos únicos (53,07% del total de la población) en el primer bloque y 86 en el segundo (37,72% del total de la población). La diversidad haplotípica en cada caso fue 0,9917 y 0,9879 respectivamente. El haplotipo más abundante se encontró en el primer grupo de ligamiento en el 3,07% y, en el segundo grupo en el 3,50% del total de la población (Tabla 37).

##### Valle del Pas

Los marcadores DXS7132, DXS10079, DXS10074 y DXS10075 poseen 5, 9, 10 y 5 alelos respectivamente. Teóricamente, este grupo de ligamiento puede dar lugar a 2,250 haplotipos diferentes. Por otro lado, los marcadores DXS6801, DXS6809, DXS6789 y DXS6799 poseen 4, 7, 6 y 4 alelos respectivamente. Teóricamente, este grupo de ligamiento puede dar lugar a 672 haplotipos diferentes.

Por un lado, se analizaron 22 varones, entre los que se observaron 21 haplotipos diferentes en el primer grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 y 17 en el segundo DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799. 20 y 14 haplotipos únicos fueron observados en el primer y segundo bloque respectivamente, los cuales correspondían a un 90,91% de la población total en el primer caso y a un 63,64% en el segundo. Las diversidades haplotípicas

en cada caso correspondían a 0,9504 en el primer bloque y 0,9256 en el segundo bloque. El haplotipo más frecuente estuvo presente en el 9,09% y 13,64% del total de la población en el primer y segundo grupo de ligamiento respectivamente (Tabla 38).

Por otro lado, se analizaron 22 mujeres, entre los que se observaron 34 haplotipos diferentes en el primer grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 y 34 en el segundo DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799. 25 y 30 haplotipos únicos fueron observados en el primer y segundo bloque respectivamente, los cuales correspondían a un 56,81% de la población total en el primer caso y a un 68,18% en el segundo. Las diversidades haplotípicas en cada caso correspondieron a 0,9674 en el primer bloque y 0,9585 en el segundo bloque. El haplotipo más frecuente estuvo presente en el 6,66% y 11,11% del total de la población en el primer y segundo grupo de ligamiento respectivamente (Tabla 38).

Tabla 37. Distribución de los haplotipos del grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 de varones y mujeres de la costa de Cantabria.

	DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075				DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799			
	varones		mujeres		Varones		mujeres	
	n	proporción de muestra %	n	proporción de muestra %	N	proporción de muestra %	n	proporción de muestra %
Número de cromosomas investigados	113	-	228	-	113	-	228	-
Número de haplotipos diferentes observados	92	-	164	-	84	-	132	-
Haplotipo más frecuente	4	3,54	7	3,07	4	3,54	8	3,50
Número de haplotipos únicos	73	64,60	121	53,07	65	57,52	86	37,72
Diversidad haplotípica	0,9874		0,9917		0,9846		0,9879	

Tabla 38. Distribución de los haplotipos del grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 de varones y mujeres del valle del Pas.

	DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075				DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799			
	varones		mujeres		varones		mujeres	
	n	proporción de muestra %	n	proporción de muestra %	N	proporción de muestra %	n	proporción de muestra %
Número de cromosomas investigados	22	-	44	-	22	-	44	-
Número de haplotipos diferentes observados	21	-	34	-	17	-	34	-
Haplotipo más frecuente	2	9,09	3	6,66	3	13,64	5	11,11
Número de haplotipos únicos	20	90,91	25	56,81	14	63,64	30	68,18
Diversidad haplotípica	0,9504		0,9674		0,9256		0,9585	

Como conclusión, los resultados acerca del análisis de la distribución de haplotipos, demuestran una diversidad haplotípica alta y una frecuencia de los haplotípicos únicos baja en los dos grupos de ligamiento en ambas poblaciones.

En las Tablas 39- 42 se detallan las frecuencias haplotípicas de los dos grupos de ligamiento de la población de la costa de Cantabria, y en las Tablas 43- 46 se detallan las frecuencias haplotípicas de los grupos de ligamiento de la población del valle del Pas.

Tabla 39. Frecuencias haplotípicas del grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 (n= 113 varones de la costa de Cantabria).

	<b>DXS7132</b>	<b>DXS10079</b>	<b>DXS10074</b>	<b>DXS10075</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia</b>
H1	14	18	8	17	4	0,03540
H2	12	19	17	17	2	0,01770
H3	12	19	17	18	2	0,01770
H4	12	19	18	18	2	0,01770
H5	13	18	8	18	2	0,01770
H6	13	19	18	18	2	0,01770
H7	13	20	16	17	2	0,01770
H8	13	20	17	18	2	0,01770
H9	14	16	17	16	2	0,01770
H10	14	17	8	16	2	0,01770
H11	14	18	8	16	2	0,01770
H12	14	18	15	16	2	0,01770
H13	14	20	7	13	2	0,01770
H14	14	20	13	18	2	0,01770
H15	14	20	19	17	2	0,01770
H16	14	22	16	17	2	0,01770
H17	15	19	16	17	2	0,01770
H18	15	21	14	17	2	0,01770
H19	16	18	8	17	2	0,01770
H20	11	16	19	18	1	0,00885
H21	12	18	7	13	1	0,00885
H22	12	18	16	17	1	0,00885
H23	12	18	17	17	1	0,00885
H24	12	19	19	17	1	0,00885
H25	12	20	7	13	1	0,00885
H26	12	21	16	16	1	0,00885
H27	12	22	16	17	1	0,00885
H28	13	16	17	16	1	0,00885
H29	13	17	9	17	1	0,00885
H30	13	18	7	13	1	0,00885
H31	13	18	8	17	1	0,00885
H32	13	18	16	18	1	0,00885
H33	13	18	17	16	1	0,00885
H34	13	18	18	17	1	0,00885
H35	13	18	18	19	1	0,00885
H36	13	19	8	18	1	0,00885
H37	13	19	17	18	1	0,00885
H38	13	19	18	17	1	0,00885

## IV. RESULTADOS

	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS10075	N	Frecuencia
H39	13	19	19	18	1	0,00885
H40	13	20	7	13	1	0,00885
H41	13	20	8	18	1	0,00885
H42	13	21	16	17	1	0,00885
H43	13	21	17	18	1	0,00885
H44	13	21	17	20	1	0,00885
H45	13	22	13	18	1	0,00885
H46	13	22	14	18	1	0,00885
H47	13	22	16	17	1	0,00885
H48	13	22	16	18	1	0,00885
H49	13	24	20	17	1	0,00885
H50	14	15	16	16	1	0,00885
H51	14	16	15	16	1	0,00885
H52	14	17	9	16	1	0,00885
H53	14	17	16	16	1	0,00885
H54	14	17	19	16	1	0,00885
H55	14	18	9	16	1	0,00885
H56	14	18	18	18	1	0,00885
H57	14	19	8	16	1	0,00885
H58	14	19	8	17	1	0,00885
H59	14	19	17	16	1	0,00885
H60	14	19	17	17	1	0,00885
H61	14	19	17	18	1	0,00885
H62	14	19	18	19	1	0,00885
H63	14	20	9	17	1	0,00885
H64	14	20	16	17	1	0,00885
H65	14	20	17	17	1	0,00885
H66	14	20	18	17	1	0,00885
H67	14	21	8	17	1	0,00885
H68	14	21	17	16	1	0,00885
H69	14	21	17	17	1	0,00885
H70	14	21	18	17	1	0,00885
H71	15	15	18	16	1	0,00885
H72	15	18	18	17	1	0,00885
H73	15	19	15	17	1	0,00885
H74	15	19	17	17	1	0,00885
H75	15	19	17	18	1	0,00885
H76	15	19	19	18	1	0,00885
H77	15	20	7	13	1	0,00885
H78	15	20	8	17	1	0,00885
H79	15	20	17	19	1	0,00885
H80	15	20	18	17	1	0,00885
H81	15	21	8	13	1	0,00885
H82	15	21	15	17	1	0,00885
H83	15	21	16	17	1	0,00885
H84	15	22	14	17	1	0,00885
H85	15	22	17	18	1	0,00885
H86	15	22	18	16	1	0,00885
H87	16	17	16	16	1	0,00885
H88	16	19	7	13	1	0,00885
H89	16	19	17	17	1	0,00885
H90	16	20	17	17	1	0,00885
H91	16	21	7	13	1	0,00885
H92	16	22	17	17	1	0,00885

Tabla 40. Frecuencias haplotípicas del grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 (N=114 mujeres de la costa de Cantabria).

	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS10075	N	Frecuencia
H1	14	19	17	17	7	0,03070
H2	14	18	8	17	6	0,02632
H3	12	19	17	17	4	0,01754
H4	14	20	19	17	4	0,01754
H5	13	19	17	17	3	0,01316
H6	13	19	18	17	3	0,01316
H7	13	19	18	18	3	0,01316
H8	13	22	13	18	3	0,01316
H9	14	19	8	17	3	0,01316
H10	15	19	17	18	3	0,01316
H11	15	20	17	17	3	0,01316
H12	15	20	18	17	3	0,01316
H13	12	19	17	18	2	0,00877
H14	12	19	18	18	2	0,00877
H15	12	20	17	17	2	0,00877
H16	12	22	16	17	2	0,00877
H17	13	15	17	16	2	0,00877
H18	13	18	8	18	2	0,00877
H19	13	20	7	13	2	0,00877
H20	13	20	16	17	2	0,00877
H21	13	20	17	18	2	0,00877
H22	13	21	16	17	2	0,00877
H23	13	22	16	18	2	0,00877
H24	14	16	17	16	2	0,00877
H25	14	17	8	16	2	0,00877
H26	14	18	8	16	2	0,00877
H27	14	18	15	16	2	0,00877
H28	14	19	16	18	2	0,00877
H29	14	20	7	13	2	0,00877
H30	14	20	13	18	2	0,00877
H31	14	20	17	17	2	0,00877
H32	14	21	8	17	2	0,00877
H33	14	21	17	17	2	0,00877
H34	14	21	18	17	2	0,00877
H35	14	22	16	17	2	0,00877
H36	14	22	17	16	2	0,00877
H37	15	19	16	17	2	0,00877
H38	15	20	7	13	2	0,00877
H39	15	20	8	17	2	0,00877
H40	15	21	14	17	2	0,00877
H41	15	21	15	17	2	0,00877
H42	15	22	14	17	2	0,00877
H43	16	18	8	17	2	0,00877
H44	11	16	19	18	1	0,00439
H45	11	20	16	18	1	0,00439
H46	12	17	16	18	1	0,00439
H47	12	18	7	13	1	0,00439
H48	12	18	16	17	1	0,00439
H49	12	18	17	17	1	0,00439
H50	12	19	8	16	1	0,00439
H51	12	19	8	17	1	0,00439
H52	12	19	16	16	1	0,00439
H53	12	19	16	18	1	0,00439

	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS10075	N	Frecuencia
H54	12	19	17	16	1	0,00439
H55	12	19	19	17	1	0,00439
H56	12	20	7	13	1	0,00439
H57	12	20	8	17	1	0,00439
H58	12	21	14	18	1	0,00439
H59	12	21	15	17	1	0,00439
H60	12	21	16	16	1	0,00439
H61	12	21	17	16	1	0,00439
H62	12	21	17	17	1	0,00439
H63	13	16	16	16	1	0,00439
H64	13	16	17	16	1	0,00439
H65	13	17	8	18	1	0,00439
H66	13	17	9	17	1	0,00439
H67	13	17	17	16	1	0,00439
H68	13	17	17	17	1	0,00439
H69	13	18	7	13	1	0,00439
H70	13	18	8	17	1	0,00439
H71	13	18	9	16	1	0,00439
H72	13	18	15	17	1	0,00439
H73	13	18	16	17	1	0,00439
H74	13	18	16	18	1	0,00439
H75	13	18	17	16	1	0,00439
H76	13	18	18	17	1	0,00439
H77	13	18	18	19	1	0,00439
H78	13	19	8	18	1	0,00439
H79	13	19	14	18	1	0,00439
H80	13	19	16	17	1	0,00439
H81	13	19	17	18	1	0,00439
H82	13	19	19	18	1	0,00439
H83	13	19	16,2	17	1	0,00439
H84	13	20	8	18	1	0,00439
H85	13	20	14	15	1	0,00439
H86	13	20	15	17	1	0,00439
H87	13	20	16	16	1	0,00439
H88	13	20	16	18	1	0,00439
H89	13	20	17	17	1	0,00439
H90	13	20	18	16	1	0,00439
H91	13	20	19	17	1	0,00439
H92	13	21	15	17	1	0,00439
H93	13	21	17	18	1	0,00439
H94	13	21	17	20	1	0,00439
H95	13	21	19	18	1	0,00439
H96	13	22	14	18	1	0,00439
H97	13	22	16	17	1	0,00439
H98	13	24	19	17	1	0,00439
H99	13	24	20	17	1	0,00439
H100	14	14	18	16	1	0,00439
H101	14	15	16	16	1	0,00439
H102	14	16	15	16	1	0,00439
H103	14	16	16	17	1	0,00439
H104	14	17	8	15	1	0,00439
H105	14	17	8	16	1	0,00439
H106	14	17	9	16	1	0,00439
H107	14	17	16	16	1	0,00439
H108	14	17	17	18	1	0,00439
H109	14	17	19	16	1	0,00439

	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS10075	N	Frecuencia
H110	14	18	10	16	1	0,00439
H111	14	18	17	16	1	0,00439
H112	14	18	17	19	1	0,00439
H113	14	18	18	17	1	0,00439
H114	14	18	18	18	1	0,00439
H115	14	19	8	16	1	0,00439
H116	14	19	17	16	1	0,00439
H117	14	19	17	18	1	0,00439
H118	14	19	18	19	1	0,00439
H119	14	19	19	18	1	0,00439
H120	14	20	8	17	1	0,00439
H121	14	20	9	17	1	0,00439
H122	14	20	15	17	1	0,00439
H123	14	20	16	17	1	0,00439
H124	14	20	16	18	1	0,00439
H125	14	20	18	17	1	0,00439
H126	14	20	19	18	1	0,00439
H127	14	21	7	13	1	0,00439
H128	14	21	16	18	1	0,00439
H129	14	21	17	16	1	0,00439
H130	14	22	15	18	1	0,00439
H131	14	22	17	17	1	0,00439
H132	15	15	18	16	1	0,00439
H133	15	17	16	16	1	0,00439
H134	15	18	18	17	1	0,00439
H135	15	18	19	17	1	0,00439
H136	15	19	7	16	1	0,00439
H137	15	19	15	17	1	0,00439
H138	15	19	17	17	1	0,00439
H139	15	19	18	17	1	0,00439
H140	15	19	19	18	1	0,00439
H141	15	19	20	19	1	0,00439
H142	15	20	15	17	1	0,00439
H143	15	20	16	16	1	0,00439
H144	15	20	16	17	1	0,00439
H145	15	20	17	19	1	0,00439
H146	15	21	8	13	1	0,00439
H147	15	21	16	17	1	0,00439
H148	15	21	17	18	1	0,00439
H149	15	21	18	17	1	0,00439
H150	15	22	14	18	1	0,00439
H151	15	22	17	18	1	0,00439
H152	15	22	18	16	1	0,00439
H153	15	22	18	18	1	0,00439
H154	16	17	16	16	1	0,00439
H155	16	18	17	17	1	0,00439
H156	16	18	17	18	1	0,00439
H157	16	18	18	17	1	0,00439
H158	16	18	19	17	1	0,00439
H159	16	19	7	13	1	0,00439
H160	16	19	17	17	1	0,00439
H161	16	20	16	16	1	0,00439
H162	16	21	7	13	1	0,00439
H163	16	22	17	17	1	0,00439
H164	17	20	18	17	1	0,00439

Tabla 41. Frecuencias haplotípicas del grupo de ligamiento DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 (N=113 hombres de la costa de Cantabria).

	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	N	Frecuencia
H1	11	33	20	12	4	0,03540
H2	11	33	21	11	4	0,03540
H3	11	34	20	12	4	0,03540
H4	11	32	20	12	3	0,02655
H5	11	33	20	11	3	0,02655
H6	11	34	21	10	3	0,02655
H7	12	34	20	11	3	0,02655
H8	8	34	21	11	2	0,01770
H9	11	31	20	11	2	0,01770
H10	11	32	22	11	2	0,01770
H11	11	33	21	12	2	0,01770
H12	11	34	22	11	2	0,01770
H13	11	34	23	11	2	0,01770
H14	12	31	21	11	2	0,01770
H15	12	33	20	10	2	0,01770
H16	12	33	20	11	2	0,01770
H17	12	33	22	11	2	0,01770
H18	12	34	20	12	2	0,01770
H19	12	34	21	12	2	0,01770
H20	10	30	22	12	1	0,00885
H21	10	31	20	11	1	0,00885
H22	10	33	20	12	1	0,00885
H23	10	33	21	12	1	0,00885
H24	10	34	20	13	1	0,00885
H25	11	28	20	11	1	0,00885
H26	11	28	22	11	1	0,00885
H27	11	29	21	11	1	0,00885
H28	11	30	21	12	1	0,00885
H29	11	31	15	12	1	0,00885
H30	11	31	21	12	1	0,00885
H31	11	31	22	10	1	0,00885
H32	11	31	22	11	1	0,00885
H33	11	31	22	13	1	0,00885
H34	11	32	19	11	1	0,00885
H35	11	32	19	14	1	0,00885
H36	11	32	20	11	1	0,00885
H37	11	32	20	13	1	0,00885
H38	11	32	21	12	1	0,00885
H39	11	32	23	11	1	0,00885
H40	11	32	24	13	1	0,00885
H41	11	33	19	11	1	0,00885
H42	11	33	21	9	1	0,00885
H43	11	33	22	11	1	0,00885
H44	11	33	22	13	1	0,00885
H45	11	33	23	11	1	0,00885
H46	11	33	23	12	1	0,00885
H47	11	34	20	11	1	0,00885
H48	11	34	21	11	1	0,00885
H49	11	34	21	12	1	0,00885
H50	11	34	21	13	1	0,00885
H51	11	35	20	10	1	0,00885
H52	11	35	21	11	1	0,00885
H53	11	35	22	11	1	0,00885

	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	N	Frecuencia
H54	12	30	20	11	1	0,00885
H55	12	31	15	13	1	0,00885
H56	12	31	16	12	1	0,00885
H57	12	31	20	12	1	0,00885
H58	12	31	22	12	1	0,00885
H59	12	31	24	9	1	0,00885
H60	12	32	20	11	1	0,00885
H61	12	32	20	12	1	0,00885
H62	12	32	21	10	1	0,00885
H63	12	32	23	12	1	0,00885
H64	12	33	20	12	1	0,00885
H65	12	33	21	10	1	0,00885
H66	12	33	21	12	1	0,00885
H67	12	33	22	14	1	0,00885
H68	12	33	23	12	1	0,00885
H69	12	34	21	11	1	0,00885
H70	12	34	22	11	1	0,00885
H71	12	35	15	11	1	0,00885
H72	13	30	20	11	1	0,00885
H73	13	31	20	9	1	0,00885
H74	13	32	20	11	1	0,00885
H75	13	32	20	14	1	0,00885
H76	13	32	21	11	1	0,00885
H77	13	32	21	12	1	0,00885
H78	13	32	22	11	1	0,00885
H79	13	33	20	11	1	0,00885
H80	13	34	21	12	1	0,00885
H81	13	35	20	11	1	0,00885
H82	13	35	22	13	1	0,00885
H83	13	36	21	12	1	0,00885
H84	14	31	20	11	1	0,00885

Tabla 42. Frecuencias haplotípicas del grupo de ligamiento DXS6801-6809-6789-6799 (N=114 mujeres de la costa de Cantabria).

	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	N	Frecuencia
H1	11	33	20	11	8	0,03509
H2	11	33	20	12	7	0,03070
H3	11	33	21	11	7	0,03070
H4	11	32	20	12	6	0,02632
H5	11	34	20	11	5	0,02193
H6	11	34	20	12	5	0,02193
H7	12	33	20	11	5	0,02193
H8	11	31	21	12	4	0,01754
H9	11	32	20	11	4	0,01754
H10	11	34	22	11	4	0,01754
H11	12	34	21	11	4	0,01754
H12	12	34	21	12	4	0,01754
H13	10	33	20	12	3	0,01316
H14	11	32	22	11	3	0,01316
H15	11	33	21	12	3	0,01316
H16	11	33	22	12	3	0,01316
H17	11	34	20	10	3	0,01316

	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	N	Frecuencia
H18	11	34	21	10	3	0,01316
H19	11	34	21	11	3	0,01316
H20	11	35	20	11	3	0,01316
H21	12	33	20	10	3	0,01316
H22	12	33	23	11	3	0,01316
H23	12	34	20	11	3	0,01316
H24	8	34	21	11	2	0,00877
H25	11	28	22	11	2	0,00877
H26	11	31	20	11	2	0,00877
H27	11	31	20	12	2	0,00877
H28	11	31	21	11	2	0,00877
H29	11	32	21	12	2	0,00877
H30	11	33	20	13	2	0,00877
H31	11	33	22	11	2	0,00877
H32	11	33	23	11	2	0,00877
H33	11	34	21	12	2	0,00877
H34	11	34	23	11	2	0,00877
H35	12	31	20	11	2	0,00877
H36	12	31	20	12	2	0,00877
H37	12	32	20	12	2	0,00877
H38	12	32	21	10	2	0,00877
H39	12	33	21	12	2	0,00877
H40	12	33	22	11	2	0,00877
H41	12	33	23	12	2	0,00877
H42	12	34	20	12	2	0,00877
H43	12	35	20	11	2	0,00877
H44	13	33	20	11	2	0,00877
H45	13	34	21	11	2	0,00877
H46	13	34	21	12	2	0,00877
H47	8	31	21	11	1	0,00439
H48	8	35	22	11	1	0,00439
H49	10	30	20	16	1	0,00439
H50	10	30	22	12	1	0,00439
H51	10	31	20	11	1	0,00439
H52	10	31	20	12	1	0,00439
H53	10	31	21	12	1	0,00439
H54	10	33	21	12	1	0,00439
H55	10	34	20	11	1	0,00439
H56	10	34	20	12	1	0,00439
H57	10	34	20	13	1	0,00439
H58	10	34	21	12	1	0,00439
H59	11	26	22	10	1	0,00439
H60	11	28	20	11	1	0,00439
H61	11	29	21	11	1	0,00439
H62	11	30	20	12	1	0,00439
H63	11	30	21	10	1	0,00439
H64	11	30	21	12	1	0,00439
H65	11	31	15	12	1	0,00439
H66	11	31	16	12	1	0,00439
H67	11	31	21	13	1	0,00439
H68	11	31	22	10	1	0,00439
H69	11	31	22	11	1	0,00439
H70	11	31	22	13	1	0,00439
H71	11	32	19	11	1	0,00439
H72	11	32	19	14	1	0,00439
H73	11	32	20	13	1	0,00439

	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	N	Frecuencia
H74	11	32	21	11	1	0,00439
H75	11	32	22	9	1	0,00439
H76	11	32	23	11	1	0,00439
H77	11	32	24	11	1	0,00439
H78	11	32	24	13	1	0,00439
H79	11	33	19	11	1	0,00439
H80	11	33	20	10	1	0,00439
H81	11	33	21	9	1	0,00439
H82	11	33	22	13	1	0,00439
H83	11	33	23	12	1	0,00439
H84	11	34	21	13	1	0,00439
H85	11	34	25	12	1	0,00439
H86	11	35	20	10	1	0,00439
H87	11	35	21	11	1	0,00439
H88	11	35	22	11	1	0,00439
H89	11	35	23	11	1	0,00439
H90	11	36	20	11	1	0,00439
H91	11	36	21	11	1	0,00439
H92	12	28	21	11	1	0,00439
H93	12	29	20	11	1	0,00439
H94	12	30	15	11	1	0,00439
H95	12	30	20	11	1	0,00439
H96	12	31	15	13	1	0,00439
H97	12	31	16	12	1	0,00439
H98	12	31	20	9	1	0,00439
H99	12	31	21	10	1	0,00439
H100	12	31	21	11	1	0,00439
H101	12	31	22	12	1	0,00439
H102	12	31	24	9	1	0,00439
H103	12	32	20	11	1	0,00439
H104	12	32	21	11	1	0,00439
H105	12	32	23	11	1	0,00439
H106	12	32	23	12	1	0,00439
H107	12	33	20	12	1	0,00439
H108	12	33	21	10	1	0,00439
H109	12	33	21	11	1	0,00439
H110	12	33	22	14	1	0,00439
H111	12	34	20	10	1	0,00439
H112	12	34	21	10	1	0,00439
H113	12	34	22	11	1	0,00439
H114	12	35	15	11	1	0,00439
H115	12	35	20	13	1	0,00439
H116	12	35	21	11	1	0,00439
H117	13	30	20	11	1	0,00439
H118	13	31	19	11	1	0,00439
H119	13	31	20	9	1	0,00439
H120	13	32	20	11	1	0,00439
H121	13	32	21	11	1	0,00439
H122	13	32	21	12	1	0,00439
H123	13	32	22	11	1	0,00439
H124	13	32	22	13	1	0,00439
H125	13	33	20	12	1	0,00439
H126	13	33	20	14	1	0,00439
H127	13	33	22	11	1	0,00439
H128	13	35	20	11	1	0,00439
H129	13	35	22	13	1	0,00439

	<b>DXS6801</b>	<b>DXS6809</b>	<b>DXS6789</b>	<b>DXS6799</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia</b>
H130	13	36	21	12	1	0,00439
H131	14	31	20	11	1	0,00439
H132	14	32	19	11	1	0,00439

Tabla 43. Frecuencias haplotípicas del grupo del grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 (N=22 varones del valle del Pas).

	<b>DXS7132</b>	<b>DXS10079</b>	<b>DXS10074</b>	<b>DXS10075</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia</b>
H1	12	19	19	18	2	0,09091
H2	13	15	17	16	1	0,04545
H3	13	18	19	18	1	0,04545
H4	13	19	17	17	1	0,04545
H5	13	20	16	17	1	0,04545
H6	13	20	17	17	1	0,04545
H7	13	20	18	17	1	0,04545
H8	13	21	18	14	1	0,04545
H9	13	21	18	18	1	0,04545
H10	13	21	20	17	1	0,04545
H11	13	22	13	17	1	0,04545
H12	13	22	18	18	1	0,04545
H13	13	23	13	17	1	0,04545
H14	14	17	16	16	1	0,04545
H15	14	20	7	13	1	0,04545
H16	14	20	15	17	1	0,04545
H17	14	20	18	17	1	0,04545
H18	15	20	19	17	1	0,04545
H19	15	22	14	17	1	0,04545
H20	16	20	16	18	1	0,04545
H21	16	22	14	17	1	0,04545

Tabla 44. Frecuencias haplotípicas del grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 (N=22 mujeres del valle del Pas).

	<b>DXS7132</b>	<b>DXS10079</b>	<b>DXS10074</b>	<b>DXS10075</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia</b>
H1	15	20	19	17	3	0,06667
H2	12	19	19	18	2	0,04444
H3	12	22	16	18	2	0,04444
H4	13	19	17	17	2	0,04444
H5	13	20	17	17	2	0,04444
H6	13	21	18	18	2	0,04444
H7	13	22	13	17	2	0,04444
H8	14	20	7	13	2	0,04444
H9	14	20	18	17	2	0,04444
H10	12	20	17	17	1	0,02222
H11	12	21	17	17	1	0,02222
H12	12	22	17	17	1	0,02222
H13	12	21	17	18	1	0,02222
H14	13	15	17	16	1	0,02222
H15	13	18	19	18	1	0,02222
H16	13	20	15	18	1	0,02222
H17	13	20	16	17	1	0,02222
H18	13	20	18	17	1	0,02222

	<b>DXS7132</b>	<b>DXS10079</b>	<b>DXS10074</b>	<b>DXS10075</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia</b>
H19	13	21	18	14	1	0,02222
H20	13	21	20	17	1	0,02222
H21	13	22	18	18	1	0,02222
H22	13	23	13	17	1	0,02222
H23	13	24	19	17	1	0,02222
H24	14	17	16	16	1	0,02222
H25	14	19	16	18	1	0,02222
H26	14	19	18	17	1	0,02222
H27	14	20	15	17	1	0,02222
H28	14	21	17	17	1	0,02222
H29	14	22	19	17	1	0,02222
H30	15	17	19	17	1	0,02222
H31	15	22	14	17	1	0,02222
H32	16	20	8	17	1	0,02222
H33	16	20	16	18	1	0,02222
H34	16	22	14	17	1	0,02222

Tabla 45. Frecuencias haplotípicas del grupo de ligamiento DXS6801-6809-6789-6799 (N=22 varones del valle del Pas).

	<b>DXS6801</b>	<b>DXS6809</b>	<b>DXS6789</b>	<b>DXS6799</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia</b>
H1	11	35	20	11	3	0,13636
H2	12	33	20	12	3	0,13636
H3	12	35	20	12	2	0,09091
H4	11	30	21	11	1	0,04545
H5	11	30	21	12	1	0,04545
H6	11	31	20	12	1	0,04545
H7	11	31	22	12	1	0,04545
H8	11	32	21	12	1	0,04545
H9	11	33	20	13	1	0,04545
H10	11	33	21	10	1	0,04545
H11	11	34	21	12	1	0,04545
H12	11	35	21	11	1	0,04545
H13	12	30	15	12	1	0,04545
H14	12	34	15	11	1	0,04545
H15	12	35	24	12	1	0,04545
H16	12	35	24	13	1	0,04545
H17	13	34	21	11	1	0,04545

Tabla 46. Frecuencias haplotípicas del grupo de ligamiento DXS6801-6809-6789-6799 (N=22 mujeres del valle del Pas).

	<b>DXS6801</b>	<b>DXS6809</b>	<b>DXS6789</b>	<b>DXS6799</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia</b>
H1	12	33	20	12	5	0,11111
H2	11	35	20	11	4	0,08889
H3	11	34	21	12	3	0,06667
H4	12	35	20	12	2	0,04444
H5	11	32	23	13	1	0,02222
H6	10	31	22	12	1	0,02222
H7	10	33	20	11	1	0,02222

	DXS6801	DXS6809	DXS6789	DXS6799	N	Frecuencia
H8	10	33	20	13	1	0,02222
H9	11	24	20	10	1	0,02222
H10	11	30	21	11	1	0,02222
H11	11	30	21	12	1	0,02222
H12	11	31	20	12	1	0,02222
H13	11	31	22	11	1	0,02222
H14	11	31	22	12	1	0,02222
H15	11	32	21	12	1	0,02222
H16	11	33	20	13	1	0,02222
H17	11	33	21	10	1	0,02222
H18	11	33	21	11	1	0,02222
H19	11	33	21	12	1	0,02222
H20	11	34	21	10	1	0,02222
H21	11	35	21	11	1	0,02222
H22	11	35	23	12	1	0,02222
H23	12	30	15	12	1	0,02222
H24	12	31	20	11	1	0,02222
H25	12	32	20	11	1	0,02222
H26	12	33	21	12	1	0,02222
H27	12	34	15	11	1	0,02222
H28	12	34	20	11	1	0,02222
H29	12	34	21	11	1	0,02222
H30	12	34	21	12	1	0,02222
H31	12	35	24	12	1	0,02222
H32	12	35	24	13	1	0,02222
H33	13	34	21	11	1	0,02222
H34	13	34	21	12	1	0,02222

#### IV.5.8. Estudio de mutaciones de los X-STRs

Se observaron un total de 9 mutaciones en los 15 X-STRs analizados. 5 de ellas consistieron en la pérdida de una unidad de repetición, y 4 en la ganancia de una unidad. La tasa de mutación global fue 0,03 y la tasa de mutación por locus fue 0,002. La tabla 47 muestra el número de meiosis en los STRs donde se observaron mutaciones y se indica en qué meiosis tuvo lugar la mutación (bien entre abuelo materno-madre o entre madre- hijo).

Tabla 47. Número de mutaciones observadas y meiosis en la que tuvo lugar.

	DXS7132	DXS10079	DXS10074	DXS6809	DXS6799	GATA31E08
<b>Paternal (abuelo → madre)</b>	1	2	1	1		1
<b>Maternal (madre → hijo)</b>		1	1		1	

## **V. DISCUSIÓN**

## V. DISCUSIÓN

Uno de los inconvenientes que se presentan en las muestras analizadas en Genética Forense es su elevada fragmentación y en ciertos casos la escasa cantidad de ADN disponible. La reducción de los tamaños amplificados utilizando miniSTRs constituye uno de los métodos más efectivos para proporcionar perfiles genéticos a partir de ADN degradado o en escasa cantidad. De esta manera, el trabajo presente expone el desarrollo y validación de una reacción multiplex empleando miniSTRs del cromosoma X (miniX), para proporcionar una herramienta efectiva en el análisis de casos complejos de parentesco a partir de material genético degradado y/o escaso.

### V.1. Reacción decaplex y sextaplex

Se presenta en primer lugar el análisis de STRs del cromosoma X mediante reacciones PCR multiplex (decaplex y sextaplex). Los X-STRs DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS9902 y DXS6789 se analizan mediante la reacción decaplex desarrollada y validada por Gusmão *et al.* [105]. Los X-STRs DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809 y DXS6789 se analizan por la reacción sextaplex desarrollada y validada en nuestro laboratorio [210]. Ambas reacciones pueden contribuir a resolver casos de parentesco complejos, especialmente cuando el ADN de uno a de ambos progenitores no está disponible. Además, los microsatélites incluidos en la reacción sextaplex fueron clasificados por el grupo de Szibor *et al.* en 2 grupos de ligamiento DXS10079-DXS10074-DXS10075 en Xq12 [86], y DXS6801-DXS6809-DXS6789 en Xq21 [85]. Ambos grupos establecen haplotipos estables de generación en generación, lo cual permite construir pedigrís familiares que facilitan la resolución de dichos casos.

### V.2. Reacción miniX

A continuación se presenta la reacción miniX para posibilitar el análisis de casos complejos de parentesco, a partir de fragmentos de ADN degradados que no excedan de 220 pb. MiniX ha demostrado ser una reacción multiplex, balanceada y específica, capaz de amplificar 8 loci X-STRs simultáneamente (DXS7132, DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809, DXS6789 y DXS6799) a partir de 0,5 ng de ADN molde. Los microsatélites fueron clasificados en 2 grupos de ligamiento, DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 en Xq12, y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 en Xq21. Siete de los ocho microsatélites de la reacción produjeron amplificados por debajo de las 200 pb.

Posteriormente, se discuten los resultados relativos a la validación y fiabilidad de la reacción miniX. Estos aspectos han sido demostrados a través de los estudios de concordancia, de los ensayos de determinación del porcentaje de alelos tartamudos, de la intensidad relativa de picos heterocigóticos (PHR), de los estudios de sensibilidad y de los análisis de muestras de ADN altamente degradadas.

#### V.2.1. Estudios de concordancia

El análisis de la fiabilidad de los resultados proporcionados por una nueva reacción multiplex es importante a la hora de evitar que se presenten discordancias con los resultados de las reacciones preexistentes ampliamente utilizadas. Estas discordancias pueden presentarse cuando se analizan los mismos STRs mediante diferentes parejas de cebadores y se producen, bien a causa de la existencia de mutaciones en las regiones de unión del extremo 3' de uno de los cebadores, dando lugar a pérdidas alélicas, o bien por la presencia de inserciones y/o deleciones en la región flanqueante a la repetición STR, dando lugar a variaciones en el tamaño de los alelos.

La fiabilidad de miniX ha sido comprobada mediante estudios de concordancia entre los perfiles obtenidos por este multiplex y los conseguidos por las reacciones decaplex y sextaplex. La reacción decaplex compartía 3 de los loci STRs incluidos en miniX (DXS6789, DXS6809 y DXS7132) y la reacción sextaplex compartía 6 de los loci STRs incluidos en miniX (DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS6801, DXS10075 y DXS10079). De modo que mediante la comparación con ambas reacciones se realizaron estudios de concordancia de 7 de los 8 loci STRs incluidos en miniX, con la excepción del locus DXS6799. Se constató la concordancia del 100 % entre los resultados de las tres reacciones comparadas, por lo que los perfiles genéticos obtenidos mediante miniX mostraron una alta fiabilidad.

#### V.2.2. Determinación del porcentaje de alelos tartamudos

La capacidad de análisis de un sistema multiplex requiere valorar el porcentaje de alelos tartamudos [25]. Un porcentaje alto de banda tartamuda puede llegar a confundirse con un alelo con intensidad de señal baja que no sobrepase el umbral estocástico. De esta manera, se puede complicar el rendimiento del genotipado de muestras con ADN escaso o la interpretación de mezclas de ADN, aspecto muy común en el análisis de muestras forenses [206].

Los alelos tartamudos se encontraron entre  $5,0 \pm 1,8$  y  $11,6 \pm 2,7$  % de los picos reales. Estos valores eran similares a los obtenidos por otros grupos de investigación en la validación de otros sistemas de análisis de loci STRs del cromosoma X, como el multiplex descrito por Asamura *et al* (5-10%) [199], y de otras reacciones multiplex de STRs autosómicos, tales como I-DNA-1 ( $4,0 \pm 2,1$  y  $11,4 \pm 2,2$ ) [197], I-DNA-2 ( $4,3 \pm 1,6$  y  $12,9 \pm 2,9$ ) [198] y *genRESMPX-3* ( $5,2 \pm 3,0$ -  $12,0 \pm 2,7$ ) [211]. En cambio, el porcentaje de banda tartamuda fue ligeramente más alto que el de las reacciones *MiniFiler™ PCR Amplification Kit* ( $4,9 \pm 1,5$  y  $8,8 \pm 1,9$ ) [195] y *AmpFℓSTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit* ( $2,2 \pm 0,9$  y  $7,46 \pm 1,3$ ) [209]. En conjunto, los bajos porcentajes de alelos tartamudos obtenidos para miniX favorecen el correcto genotipado de las muestras.

#### V.2.3. Determinación de la intensidad relativa entre picos heterocigóticos, PHR

Por otro lado, los valores de PHR definen el balance existente en la amplificación de heterocigotos. Para miniX se observó una PHR media inferior ( $77,6 \pm 13,8$  y  $83,1 \pm 10,1$ ) a la publicada por otros sistemas de identificación tales como I-DNA-1 ( $75,8 \pm 14,8$  y  $92,1 \pm 7,2$ ) [197], I-DNA-2 ( $84,6 \pm 10,2$  y  $90,5 \pm 10,5$ ) [198], *genRESMPX-3* ( $84,9 \pm 14,9$  y  $104,5 \pm 8,5$ ) [211], *MiniFiler™ PCR Amplification Kit* ( $87,0 \pm 33,8$  y  $88,4 \pm 35,0$ ) [195] y *AmpFℓSTR® Identifiler® Direct PCR Amplification Kit* ( $88,0$  y  $95,2$ ) [209]. En cualquier caso, para miniX se observó una PHR media superior al 80%, lo que supone un elevado balance entre heterocigotos. Este aspecto favorece en general el correcto genotipado de las muestras y en particular la interpretación de muestras con mezclas de ADN.

#### V.2.4. Estudio de sensibilidad

Como se menciona anteriormente, el análisis de la mayor parte de muestras analizadas en laboratorios forenses se ve perjudicado por contener cantidades reducidas de ADN, lo que proporciona la obtención de perfiles genéticos incompletos y, en consecuencia, no es posible comparar dichos perfiles con la totalidad de loci analizados para obtener la suficiente probabilidad de identidad o de parentesco. Por lo tanto, la sensibilidad es uno de los aspectos críticos en la obtención de perfiles de STRs con suficiente poder de discriminación a partir de muestras biológicas con escasa cantidad de ADN [155].

MiniX ofreció una alta sensibilidad, permitiendo el análisis de los 8 loci STRs incluidos a partir de cantidades de 20 pg. MiniX incluso permitió el análisis de 5 loci STR (un núcleo fijo de 4 loci STRs: DXS6799, DXS6789, DXS6809 y DXS10079; y DXS10075 ó DXS10074, en función de la réplica) en muestras con cantidades de ADN en el rango de 10 a 20 pg. Se comparó la

sensibilidad de miniX con otros dos sistemas que incluían miniSTR del cromosoma X desarrollados por Asamura *et al.* [199] y Diegoli *et al.* [200]. Las dos reacciones multiplex desarrolladas por Asamura *et al.* requerían al menos 20 pg de ADN molde para amplificar con éxito 8 loci X-STRs, cuyos tamaños de productos de amplificación se encontraban entre 71-169 bp. Las reacciones descritas por Diegoli *et al.* requerían al menos 200 pg de ADN para obtener perfiles completos, y 100 pg para perfiles con una pérdida de 1-2 marcadores. Estas reacciones amplificaban 15 STRs cuyos tamaños de productos de amplificación se encontraban entre 80-187 pb.

Se comparó la sensibilidad con otras reacciones que incluían STRs autosómicos.

Se observa que estos sistemas requerían cantidades mayores que miniX para la obtención de un perfil completo. Por un lado *PowerPlex® 16 system* y *PowerPlex® 16 HS system* (Promega® Corporation, EEUU) [212], así como *Identifiler®* (Applied Biosystems, Foster City, California) [213], requerían cantidades de ADN de 250, 62,5 y 250 pg respectivamente). Otros sistemas multiplex de amplia utilización son *genRESMPX-3* [211], *AmpFℓSTR Profiler Plus* y *AmpFℓSTR Cofiler multiplex system* [214], los cuales también requerían cantidades mayores de ADN molde que miniX, 120 pg el primero y 160 pg el segundo y el tercero.

La sensibilidad obtenida por miniX fue superior a la obtenida en la validación de otros sistemas que analizan miniSTRs y que requieren 62,5 pg como *Powerplex ESX systems* [196]; 100 pg de ADN molde como *Miniplex 1* [174], *Miniplex 2*, *Miniplex 4* [163] y *BioPlex* [149]; 125 pg de ADN como *MiniFiler* [195] y 250 pg como *BigMini* [163, 174]. Todas estas cantidades fueron necesarias para evitar las pérdidas alélicas en los perfiles obtenidos.

### V.3. Estudio comparativo de las estrategias de diseño de los conjuntos de cebadores de la presente invención respecto a los previamente existentes

Otro de los aspectos críticos para la obtención de perfiles genéticos a partir de muestras altamente degradadas debido a la fragmentación de su material genético es el tamaño de los amplicones [159]. Teniendo en cuenta la segunda estrategia de diseño de los Grupos de Trabajo Internacionales EDNAP y ENFSI [181], se desarrolló una reacción multiplex reduciendo el tamaño de los amplicones para el análisis de loci del cromosoma X ya incluidos en reacciones multiplex previamente existentes.

El estudio comparativo de los tamaños de los amplicones producidos por miniX (entre 101-219 pb) con respecto a los producidos por otras reacciones multiplex, demuestra que miniX es el único sistema disponible en la actualidad que permite analizar la totalidad de los loci STRs

DXS6799, DXS10074, DXS6789, DXS6809, DXS7132, DXS6801, DXS10075 y DXS10079 en una única reacción multiplex, incluyendo además, amplificados de menor tamaño que los previamente existentes en 6 de los 8 loci STRs incluidos. La excepción la constituyen los loci DXS6801 y DXS10074 que dan lugar a amplificados 37 y 27 pb mayores que los obtenidos mediante la reacción sextaplex desarrollada por nuestro grupo [210] y la desarrollada por Becker [70], respectivamente (Tabla 48).

Tabla 48. Comparación del tamaño en pares de bases de loci incluidos en miniX con otras reacciones multiplex previamente existentes.

MICROSATÉLITE	ALELOS	miniX	Otras multiplex	REFERENCIAS
DXS6799	8-14	101-125	113-137	[119]
DXS10074	7-21	137-193	110-166	[70]
DXS6789	14-25	106-150	122-166	[199]
			124-168	[200]
			154-198	[66]
			134-178	[111]
			135-179	[104]
DXS7132	11-17	106-130	146-190	[96]
			124-148	[105]
			153-177	[200]
			135-159	[104]
DXS6801	8-14	150-174	131-155	[111]
			113-137	[210]
			DXS10075	12-21.3
DXS10079	14-25	147-191	162-206	[119]
DXS6809	27- 38	175- 219	230- 274	[105, 210]

Este sistema permitirá, de esta manera, obtener un mayor rendimiento en el análisis de extractos de ADN que no superen las 150-200 pb, tamaño habitualmente considerado para loci miniSTRs [143]. Tampoco supera las 240 pb, tamaño característico en el ADN altamente degradado al ser el correspondiente a una unidad nucleosómica.

#### V.4. Estudio comparativo de la eficacia en el análisis de muestras de ADN altamente degradadas con miniX con respecto a las reacciones decaplex y sextaplex

La valoración de la capacidad de análisis de muestras de ADN altamente degradadas consistió en el análisis de muestras de parafina, caracterizadas por la elevada fragmentación de su ADN, mediante miniX, decaplex y sextaplex. MiniX dio lugar a amplificadores que se extienden entre 101-219 pb, decaplex entre 104-293 pb y sextaplex entre 113-315 pb.

Se pudo observar que con el diseño de miniSTRs se ha reducido los productos amplificados de los 3 loci compartidos con decaplex (DXS7132, DXS6809 y DXS6789) y se ha reducido los tamaños de 5 de los 6 loci compartidos con sextaplex (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6809 y DXS6789). El locus DXS6801 fue el único que da lugar a productos amplificados mayores en miniX que en sextaplex. También cabe señalar que, mediante miniX se producen los amplificadores de menor tamaño posible para el locus DXS6809 (175-219 pb), al haber sido diseñados en la zona directamente adyacente a la región repetitiva de dicho locus. El resto de loci STRs dan lugar a amplificadores menores de 200 pb.

Se observó que en el análisis de muestras altamente degradadas, la eficacia de miniX fue mayor que la de las reacciones decaplex y sextaplex, siendo esta reacción la única capaz de amplificar en su totalidad las muestras de mayor antigüedad.

Teniendo en cuenta los loci compartidos por miniX y decaplex, se observó que miniX alcanzó un rendimiento mayor que decaplex en 2 de los 3 microsatélites compartidos (DXS6809 y DXS6789). Por el contrario, el locus DXS7132 fue tipado en un mayor porcentaje con decaplex que con sextaplex, pero se comprobó que esta diferencia correspondía a alelos cuya altura de picos no superaban las 200 RFUs. Por otro lado, miniX superó el rendimiento obtenido mediante sextaplex en los 6 STRs compartidos por ambas reacciones.

En conjunto, nuestros resultados acerca del estudio comparativo, sugieren que aunque el rendimiento de la reacción decaplex es muy bueno para el análisis de muestras de ADN extraído de fragmentos de parafina, la reacción miniX puede llegar a ser más fiable cuando se trata de analizar material genético altamente degradado en donde sólo los fragmentos pequeños de ADN pueden ser amplificados.

A modo de conclusión señalar que, la presente validación ha puesto de manifiesto que miniX es una herramienta útil para resolver casos complejos de parentesco a partir de muestras de ADN extremadamente escaso o altamente degradado.

## V.5. Valoración forense de los STRs del cromosoma X

### V.5.1. Frecuencias alélicas y comparación entre las poblaciones de estudio

De cara a establecer la utilidad potencial en procesos de identificación, se determinaron las frecuencias alélicas de los 15 marcadores del cromosoma X en cada uno de los dos grupos analizados y se comparó la distribución de las frecuencias entre los mismos.

La comparación entre las 2 subpoblaciones de Cantabria puso de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias alélicas de 7 de los 15 marcadores del cromosoma X analizados (DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6809, DXS8378, DXS7133 y GATA172D05). Aunque estos resultados deben ser considerados como preliminares debido a que el tamaño muestral es pequeño, se tienen que tener en cuenta a la hora de resolver casos que involucren individuos procedentes de poblaciones aisladas, cuyas frecuencias pueden diferir de los datos de la población general a la cual pertenecen. No obstante, el valor del coeficiente de coancestralidad ( $F_{st}$ ) (1,9%) indica que existe una diferenciación muy pequeña entre las dos subpoblaciones estudiadas.

### V.5.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

No se encontraron evidencias de una desviación del equilibrio de HWE en ninguno de los loci analizados, tanto en la costa de Cantabria como en el valle del Pas, a excepción del locus DXS6809 en la costa de Cantabria. No obstante, en este caso, no se halló desviación, tras la aplicación de la corrección de Bonferroni para test múltiples. De esta manera, se puede deducir que las proporciones de los genotipos para los STRs de estudio se encuentran en equilibrio de HW.

### V.5.3. Estudio de las mutaciones de los X-STRs

El conocimiento de la tasa de mutación es un prerrequisito para que los resultados de los test de parentesco a partir del análisis de STRs sean fiables. En este trabajo, el valor de la tasa de mutación por locus es similar a los valores obtenidos en estudios previos [48, 66, 85, 86] y además se asemeja a los obtenidos en STRs autosómicos y del cromosoma Y [34, 35].

### V.5.4. Análisis del desequilibrio de ligamiento

El análisis de marcadores situados en el cromosoma X requiere conocer el desequilibrio de ligamiento, el cual mide la cosegregación no aleatoria de los alelos de los diferentes loci a nivel poblacional. En este trabajo, se analizó tanto el desequilibrio de ligamiento entre

microsatélites independientes, como entre microsatélites ligados. En el primer grupo de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075, se observó un desequilibrio de ligamiento significativo entre los loci DXS10079-DXS10074 y DXS10074-DXS10075, tanto en la costa de Cantabria como en la población del valle del Pas. Sin embargo, en el segundo grupo de ligamiento DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799, sólo se observa significación en el valle del Pas para los pares de X-STRs DXS6801-DXS6809 y DXS6809-DXS6789.

Estos resultados pueden parecer paradójicos, en vista del hecho de que varios de los STRs analizados se heredan en bloques haplotípicos. Sin embargo, otros autores han encontrado resultados similares. Así, en la población de China [127], Corea [128] y Argelia [124] no existió evidencia de desequilibrio de ligamiento entre DXS7132-DXS10074, ni en Argelia entre DXS7132-DXS10079 y DXS10074-DXS10079 [124]. Con respecto al segundo grupo de ligamiento, en la población de Japón [119] solo existió evidencia de ligamiento para DXS6789-DXS6799 y en la población de Pakistán [132] para DXS6801-DXS6789. En las poblaciones de Italia [99], Brasil [116] y Argelia [124], no se encontró desequilibrio de ligamiento entre los X-STRs del grupo DXS6801-DXS6809-DXS6789.

Además, en este estudio, se observó una asociación entre algunos loci de diferentes grupos de ligamiento, y también entre algunos loci pertenecientes a uno de los dos grupos de ligamiento con otros loci no incluidos en dichos grupos. Esto se explica porque el valor del desequilibrio de ligamiento no depende únicamente de la distancia, sino que va a estar influenciado por otros fenómenos, tales como, selección natural y mutación, deriva genética, efecto fundador, o la mezcla o la estratificación de las poblaciones [83, 84].

Es muy importante conocer estos valores ya que cuando existe desequilibrio de ligamiento entre X-STRs u otra evidencia de que son heredados en bloque, las frecuencias haplotípicas utilizadas para el cálculo de probabilidad de parentesco, tienen que ser estimadas directamente de las muestras de la población específica, con lo que no pueden ser calculadas a partir del producto de las frecuencias alélicas correspondientes por separado de cada marcador [85, 86].

#### V.5.5. Parámetros de eficacia forense

Para valorar si los marcadores analizados son informativos y útiles en la práctica médico-legal, se analizaron una serie de parámetros forenses.

Considerando que un valor de PIC superior a 0,50 indica que se trata de un marcador muy informativo, podemos afirmar que en la población costa de Cantabria, los 15 X-STRs analizados

son muy informativos (valores superiores a 0,50) a la hora de detectar variación genética. En el valle del Pas, 13 marcadores son muy informativos (valores superiores a 0,50), mientras que los loci DXS6801, y DXS7133 son medianamente informativos (valores entre 0,25 y 0,50).

Los microsatélites analizados en la costa de Cantabria y en el valle del Pas son altamente polimórficos, como lo reflejan los índices de heterocigosidad elevados (con valores medios de 0,72 y 0,69 en la costa de Cantabria y en el valle del Pas respectivamente).

En la costa de Cantabria, los loci DXS10074 y DXS10079 fueron los que presentaron valores mayores de PIC, heterocigosidad, poder de discriminación (tanto en mujeres como en hombres), y también mayor poder de exclusión (tanto para tríos como para dúos). Por otro lado, los loci con valores menores de PIC, heterocigosidad, poder de discriminación y probabilidad de exclusión fueron DXS6801, y DXS6799. En cambio, en la población del Pas, los loci DXS10074 y DXS6809 fueron los que presentaron valores mayores de PIC, heterocigosidad, poder de discriminación (tanto en mujeres como en hombres), y también mayor poder de exclusión (tanto para tríos como para dúos). Por otro lado, los loci con valores menores de PIC, heterocigosidad, poder de discriminación y probabilidad de exclusión fueron DXS6801 y DXS7133.

En conclusión, aun existiendo estas diferencias, se puede afirmar que todos los marcadores analizados ofrecen los valores óptimos necesarios para obtener un alto índice de paternidad o alta razón de verosimilitud desde el punto de vista forense.

#### V.5.6. Estudio de la segregación meiótica

Es muy importante llevar a cabo un análisis de segregación para comprobar si realmente existe ligamiento entre los loci estudiados. Nuestro estudio de segregación meiótica fue llevado a cabo en familias que incluían madres con 1 o más hijos varones y sus respectivos abuelos maternos. No se obtuvo información de las madres que eran homocigóticas para alguno de los loci analizados de cada bloque haplotípico. De acuerdo con los resultados obtenidos, incluso encontrando 2 recombinaciones en el primer bloque y 5 en el segundo, se concluyó que nuestros grupos de ligamiento, DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 en Xq12 localizado en una región de 2,343 Mb, y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 en Xq21 localizado en una región de 4,887 Mb, segregaban como haplotipos estables, proporcionando una herramienta útil para resolver casos complejos de parentesco. Las distancias genéticas publicadas en la literatura para estos bloques son de menos de 1 cM y 4,6 cM respectivamente. De acuerdo a nuestros resultados las distancias calculadas serían 2,18 cM y 6,59 cM.

#### V.5.7. Estudio de los grupos de ligamiento analizados

Los resultados de las frecuencias haplotípicas de los grupos de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 obtenidos en el trabajo presente, tanto de la población costa de Cantabria, como de la población valle del Pas, pueden ser utilizadas para comparaciones futuras con otras poblaciones y pueden resolver casos forenses cuyos individuos pertenezcan a dichas poblaciones de estudio.

La totalidad de los haplotipos analizados presentó un grado de heterocigosidad mayor de 0,9846 en la población costa de Cantabria y mayor de 0,9256 en el valle del Pas. Si bien la estabilidad de estos haplotipos debería ser aún estudiada en un mayor número de tríos familiares, estos posibles grupos de ligamiento pueden proporcionar información útil para resolver casos complejos de parentesco, tales como casos en ausencia de algún miembro familiar o análisis que incluyan familiares de generaciones más lejanas.

#### V.6. Consideraciones Finales

En la actualidad los miniSTRs siguen siendo una de las estrategias más utilizadas para obtener perfiles genéticos completos a partir de fragmentos de extrema degradación y/o en casos por debajo de 250 pg de material genético. Hasta la fecha son numerosos los grupos que han desarrollado y validado reacciones multiplex que analizan loci STRs de cromosomas autosómicos a partir de fragmentos de ADN que no superen las 240 pb. Las actuales líneas de investigación siguen estando dirigidas hacia esta dirección, y algunos trabajos siguen demostrando la eficacia de esta herramienta para obtener perfiles genéticos dónde el ADN es realmente complicado de aislar, como puede ser materiales que contengan células de contacto [215]. Por otra parte, se siguen buscando estrategias alternativas a la electroforesis capilar que permitan detectar variaciones de nucleótidos dentro de los fragmentos amplificados y de esta manera aumentar el poder de discriminación para el tipaje de STRs [216].

Es en el campo de los miniSTRs del cromosoma X donde, hasta el momento, no existen reacciones multiplex que proporcionen la posibilidad de analizar la totalidad de los grupos de ligamiento descritos hasta la fecha a partir de extractos de ADN altamente degradados. Por lo tanto, existe en primer lugar, la necesidad de que en un futuro se sigan desarrollando reacciones multiplex que permitan resolver casos en los que la información obtenida, por el análisis de STR autosómicos, del cromosoma Y e incluso microsatélites del cromosoma X que den lugar a amplificados mayores de 150-200 pb, no sea suficiente. Y si la investigación sigue el mismo hilo que los STRs autosómicos, en un futuro las tendencias anteriormente citadas, se

aplicarán a los miniSTRs del cromosoma X con el objetivo de aumentar y mejorar las herramientas disponibles para identificación humana por la comunidad forense.

En un futuro, los datos del cromosoma X obtenidos en este estudio pueden ser ampliados con la finalidad de su utilidad en estudios de genética de poblaciones. Estos datos pueden complementar datos filogenéticos, de ADN mitocondrial y del cromosoma Y. Además debido a que la población efectiva es más grande en el cromosoma X comparado con el ADN mitocondrial y el cromosoma Y, la variabilidad de análisis del cromosoma X potencialmente permite investigar eventos en la historia humana genética [217, 218].

## **VI. CONCLUSIONES**

## VI. CONCLUSIONES

1. Este trabajo ha dado lugar a la reacción sextaplex para la amplificación de los bloques haplotípicos DXS10079-DXS10074-DXS10075 localizado en Xq12 y DXS6801-DXS6809-DXS6789 localizado en Xq21. Se demuestra que esta reacción provee haplotipos estables que pueden ayudar a reconstruir la constitución cromosómica de pedigríes familiares y de esta manera, ayudar a resolver casos complejos de parentesco.
2. Se ha desarrollado una segunda reacción STR multiplex denominada miniX, cuyos tamaños de productos amplificados se encuentran entre 101-219 pb, para mejorar el análisis de muestras cuyos fragmentos de ADN se encuentren altamente degradados. Esta reacción multiplex amplifica mediante tecnología miniSTR, la totalidad de los X-STRs incluidos en la reacción sextaplex, además de los loci DXS7132 y DXS6799 que se incluyen dentro del primer y segundo bloque haplotípico respectivamente.
3. Se llevó a cabo la validación de la reacción miniX de acuerdo con la SGWDAM. Los resultados obtenidos de dicha validación muestran: una alta fiabilidad, una gran posibilidad de genotipar muestras con ADN escaso e interpretar los resultados de muestras con mezclas de ADN, elevada sensibilidad para obtener el tipaje de los 8 X-STRs incluidos en la reacción miniX a partir de 20 pg de ADN molde y una gran capacidad de analizar fragmentos de ADN degradado que no superen las 220pb.
4. El análisis de 15 microsatélites localizados en el cromosoma X mediante la reacción decaplex (optimizada y validada en un estudio colaborativo del GHEP-ISFG), y mediante las multiplexes sextaplex y miniX (desarrolladas y validadas en nuestro propio laboratorio), en 157 tríos familiares formados por abuelo materno, madre y uno o más hijos varones, los que pertenecían a dos subpoblaciones de la provincia de Cantabria (zona costera de Santander y valle del Pas) tiende a mostrar una diferenciación clara en la distribución de frecuencias alélicas, por lo que es recomendable en estos casos, crear bases de datos independientes para lograr de esta manera una interpretación correcta tanto en estudios forenses como de parentesco.
5. La tasa de mutación por locus obtenida ( $2 \times 10^{-3}$ ) se ajusta al rango de valores necesarios para que los resultados obtenidos a partir del análisis de los 15 X-STRs de este trabajo sean fiables.

6. El estudio de los parámetros de eficacia forense ha demostrado que en su conjunto, los 15 X-STRs son altamente polimórficos y presentan elevada heterocigosidad dentro de las dos subpoblaciones estudiadas. Estos resultados originan, a su vez, un poder de discriminación y de exclusión elevados, lo que demuestra que estas reacciones son herramientas de gran utilidad para resolver casos forenses y/o de parentesco en las poblaciones analizadas.
7. En este estudio se demuestra que los grupos de ligamiento DXS7132-DXS10079-DXS10074-DXS10075 en Xq12 localizado en una región de 2,343 Mb y DXS6801-DXS6809-DXS6789-DXS6799 en Xq21 en una región de 4,887 Mb, segregan como haplotipos estables. Tras presentar las frecuencias haplotípicas de los 2 grupos mencionados, ambos muestran una diversidad alta (mayor de 0,9846 en la costa de Cantabria y mayor de 0,9256 en el Valle del Pas). Ello demuestra su utilidad como herramienta en la resolución de casos complejos de parentesco que incluyan individuos pertenecientes a los grupos poblacionales estudiados.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

**VII. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] J.A.G. Calabuig, *Medicina Legal y Toxicología*, 5th ed., Masson, Barcelona, 1998.
- [2] A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA, *Nature*. 314 (1985) 67-73.
- [3] A. J. Jeffreys, J. F. Y. Brookfield, R. Semeonoff, Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints, *Nature*. 317 (1985) 818-819.
- [4] P. Gill, D.J. Werrett, Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting, *Forensic Sci. Int.* 35 (2-3) (1987) 145-148.
- [5] A.J. Jeffreys, V. Wilson, S.L. Thein, Individual-specific 'fingerprints' of human DNA, *Nature*. 316 (1985) 76-79.
- [6] K.B. Mullis, F.A. Faloon, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.* 155 (1987) 335-350.
- [7] J.C.S. Fowler, L.A. Burgoyne, A.C. Scott, H.W.J. Harding, Repetitive Deoxyribonucleic Acid (DNA) and human genome variation--a concise review relevant to forensic biology, *J. Forensic Sci.* 33 (1988) 1111-1126.
- [8] J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, et al. The sequence of the human genome, *Science*. 291 (2001) 1304-1351.
- [9] International Human Genome Sequencing Consortium, Finishing the euchromatic sequence of the human genome, *Nature*. 431 (2004) 931-945.
- [10] J.R. Ecker, W.A. Bickmore, I. Barroso, J. K. Pritchard, Y. Gilad, E. Segal, Genomics: ENCODE explained, *Nature*. 489 (2012) 52-55.
- [11] L.B. Jorde, J.C. Carey, M.J. Bamshad, *Genética Médica*, 4ª ed., Elsevier, Barcelona, 2011;2:19
- [12] E.R. Havecker, X. Gao, D. F. Voytas, The diversity of LTR retrotransposons, *Genome Biol.* 5(6) (2004) 225.
- [13] A.F.A. Smit, Interspersed repeats and others mementos of transposable elements in mammalian genomes, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9(1999) 657- 663.
- [14] M. Frommer, J. Prosser, D. Tkachuk, A. H. Reisner, P.C. Vicent, Simple repeated sequences in human satellite DNA, *Nucleic Acids. Res.* 10 (2) (1982) 547- 563.
- [15] J.L. Weber, P.E. Way, Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, *Am. J. Hum. Genet.* 44(3) (1989) 388-396.
- [16] J.M. Butler, Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing, *Biotechniques.* 43(4) (2007) Sii-Sv.
- [17] J.M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2010.
- [18] Q.H. Yuan, A. Tanaka, R.H. Kaszynski, M. Iino, T. Okuno, T. Tsuruyama, et al. Minisatellite MS32 alleles show population specificity among Thai, Chinese, and Japanese, *J. Mol. Evol.* 68(2) (2009) 126- 133.
- [19] A.D. Kloosterman, B. Budowle, P. Daselaar, PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus: Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis, *Int. J. Legal Med.* 105 (1993) 257-264.
- [20] H.A. Erlich, E.L. Sheldon, J.Horn, HLA typing using DNA probes, *Bio. Technol.* 4 (1986) 975-981.
- [21] K. Kasai, Y. Nakamura, R. White, Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science, *J. Forensic Sci.* 35(5) (1990) 1196- 1200.
- [22] G. Tully, K.M. Sullivan, P. Gill, Analysis of 6 VNTR loci by 'multiplex' PCR and automated fluorescent detection, *Hum. Genet.* 92(6) (1993) 554- 562.

- [23] P. Gill, Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK—Past, Present, and Future perspectives, *Biotechniques*. 32(2002) 366-385.
- [24] M. Klintschar, P. Wiegand, Polymerase slippage in relation to the uniformity of tetrameric repeat stretches, *Forensic Sci. Int.* 135(2) (2003) 163- 166.
- [25] P.S. Walsh, N. J. Fildes, R. Reynolds, Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA, *Nucleic Acids Res.* 24(14) (1996) 2807- 2812.
- [26] P. Gill, C.P. Kimpton, A. Urquhart, N. Oldroyd, E.S. Millican, S.K. Watson, et al. Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework—a strategy for the future, *Electrophoresis*, 16(9) (1995) 1543- 1552.
- [27] A. Urquhart, C.P. Kimpton, T.J. Downes, P. Gill, Variation in short tandem repeat sequences—a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers, *Int. J. Legal Med.* 107(1) (1994) 13- 20.
- [28] P. Gill, B. Brinkmann, E. d’Aloja, J. Andersen, W. Bär, A. Carracedo, et al. Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature, *Forensic Sci. Int.* 87(3) (1997) 185-192.
- [29] A. Carracedo, M.V. Lareu, Development of new STRs for forensic casework: criteria for selection, sequencing & population data and forensic validation, *Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification*. Madison, Wisconsin: Promega Corporation (1998) 89-107.
- [30] J. M Butler, Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing, *J. Forensic Sci.* 51(2) (2006) 253-265.
- [31] F. González- Andrade, D. Sánchez, G. Penacino, B. Martínez Jarreta, Two fathers for the same child: A deficient paternity case of false inclusion with autosomic STRs, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (2009) 138–140.
- [32] P. Gill, C.H. Brenner, J.S. Buckleton, A. Carracedo, M. Krawczak, W.R. Mayr, et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures, *Forensic Sci. Int.* 160(2-3) (2006) 90–101.
- [33] W. Bär, B. Brinkmann, B. Budowle, A. Carracedo, P. Gill, P. Lincoln, et al. DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Society for Forensic Haemogenetics*, *Int. J. Legal Med.* 110(4) (1997) 175- 176.
- [34] F. Aşcioğlu, F. Oguz-Savran, U. Ozbek, Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience, *Dis. Markers*, 20(6) (2004) 313- 315.
- [35] B. Brinkmann, M. Klintschar, F. Neuhuber, J. Hühne, B. Rolf, Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat, *Am. J. Hum. Genet.* 62 (6) (1998) 1408-1415.
- [36] P.D. Martin, H. Schmitter, P.M. Schneider, A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe, *Forensic Sci. Int.* 119(2) (2001) 225-231.
- [37] UE, DECISIÓN 2008/615/JAI DEL CONSEJO, destinada a transponer el Tratado de Prüm en el marco jurídico de la UE. 2008.
- [38] V.L. Pascali, M. Dobosz, B. Brinkmann, Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts, *Int. J. Legal Med.* 112(1) (1999) 1.
- [39] J.J. Mulero, C.W. Chang, L.M. Calandro, R.L. Green, Y.Li, C.L. Johnson, et al. Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system, *J. Forensic Sci.* 51(1) (2006) 64-75.
- [40] M.C. Edwards, R.A. Gibbs, Multiplex PCR: advantages, development, and applications, *PCR Methods Appl. Genome Res.* 3(4) (1994) S65-S75.
- [41] A.E. Barron, H.W. Blanch, DNA separations by slab gel and capillary electrophoresis: Theory and practice, *Sep. Purif. Methods*, 24 (1995) 1-118.
- [42] H.W. White, N. Kusakawa, Agarose-based system for separation of short tandem repeat loci, *Biotechniques*. 22(5) (1997) 976-980.

- [43] B.J. Bassam, G. Caetano-Anollés, P.M. Gresshoff, Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 196(1) (1991) 80-83.
- [44] J.M. Butler, The use of capillary electrophoresis in genotyping STR loci, *Methods Mol. Biol.* 98 (1998) 279-289.
- [45] V. Dolník, DNA sequencing by capillary electrophoresis (review), *J. Biochem. Biophys. Methods.* 41(2-3) (1999) 103- 119.
- [46] J.M. Butler, E. Buel, F. Crivellente, B.R. McCord, Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis, *Electrophoresis.* 25(10-11) (2004) 1397-1412.
- [47] R. Szibor, X-chromosomal markers: past, present and future, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2) (2007) 93- 99.
- [48] R. Szibor, M. Krawczak, S. Hering, J. Edelmann, E. Kuhlisch, D. Krause, Use of X-linked markers for forensic purposes, *Int. J. Legal Med.* 117(2) (2003) 67-74.
- [49] C.M. Hearne, J.A. Todd, Tetranucleotide repeat polymorphism at the HPRT locus, *Nucleic Acids Res.* 19 (19) (1991) 5450.
- [50] A. Edwards, H.A. Hammond, L. Jin, C.T. Caskey, R. Chakraborty, Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups, *Genomics.* 12(2) (1992) 241–253.
- [51] D. Desmarais, Y. Zhong, R. Chakraborty, C. Perreault, L. Busque, Development of a highly polymorphic STR marker for identity testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA), *J. Forensic Sci.* 43(5) (1998) 1046–1049.
- [52] T. Kishida, W. Wang, M. Fukuda, Y. Tamaki, Duplex PCR of the Y-27H39 and HPRT loci with reference to Japanese population data on the HPRT locus, *Nihon Hoigaku Zasshi.* 51(2) (1997) 67–69.
- [53] J. Edelmann, R. Szibor, Validation of the HumDXS6807 short tandem repeat polymorphism for forensic application, *Electrophoresis.* 20(14) (1999) 2844-2846.
- [54] S. Hering, R. Szibor, Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker DXS9898 for forensic purposes, *J. Forensic Sci.* 45(4) (2000) 929-931.
- [55] G. Watanabe, K. Umetsu, I. Yuasa, T. Suzuki, DXS10011: a hypervariable tetranucleotide STR polymorphism on the X chromosome, *Int. J. Legal Med.* 113(4) (2000) 249–250.
- [56] J. Edelmann, R. Szibor, DXS101: a highly polymorphic X-linked STR, *Int. J. Legal Med.* 114(4-5) (2001) 301- 304.
- [57] S. Hering, E. Kuhlisch, R. Szibor, Development of the X-linked tetrameric microsatellite marker HumDXS6789 for forensic purposes, *Forensic Sci. Int.* 119(1) (2001) 42- 46.
- [58] M.T. Zarrabeitia, T. Amigo, C. Sañudo, M.M. de Pancorbo, J.A. Riancho, Sequence structure and population data of two X-linked markers: DXS7423 and DXS8377, *Int. J. Legal Med.* 116(6) (2002) 368-371.
- [59] M.T. Zarrabeitia, T. Amigo, C. Sañudo, A. Zarrabeitia, D. González-Lamuño, J.A. Riancho, A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome, *Forensic Sci. Int.* 129 (2) (2002) 85- 89.
- [60] J. Edelmann, S. Hering, E. Kuhlisch, R. Szibor, Validation of the STR DXS7424 and the linkage situation on the X-chromosome, *Forensic Sci. Int.* 125 (2-3) (2002) 217- 222.
- [61] M.T. Ross, D.V. Grafham, A.J. Coffey, S. Scherer, K. McLay, D. Muzny, et al. The DNA sequence of the human X chromosome, *Nature.* 434(7031) (2005) 325- 337.
- [62] M.F. Lyon, Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus Musculus L.*), *Nature.* 190 (1961) 372- 373.
- [63] M.J. Wakefield, J.A.M. Graves, Chromosome X: General Features, *Encyclopedia of life sciences* (2006).
- [64] P.S. Burgoyne, Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals, *Hum. Genet.* 61(2) (1982) 85-90.

- [65] L. Gusmão, C. Alves, I. Gomes, P. Sánchez-Diz, Capillary electrophoresis of an X-chromosome STR decaplex for kinship deficiency cases, *Methods Mol. Biol.* 830 (2012) 57-71.
- [66] Q.L. Liu, D.J. Lv, X.L. Wu, H.Y. Sun, X.Y. Wu, H.L. Lu, Development of a five ChX STRs loci typing system, *Int. J. Legal Med.* 122 (3) (2008) 261- 265.
- [67] M.T. Zarrabeitia, A. Alonso, J. Martin, M.A. González-Gay, J.C. Martin-Escudero, M. M. de Pancorbo, et al. Study of six X-linked tetranucleotide microsatellites: population data from five Spanish regions, *Int. J. Legal Med.* 120(3) (2006) 147- 150.
- [68] I. Gomes, M. Prinz, R. Pereira, E. Bieschke, W.R. Mayr, A. Amorim, et al. X-chromosome STR sequence variation, repeat structure, and nomenclature in humans and chimpanzees, *Int. J. Legal Med.* 123 (2) (2009) 143-149.
- [69] M.T. Zarrabeitia, V. Mijares, J.A. Riancho, Forensic efficiency of microsatellites and single nucleotide polymorphisms on the X chromosome, *Int. J. Legal Med.* 121 (6) (2007) 433-437.
- [70] D. Becker, H. Rodig, C. Augustin, J. Edelmann, F. Götz, S. Hering, et al. Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit, *Forensic Sci. Int. Genet.* 2(1) (2008) 69-74.
- [71] R. Szibor, I. Plate, J. Edelmann, S. Hering, E. Kuhlisch, M. Michael, et al. Chromosome X haplotyping in deficiency paternity testing principles and case report, *Int. Congr. Ser.* 1239 (2003) 815- 820.
- [72] M. Nei, A.K. Roychoudhury, Sampling variances of heterozygosity and genetic distance, *Genetics.* 76 (2) (1974) 379-390.
- [73] D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick, R.W. Davis, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.* 32(3) (1980) 314-331.
- [74] M. Clement-Jones, S. Schiller, E. Rao, R.J. Blaschke, A. Zuniga, R. Zeller, et al. The short stature homeobox gene SHOX is involved in skeletal abnormalities in Turner syndrome, *Hum. Mol. Genet.* 9(5) (2000) 695–702.
- [75] A. Bojesen, S. Juul, C.H. Gravholt, Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(2) (2003) 622–626.
- [76] P.F. Wieacker, I. Knoke, S. Jakubiczka, Clinical and molecular aspects of androgen receptor defects, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 106(6) (1998) 446–453.
- [77] S. Hering, C. Augustin, J. Edelmann, M. Heidel, J. Dreßler, R. Szibor, A cluster of six closely linked STR-markers: Recombination analysis in a 3.6-Mb region at Xq12-13.1, *Int. Congr. Ser.* 1288 (2006) 289-291.
- [78] P. Taillon-Miller, I. Bauer- Sardiña, N.L. Saccone, J. Putzel, T. Laitinen, A. Cao, et al. Juxtaposed regions of extensive and minimal linkage disequilibrium in human Xq25 and Xq28, *Nat. Genet.* 25(3) (2000) 324- 328.
- [79] M. Krawczak, Kinship testing with X-chromosomal markers: mathematical and statistical issues, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2) (2007) 111- 114.
- [80] J. Edelmann, S. Hering, C. Augustin, S. Kalis, R. Szibor, Validation of six closely linked STRs located in the chromosome X centromere region, *Int. J. Legal Med.* 124(1) (2010) 83-87.
- [81] S. Hering, J. Edelmann, C. Augustin, E. Kuhlisch, R. Szibor, X chromosomal recombination—a family study analyzing 39 STR markers in German three-generation pedigrees, *Int. J. Legal Med.* 124(5) (2010) 483–491.
- [82] A.O. Tillmar, P. Mostad, T. Egeland, B. Lindblom, G. Holmlund, K. Montelius, Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3(1) (2008) 37–41.
- [83] H.Y. Lee, M.J. Park, C.K. Jeong, S.Y. Lee, J.E. Yoo, U. Chung, et al. Genetic characteristics and population study of 4 X-chromosomal STRs in Koreans: evidence for a null allele at DXS9898, *Int. J. Legal Med.* 118 (6) (2004) 355-360.

- [84] S. Hering, N. Brundirs, E. Kuhlisch, J. Edelmann, I. Plate, M. Benecke, et al. DXS10011: studies on structure, allele distribution in three populations and genetic linkage to further q-telomeric chromosome X markers, *Int. J. Legal. Med.* 118 (6)(2004) 313-319.
- [85] R. Szibor, S. Hering, E. Kuhlisch, I. Plate, S. Demberger, M. Krawczak, et al. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing, *Int. J. Legal Med.* 119 (6) (2005) 363-369.
- [86] S. Hering, C. Augustin, J. Edelmann, M. Heidel, J. Dressler, H. Rodig, et al. DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases, *Int. J. Legal Med.* 120(6) (2006) 337-345.
- [87] J.E. Sim, H.Y. Lee, W.I. Yang, K.J. Shin, Population genetic study of four closely-linked X-STR trios in Koreans, *Mol. Biol. Rep.* 37(1) (2010) 333-337.
- [88] R. Szibor, S. Hering, J. Edelmann, A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online, *Int. J. Legal Med.* 120(4) (2006) 252-254.
- [89] R. Szibor, J. Edelmann, S. Hering, I. Plate, H. Wittig, L. Roewer, et al. Cell line DNA typing in forensic genetics—the necessity of reliable standards, *Forensic Sci. Int.* 138 (1-3) (2003) 37–43.
- [90] Mentype Argus X-UL kit. User's manual. Biotype (2004).
- [91] P. Wiegand, B. Berger, J. Edelmann, W. Parson, Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs, *Int. J. Legal Med.* 117(1) (2003) 62-65.
- [92] D. Athanasiadou, B. Stradmann- Bellinghausen, C. Rittner, K.W. Alt, P.M. Schneider, Development of a quadruplex PCR system for the genetic analysis of the X-chromosomal STR loci, *Int. Congr. Ser.* 1239 (2003) 311-314.
- [93] K. J. Shin, B.K. Kwon, S.S. Lee, J.E. Yoo, M.J. Park, U. Chung, et al. Five highly informative X-chromosomal STRs in Korean, *Int. J. Legal Med.* 118(1) (2004) 37-40.
- [94] C. Bini, S. Ceccardi, G. Ferri, S. Pelotti, M. Alú, E. Roncaglia, et al. Development of a heptaplex PCR system to analyse X-chromosome STR loci from five Italian population samples. A collaborative study, *Forensic Sci. Int.* 153(2-3) (2005) 231-236.
- [95] M. Poetsch, H. Petersmann, A. Repenning, E. Lignitz, Development of two pentaplex systems with X-chromosomal STR loci and their allele frequencies in a northeast German population, *Forensic Sci. Int.* 155 (1) (2005) 71-76.
- [96] K. A. Tabbada, M.C. De Ungria, L.P. Faustino, D. Athanasiadou, B. Stradmann-Bellinghausen, P.M. Schneider, Development of a pentaplex X-chromosomal short tandem repeat typing system and population genetic studies, *Forensic Sci. Int.* 154 (2-3) (2005) 173-180.
- [97] C. Augustin, R. Cichy, S. Hering, J. Edelmann, E. Kuhlisch, R. Szibor, Forensic evaluation of three closely linked STR markers in a 13 Kb region at Xp11.23, *Int. Congr. Ser.* 1239 (2006) 311-314.
- [98] H. Asamura, H. Sakai, M. Ota, H. Fukushima, Japanese population data for eight X-STR loci using two new quadruplex systems, *Int. J. Legal Med.* 120 (5) (2006) 303-309.
- [99] C. Robino, A. Giolitti, S. Gino, C. Torre, Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 12 X-chromosomal STR loci in a northwestern Italian population sample, *Int. J. Legal Med.* 120 (5) (2006) 315-318.
- [100] R. W. Pereira, S.D. Pena, Phylogeography of haplotypes of five microsatellites located in a low-recombination region of the X chromosome: studies worldwide and in Brazilian populations, *Genetica.* 126 (1-2) (2006) 243-250.
- [101] S. Turrina, R. Atzei, G. Filippini, D. De Leo, Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2) (2007) 201-204.
- [102] T. Fracasso, M. Schürenkamp, B. Brinkmann, C. Hohoff, An X-STR meiosis study in Kurds and Germans: allele frequencies and mutation rates, *Int. J. Legal Med.* 122 (4) (2008) 353-356.

- [103] J. Edelmann, S. Hering, C. Augustin, R. Szibor, Characterization of the STR markers DXS10146, DXS10134 and DXS10147 located within a 79.1 Kb region at Xq28, *Forensic Sci. Int. Genet.* 2 (1) (2008) 41- 46.
- [104] E.M. Ribeiro Rodrigues, F.P. Leite, M.H. Hutz, J. Palha Tde, A.K. Ribeiro dos Santos, S.E. dos Santos, A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2(2) (2008) 154-158.
- [105] L. Gusmão, P. Sánchez-Diz, C. Alves, I. Gomes. M.T. Zarrabeitia, M. Abovich, et al. A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations, *Int. J. Legal Med.* 123(3) (2009) 227-234.
- [106] J. Aquino, C. Peixe, D. Silva, C. Tavares, E.F. de Carvalho, A X-chromosome STR hexaplex as a powerful tool in deficiency cases, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 2 (2009) 45-46.
- [107] H. Li, H. Tang, Q. Zhang, Z. Jiao, J. Bai, S. Chang, A multiplex PCR for 4 X chromosome STR markers and population data from Beijing Han ethnic group, *Legal Med.* 11 (5) (2009) 248-250.
- [108] H.L. Hwa, Y.Y. Chang, J.C. Lee, H.Y. Yin, Y.H. Chen, L.H. Tseng, et al. Thirteen X-chromosomal short tandem repeat loci multiplex data from Taiwanese, *Int. J. Legal Med.* 123(3) (2009) 263-269.
- [109] I.H. Ferreira da Silva, A.G. Barbosa, D.A. Azevedo, P. Sánchez-Diz, L. Gusmão, C.C. Tavares, et al. An X-chromosome pentaplex in two linkage groups: haplotype data in Alagoas and Rio de Janeiro populations from Brazil, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (4) (2010) e95-e100.
- [110] H. Rodig, F. Kloep, L. Weissbach, C. Augustin, J. Edelmann, S. Hering, et al. Evaluation of seven X-chromosomal short tandem repeat loci located within the Xq26 region, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4(3) (2010) 194-199.
- [111] Y. Nakamura, K. Minaguchi, Sixteen X-chromosomal STRs in two octaplex PCRs in Japanese population and development of 15-locus multiplex PCR system, *Int. J. Legal Med.* 124(5) (2010) 405–414.
- [112] Q.L. Liu, D.J. Lu, X.G. Li, H. Zhao, J.M. Zhang, Y.K. Lai, et al. Development of the nine X-STR loci typing system and genetic analysis in three nationality populations from China, *Int. J. Legal Med.* 125(1) (2011) 51-58.
- [113] C. Li, T. Ma, S. Zhao, S. Zhang, J. Xu, Z. Zhao, et al. Development of 11 X-STR loci typing system and genetic analysis in Tibetan and Northern Han populations from China, *Int. J. Legal Med.* 125(5) (2011) 753-756.
- [114] C. Tomas, V. Pereira, N. Morling, Analysis of 12 X-STRs in Greenlanders, Danes and Somalis using Argus X-12, *Int. J. Legal Med.* 126 (1) (2012) 121–128.
- [115] J. Edelmann, S. Lutz-Bonengel, J. Naue, S. Hering, X-chromosomal haplotype frequencies of four linkage groups using the Investigator Argus X-12 Kit, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6(1) (2012) e24–e34.
- [116] L.S. Penna, F.G. Silva, P.H. Salim, G. Ewald, M. Jobim, J.A. Magalhães, et al. Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 14 X-chromosomal STR loci in a southern Brazilian population sample, *Int. J. Legal Med.* 126(2) (2012) 327-30.
- [117] Q.L. Liu, H. Zhao, J.D. Chen, X.G. Wang, D.J. Lu, L. Quan, Development and population study of the 12 X-STR loci multiplexes PCR systems, *Int. J. Legal Med.* 126(4) (2012) 665–670.
- [118] Q. L. Liu, D.J. Lu, L. Quan, Y.F. Chen, M. Shen, H. Zhao, Development of multiplex PCR system with 15 X-STR loci and genetic analysis in three nationality populations from China, *Electrophoresis.* 33(8) (2012) 1299-1305.
- [119] M. Samejima, Y. Nakamura, K. Minaguchi, Population genetic study of six closely linked groups of X-STRs in a Japanese population, *Int. J. Legal Med.* 125(6) (2011) 895-900.

- [120] L.S. Penna, F.G. Silva, P.H. Salim, G. Ewald, M. Jobim, J.A. A. Magalhães, Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 14 X-chromosomal STR loci in a southern Brazilian population sample, *Int. J. Legal Med.* 126 (2012) 327-330.
- [121] K.M. Sullivan, A. Mannucci, C.P. Kimpton CP, P. Gill, A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, *Biotechniques*. 15(4) (1993) 636-638, 640-641.
- [122] F.B. Machado, E. Medina-Acosta, Genetic map of human X-linked microsatellites used in forensic practice, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (3) (2009) 202- 204.
- [123] T. Hundertmark, S. Hering, J. Edelmann. C. Augustin, I. Plate, R. Szibor, The STR cluster DXS10148–DXS8378–DXS10135 provides a powerful tool for X-chromosomal haplotyping at Xp22, *Int. J. Legal Med.* 122(6) (2008) 489-492.
- [124] A. Bekada, S. Benhamamouch, A. Boudjema, M. Fodil, S. Menegon, C. Torre, et al. Analysis of 21 X-chromosomal STRs in an Algerian population sample, *Int. J. Legal Med.* 124(4) (2010) 287-294.
- [125] Letter to the Editor, X-chromosomal haplotype frequencies of four linkage groups using the Investigator Argus X-12 Kit, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) e24–e34.
- [126] X.P. Zeng, Z. Ren, J.D. Chen, D.J. Lv, D.Y. Tong, H. Chen, et al. Genetic polymorphisms of twelve X-chromosomal STR loci in Chinese Han population from Guangdong Province, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5(4) (2011) e114– e116.
- [127] H.B. Luo, Y. Ye, Y.Y. Wang, W.B. Liang, L.B. Yun, M. Liao, et al. Characteristics of eight X-STR loci for forensic purposes in the Chinese population, *Int. J. Legal Med.* 125(1) (2011) 127–131.
- [128] E.J. Lim, H.Y. Lee, J.E. Sim, W.I. Yang, K.J. Shin, Genetic polymorphism and haplotype analysis of 4 tightly linked X-STR duos in Koreans, *Croat. Med. J.* 50(3) (2009) 305–312.
- [129] M. Jędrzejczyk, R. Jacewicz, J. Berent, Distribution of chromosome X STR markers DXS10135, DXS10074, DXS10101, and DXS10134 and their usefulness in forensic genetics, *Probl. Forensic Sci.* LXXVII (2009) 89-97.
- [130] A. Zalán, A. Völgyi, W. Brabetz, D. Schleinitz, H. Pamjav, Hungarian population data of eight X-linked markers in four linkage groups, *Forensic Sci. int.* 175(1) (2008) 73-78.
- [131] S. Massetti, E. Carnevali, M. Lancia, A. Coletti, M. Dobosz, M. Bacci, et al. Analysis of 8 STR of the X-chromosome in two Italian regions (Umbria and Sardinia), *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 1* (2008) 157- 159.
- [132] M. A. Tariq, M.F. Sabir, S.A. Riazuddin, S. Riazuddin, Haplotype analysis of two X-chromosome STR clusters in the Pakistani population, *Int. J. Legal Med.* 123(1) (2009) 85-87.
- [133] S.F. Schaffner, The X chromosome in population genetics, *Nat. Rev. Genet.* 5(1) (2004) 43-51.
- [134] C. Bobillo, A. Sala, L. Gusmão, D. Corach, Genetic analysis of 10 X-STRs in Argentinian population, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5(1) (2011) e14-e16.
- [135] I. Gomes, M. Prinz, R. Pereira, C. Meyers, R. S. Mikulasovich, A. Amorim, et al. Genetic analysis of three US population groups using an X-chromosomal STR decaplex, *Int. J. Legal Med.* 121(3) (2007) 198-203.
- [136] J.A. Martins, J.C. Costa, G.G. Paneto, R.F. Figueiredo, L. Gusmão, P. Sánchez- Diz, et al. Genetic profile characterization of 10 X-STRs in four populations of the southeastern region of Brazil, *Int. J. Legal Med.* 124(5) (2010) 427–432.
- [137] M.T. Zarrabeitia, F. Pinheiro, M.M. De Pancorbo, L. Cainé, S. Cardoso, L. Gusmão, et al. Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3(2) (2009) 63-66.
- [138] I. Gomes, C. Alves, K. Maxzud, R. Pereira, M.J. Prata, P. Sánchez-Diz, et al. Analysis of 10 X-STRs in three African populations, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2) (2007) 208-211.

- [139] M. Castañeda, A. Odriozola, V. Mijares, M.T. Zarrabeitia, Study of two X- linked microsatellite blocks: Allelic frequencies in mixed and isolated population groups, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 3* (2011) e248-e250.
- [140] R. Alaeddini, S.J. Walsh, A. Abbas, Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4(3) (2010) 148-157.
- [141] R.B. Jennings, C.E. Ganote, K.A. Reimer, Ischemic tissue injury, *Am. J. Pathol.* 81(1) (1975) 179–198.
- [142] C.J. Zeiss, The apoptosis–necrosis continuum: insights from genetically altered mice, *Vet. Pathol.* 40(5) (2003) 481–495.
- [143] A. Odriozola, J.M. Aznar, D. Celorrio, M.M. De Pancorbo, Recent advances and considerations for the future in forensic analysis of degraded DNA by autosomic miniSTR multiplex genotyping, *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 5(2) (2011) 110-116.
- [144] D.V. Krysko, T. Vanden Berghe, K. D’Herde, P. Vandenabeele, Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis, *Methods.* 44(3) (2008) 205–221.
- [145] M. Hofreiter, D. Serre, H.N. Poinar, M. Kuch, S. Pääbo, Ancient DNA, *Nat. Rev. Genet.* 2(5) (2001) 353- 359.
- [146] A. Hall, J. Ballantyne, Characterization of UVC-induced DNA damage in bloodstains: forensic implications, *Anal. Bioanal. Chem.* 380(1) (2004) 72–83.
- [147] S. Turrina, R. Atzei, G. Filippini, D. De Leo, STR typing of archival Bouin’s fluid-fixed paraffin- embedded tissue using new sensitive redesigned primers for three STR loci (CSF1P0, D8S1179 and D13S317), *J. Forensic Leg. Med.* 15(1) (2008) 27–31.
- [148] M. Djuric, T. Varljen, A. Stanojevic, O. Stojkovic, DNA typing from handled items, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 1* (2008) 411-412.
- [149] K. Bender, P.M. Schneider, Validation and casework testing of the BioPlex-11 for STR typing of telogen hair roots, *Forensic Sci. Int.* 161(1) (2006) 52-59.
- [150] F.X. Ricaut, C. Keyser-Tracqui, E. Crubézy, B. Ludes, STR-genotyping from human medieval tooth and bone samples, *Forensic Sci. Int.* 151(1) (2005) 31-35.
- [151] W. Parson, A. Brandstätter, A. Alonso, N. Brandt, B. Brinkmann, A. Carracedo, et al. The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives, *Forensic Sci. Int.* 139(2-3)(2004) 215-226.
- [152] J.M. Butler, *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, New York, 2005.
- [153] A. Alonso, P. Martín, C. Albarrán, P. García, D. Primorac, O. García, et al. Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies, *Croat. Med. J.* 44(3) (2003) 273–280.
- [154] T.R. Moretti, A.L. Baumstark, D.A. Defenbaugh, K.M. Keys, J.B. Smerick, B. Budowle, Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples, *J. Forensic Sci.* 46(3) (2001) 647- 660.
- [155] T.R. Moretti, A.L. Baumstark, D.A. Defenbaugh, K.M. Keys, A.L. Brown, B. Budowle, Validation of STR typing by capillary electrophoresis, *J. Forensic Sci.* 46(3) (2001) 661-676.
- [156] B. Budowle, A.J. Eisenberg, A. van Daal, Validity of low copy number typing and applications to forensic science, *Croat. Med. J.* 50(3) (2009) 207-217.
- [157] R. Sparkes, C. Kimpton, S. Gilbard, P. Carne, J. Andersen, N. Oldroyd, et al. The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (ii), Artefacts, casework studies and success rates, *Int. J. Legal Med.* 109(4) (1996) 195–204.
- [158] B. Budowle, D.L. Hobson, J.B. Smerick, J.A. Smith, Low copy number –consideration and caution, *Proceedings from the Twelfth International Symposium on Human Identification*. Madison, Wisconsin: Promega Corporation (2001) 1-9.

- [159] P. Taberlet, S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR, *Nucleic Acids Res.* 24(16) (1996) 3189–3194.
- [160] M. Takahashi, Y. Kato, H. Mukoyama, H. Kanaya, S. Kamiyama, 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 Sci. Int.* 90(1–2) (1997) 1–9.
- [161] M.D. Coble, J.M. Butler, Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA, *J. Forensic Sci.* 50(1) (2005) 43–53
- [162] J.P. Whitaker, E.A. Cotton, P. Gill, 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) (2001) 215–223.
- [163] D.T. Chung, J. Drábek, K.L. Opel, J.M. Butler, B.R. McCord, A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets, *J. Forensic Sci.* 49(4) (2004) 733–740.
- [164] R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science.* 239(4839) (1988) 487–491.
- [165] S. Pääbo, D.M. Irwin, A.C. Wilson, DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification, *J. Biol. Chem.* 265(8) (1990) 4718–4721.
- [166] I.G. Wilson, Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10) (1997) 3741–3751.
- [167] E.K. Hanson, J. Ballantyne, Whole genome amplification strategy for forensic genetic analysis using single or few cell equivalents of genomic DNA, *Anal. Biochem.* 346(2) (2005) 246–257.
- [168] B. Leclair, J.B. Sgueglia, P.C. Wojtowicz, A.C. Juston, C.J. Frégeau, R.M. Fournay, STR DNA typing: increased sensitivity and efficient sample consumption using reduced PCR reaction volumes, *J. Forensic Sci.* 48(5) (2003) 1001–1013.
- [169] P. Gill, J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, J. Buckleton, An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA, *Forensic Sci. Int.* 112(1) (2000) 17–40.
- [170] P.J. Smith, J. Ballantyne, Simplified low-copy-number DNA analysis by post-PCR purification, *J. Forensic Sci.* 52(4) (2007) 820–829.
- [171] C.M. Strom, S. Rechitsky, Use of nested PCR to identify charred human remains and minute amounts of blood, *J. Forensic Sci.* 43(3) (1998) 696–700.
- [172] B. Sobrino, M. Brión, A. Carracedo, SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies, *Forensic Sci. Int.* 154(2-3) (2005) 181–194.
- [173] L.A. Dixon, A.E. Dobbins, H.K. Pulker, J.M. Butler, P.M. Vallone, M.D. Coble, et al. Analysis of artificially degraded DNA using STRs and SNPs—results of a collaborative European (EDNAP) exercise, *Forensic Sci. Int.* 164(1) (2006) 33–44.
- [174] J.M. Butler, Y. Shen, B.R. McCord, The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, *J. Forensic Sci.* 48(5) (2003) 1054–1064.
- [175] A. Hellmann, U. Rohleder, H. Schmitter, M. Wittig, STR typing of human telogen hairs—a new approach, *Int. J. Legal Med.* 114(4-5) (2001) 269–273.
- [176] B. Budowle, SNP typing strategies, *Forensic Sci. Int. Suppl.* 146 (2004) S139–S142.
- [177] M. Brion, B. Sobrino, A. Blanco-Verea, M.V. Lareu, A. Carracedo, Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations, *Int. J. Legal Med.* 119(1) (2005) 10–15.
- [178] A. Freire-Aradas, M. Fondevila, A.K. Kriegel, C. Phillips, P. Gill, L. Prieto, et al. A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6(3) (2012) 341–349.
- [179] E. Musgrave-Brown, D. Ballard, K. Balogh, K. Bender, B. Berger, M. Bogus, et al. Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2) (2007) 186–190.

- [180] J.J. Sanchez, C. Phillips, C. Børsting, K. Balogh, M. Bogus, M. Fondevila, et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification, *Electrophoresis* 27(9) (2006) 1713-1724.
- [181] P. Gill, L. Fereday, N. Morling, P.M. Schneider, New multiplexes for Europe-amendments and clarification of strategic development, *Forensic Sci. Int.* 163(1-2) (2006) 155-157.
- [182] P. Gill, L. Fereday, N. Morling, P.M. Schneider, The evolution of DNA databases—recommendations for new European STR loci, *Forensic Sci. Int.* 156(2-3) (2006) 242-244.
- [183] W. Goodwin, D. Ballard, K. Simpson, C. Thacker, D. S. Court, J. Gow, Case study: paternity testing—when 21 loci are not enough, *Int. Congr. Ser. (Progr. Forensic Genet.)*1261 (2004) 460-462.
- [184] P.M. Schneider, K. Bender, W.R. Mayr, W. Parson, B. Hoste, R. Decorte, et al. STR analysis of artificially degraded DNA—results of a collaborative European exercise, *Forensic Sci. Int.* 139(2-3) (2004) 123–134.
- [185] L.A. Dixon, C.M. Murray, E.J. Archer, A.E. Dobbins, P. Koumi, P.Gill, Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes, *Forensic Sci. Int.* 154(1) (2005) 62-77.
- [186] B. Budowle, F.R. Bieber, A.J. Eisenberg, Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification, *Leg. Med. (Tokyo)* 7(4) (2005) 230-243.
- [187] P. Gill, D.J. Werrett, B. Budowle, R. Guerrieri, An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases—joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM), *Sci. Justice* 44(1) (2004) 51–53.
- [188] J. Drábek, D.T. Chung, J.M. Butler, B.R. McCord, Concordance study between Miniplex assays and a commercial STR typing kit, *J. Forensic Sci.* 49(4) (2004) 859-860.
- [189] C. Hill, M.D. Coble, J.M. Butler, Development of 27 new MiniSTR loci for improved analysis of degraded DNA Samples, Poster B105 at AAFS Congress, Seattle (2006)
- [190] J.M. Butler, Constructing STR multiplex assays, *Methods Mol. Biol.* 297 (2005) 53-66.
- [191] J.W. Schumm, R.S. Wingrove, E.K. Douglas, Robust STR multiplexes for challenging casework samples, *Int. Congr. Ser. (Progr. Forensic Genet.)*1261 (2004) 547-549.
- [192] P. Gill, E. d’Aloja, B. Dupuy, B. Eriksen, M. Jangbland, V. Johnsson, et al. Report of the European DNA Profiling Group (EDNAP)—an investigation of the hypervariable STR loci ACTBP2, APOAI1 and D11S554 and the compound loci D12S391 and D1S1656, *Forensic Sci. Int.* 98(3) (1998) 193-200.
- [193] P. Wiegand, R. Klein, G. Braunschweiger, C. Hohoff, B. Brinkmann, Short amplicon STR multiplex for stain typing, *Int. J. Legal Med.* 120(3) (2006) 160-164.
- [194] K. Müller, R. Klein, E. Miltner, P. Wiegand, Q8—A short amplicon multiplex including the German DNA database systems, *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2) (2007) 205–207.
- [195] J.J. Mulero, C.W. Chang, R.E. Lagacé, D.Y. Wang, J.L. Bas, T.P. McMahon, et al. Development and validation of the AmpFISTR MiniFiler PCR Amplification Kit: a MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA, *J. Forensic Sci.* 53(4) (2008) 838-852.
- [196] V.C. Tucker, A.J. Hopwood, C.J. Sprecher, R.S. McLaren, D.R. Rabbach, M.G. Ensenberger, et al. Developmental validation of the PowerPlex® ESX 16 and PowerPlex® ESX 17 Systems, *Forensic Sci. Int. Genet.* 6(1) (2012) 124-131.
- [197] A. Odriozola, J.M. Aznar, D. Celorrio, M.L. Bravo, J.J. Builes, J.F. Val-Bernal, et al. Development and validation of I-DNA1: a 15-Loci multiplex system for identity testing, *Int. J. Legal Med.* 125(5) (2011) 685-694.
- [198] A. Odriozola, J.M. Aznar, D. Celorrio, M.L. Bravo, J.J. Builes, M. Martinez de Pancorbo, Development and validation for identity testing of I-DNADuo, a combination of I-DNA1 and a new multiplex system, I-DNA2, *Int. J. Legal Med.* 126(1) (2012) 167-172.

- [199] H. Asamura, H. Sakai, K. Kobayashi, M. Ota, H. Fukushima, MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis, *Int. J. Legal Med.* 120(3) (2006) 174-181.
- [200] T.M. Diegoli, M.D. Coble, Development and characterization of two mini-X chromosomal short tandem repeat multiplexes, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5(5) (2011) 415-421.
- [201] [www.guiadecantabria.com](http://www.guiadecantabria.com)
- [202] M.T. Zarrabeitia, J.A. Riancho, M.V. Lareu, F. Leyva-Cobián, A. Carracedo, Significance of micro-geographical population structure in forensic cases: a bayesian exploration, *Int. J. Legal Med.* 117(5) (2003) 302–305.
- [203] M.T. Zarrabeitia, J.A. Riancho, F. Leyva-Cobián, P. Sánchez-Diz, A. Carracedo, Differences in Y-chromosome haplotype frequencies at the microgeographical level, *Int. Congr. Ser. (Progr. Forensic Genet.* 9)1239 (2003) 409–412.
- [204] S. Hering, H. Rodig, C. Augustin, J. Edlmann, M. Heidel, J. Dressler, et al. DXS10079, DXS10074 and DXS10075: new alleles and SNP occurrence, *EXCLI. J.* 6 (2007) 177-182.
- [205] Revised Validation Guidelines- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SGWDAM) *Forensic Sci. Commun.* 6(3) (2004).
- [206] B. Budowle, A.J. Onorato, T.F. Callaghan, A. Della Manna, A.M. Gross, R.A. Guerrieri, et al. Mixture interpretation: defining the relevant features for guidelines for the assessment of mixed DNA profiles in forensic casework, *J. Forensic Sci.* 54(4) (2009) 810-821.
- [207] P.O. Lewis, D. Zaykin, Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html> (2001).
- [208] P. Casares, A corrected Haldane's map function to calculate genetic distances from recombination data, *Genetica.* 129(3) (2007) 333-338.
- [209] D.Y. Wang, C.W. Chang, R.E. Lagacé, N.J. Oldroyd, L.K. Hennessy, Development and validation of the AmpF $\ell$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>®</sup> Direct PCR Amplification Kit: a multiplex assay for the direct amplification of single-source samples, *J. Forensic Sci.* 56(4) (2011) 835-845.
- [210] M. Castañeda, V. Mijares, J.A. Riancho, M.T. Zarrabeitia, Haplotypic blocks of X-linked STRs for forensic cases: study of recombination and mutation rates, *J. Forensic Sci.* 57 (1) (2012) 192-195.
- [211] J. Schlenk, S. Seidl, G. Braunschweiger, P. Betz, T. Lederer, Development of a 13-locus PCR multiplex system for paternity testing, *Int. J. Legal Med.* 118(1) (2004) 55–61.
- [212] B.E. Krenke, A. Tereba, S.J. Anderson, E. Buel, S. Culhane, C.J. Finis, et al. Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system, *J. Forensic Sci.* 47(4) (2002) 773-785.
- [213] P.J. Collins, L.K. Hennessy, C.S. Leibelt, R.K. Roby, D.J. Reeder, P.A. Foxall, Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpF $\ell$ STR Identifiler PCR Amplification Kit, *J. Forensic Sci.* 49(6) (2004) 1265-1277.
- [214] M. J. LaFountain, M.B. Schwartz, P.A. Svete, M. A. Walkinshaw, E. Buel, TWGDAM validation of the AmpF $\ell$ STR Profiler Plus and AmpF $\ell$ STR COfiler STR multiplex systems using capillary electrophoresis, *J. Forensic Sci.* 46(5) (2001) 1191-1198.
- [215] S. Aditya, C.N. Bhattacharyya, K. Chaudhuri, Generating STR profile from "Touch DNA", *J. Forensic Leg. Med.* 18 (7) (2011) 295- 298.
- [216] F. Pitterl, K. Schmidt, G. Huber, B. Zimmermann, R. Delpont, S. Amory, et al. Increasing the discrimination power of forensic STR testing by employing high-performance mass spectrometry, as illustrated in indigenous South African and Central Asian populations, *Int. J. Legal Med.* 124 (6) (2010) 551-558.
- [217] S.S. Santos-Lopes, R.W. Pereira, I.J. Wilson, S.D. Pena, A worldwide phylogeography for the human X chromosome, *PLoS ONE* 2 (2007) e557.

- [218] V. Yotova, J.F. Lefebvre, O. Kohany, et al. Tracing genetic history of modern humans using X-chromosome lineages, *Hum. Genet.* 122 (2007) 431-443.

## **VIII. ANEXO**

**Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis**

## **VIII. ANEXO: Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis**

### **Artículo I**

M. Castañeda, A. Odriozola, V. Mijares, M.T. Zarrabeitia, Study of two X-linked microsatellite blocks: Allelic frequencies in mixed and isolated population groups, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 3 (2011) e248–e250.

### **Artículo II**

M. Castañeda, V. Mijares, J.A. Riancho, M.T. Zarrabeitia, Haplotypic blocks of X-linked STRs for forensic cases: study of recombination and mutation rates, *J. Forensic Sci.* 57 (1) (2012) 192-195.

### **Artículo III**

M. Castañeda, V. Mijares, J. Gómez, M.T. Zarrabeitia, Development and validation of a multiplex reaction analyzing eight miniSTRs of the X chromosome for identity and kinship testing with degraded DNA, *Int. J. Legal Med.* (2012) [Epub ahead of print].

**P201200729** - “Método para la obtención del perfil genético de un individuo mediante el análisis de loci del cromosoma X”.





## Study of two X-linked microsatellite blocks: Allelic frequencies in mixed and isolated population groups

M. Castañeda, A. Odriozola, V. Mijares, M.T. Zarrabeitia \*

Unit of Legal Medicine, University of Cantabria, Santander, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 August 2011

Accepted 1 September 2011

#### Keywords:

X  
STR  
Frequencies  
Blocks  
Isolated

### ABSTRACT

Two X-linked microsatellite blocks were studied in Cantabria, a small region in Northern Spain. DNA samples were obtained from two different areas: a coastal area, with a well mixed population, and a mountainous area, with a population that has limited communications for social interaction with people from other communities. Statically significant differences were found in allelic frequency distribution between the populations analyzed, revealing the importance of a proper interpretation when kinship analysis and forensic cases include individuals from relatively isolated populations whose frequencies can differ from the general population data.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

X-chromosome microsatellites have been described in recent years as a very useful tool for solving deficiency kinship cases in the absence of the alleged father, and when the child is a female. It can lead to paternity exclusion if two sisters or half sisters are available because fathers transmit the same X-chromosome to all daughters [1].

Differences in Y-chromosome haplotype frequencies between the regions studied have been previously published [2], therefore, the purpose of this study was to compare allelic frequencies of 6 X-linked microsatellites grouped into two haplotypic blocks (DXS10079/DXS10074/DXS10075) [3], and (DXS6809/DXS6801/DXS6789) [4], to corroborate the existence of a population substructure within certain areas where the difficulties to have contact with nearby communities still remain. This study is important for a correct interpretation in kinship analysis and forensic cases that involves people from relatively isolated populations.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Population

We studied female subjects living in Cantabria, a small region in Northern Spain with two differentiated areas, a coastal and a mountainous region. The coastal area has a mixed population, is

well-communicated and is densely populated. The mountainous area forms deep valleys with difficult communications. The Pas valley is one the most delimited physically by the intervening large mountains relief, which used to difficult the social interaction with people from other valleys. The study group consisted of 172 females living in the coastal area (mixed population,  $n = 142$ ) or in the Pas valley (isolated population,  $n = 30$ ) (Fig. 1).

### 2.2. DNA analysis

The following 6 X-linked microsatellites grouped into two haplotypic blocks were studied: DXS10079, DXS10074, DXS10075, DXS6801, DXS6809 and DXS6789. Genomic DNA was obtained from buccal swabs by using a GE Healthcare commercial method. Microsatellites were amplified in a single tube reaction by PCR using 5'-fluorochrome-labelled primers. The size of amplified products was determined in an ABI 310 DNA capillary electrophoresis sequencer and was analyzed by the Southern method using the GeneMapper ID v3.2 software (Fig. 2). Allelic frequency distributions were tested by a Monte Carlo extension of Fisher's exact test using SPSS software. The coancestry coefficient was estimated by AMOVA analysis carried out with Arlequin software.

## 3. Results

There were significant between population differences in the allelic frequency distributions of loci DXS10079 ( $p = 0.002$ ; Fig. 3), DXS10074 ( $p = 0.030$ ) and DXS6809 ( $p = 0.025$ ). However, no statically significant differences existed in DXS10075, DXS6801, and DXS6789.

\* Corresponding author.

E-mail address: [zarrabet@unican.es](mailto:zarrabet@unican.es) (M.T. Zarrabeitia).

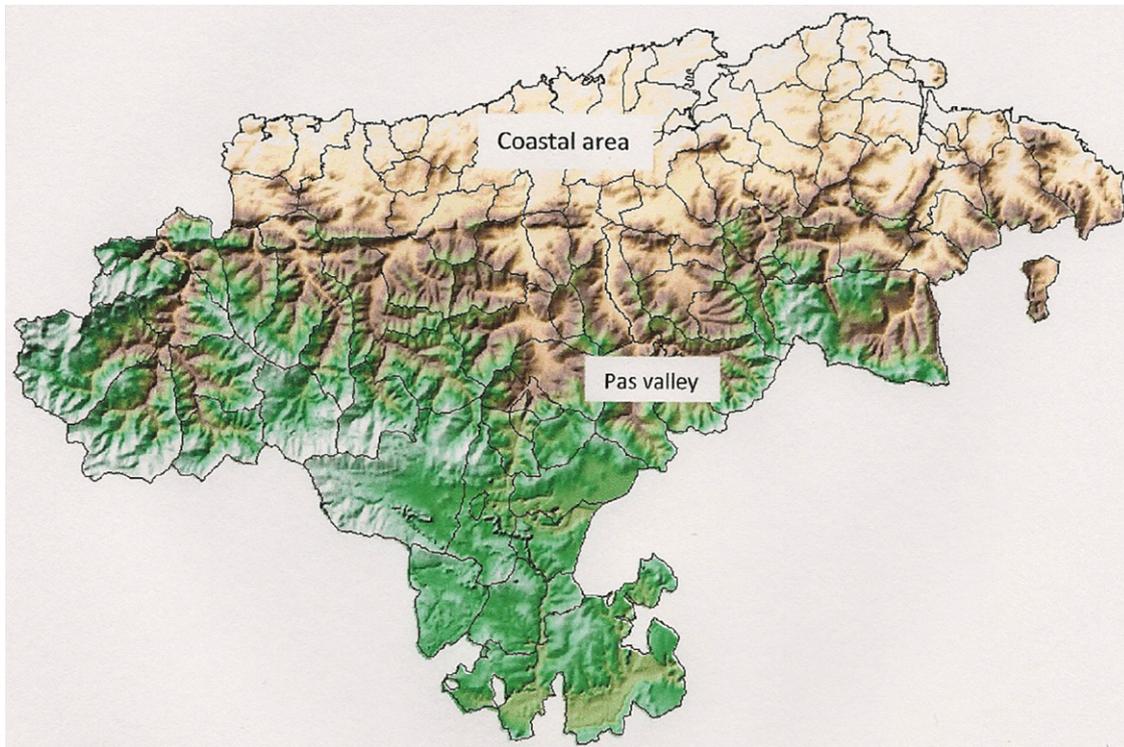


Fig. 1. Map of Cantabria showing the situation of the two areas analyzed, the Coastal area (mixed population) and the Pas valley (isolated population).

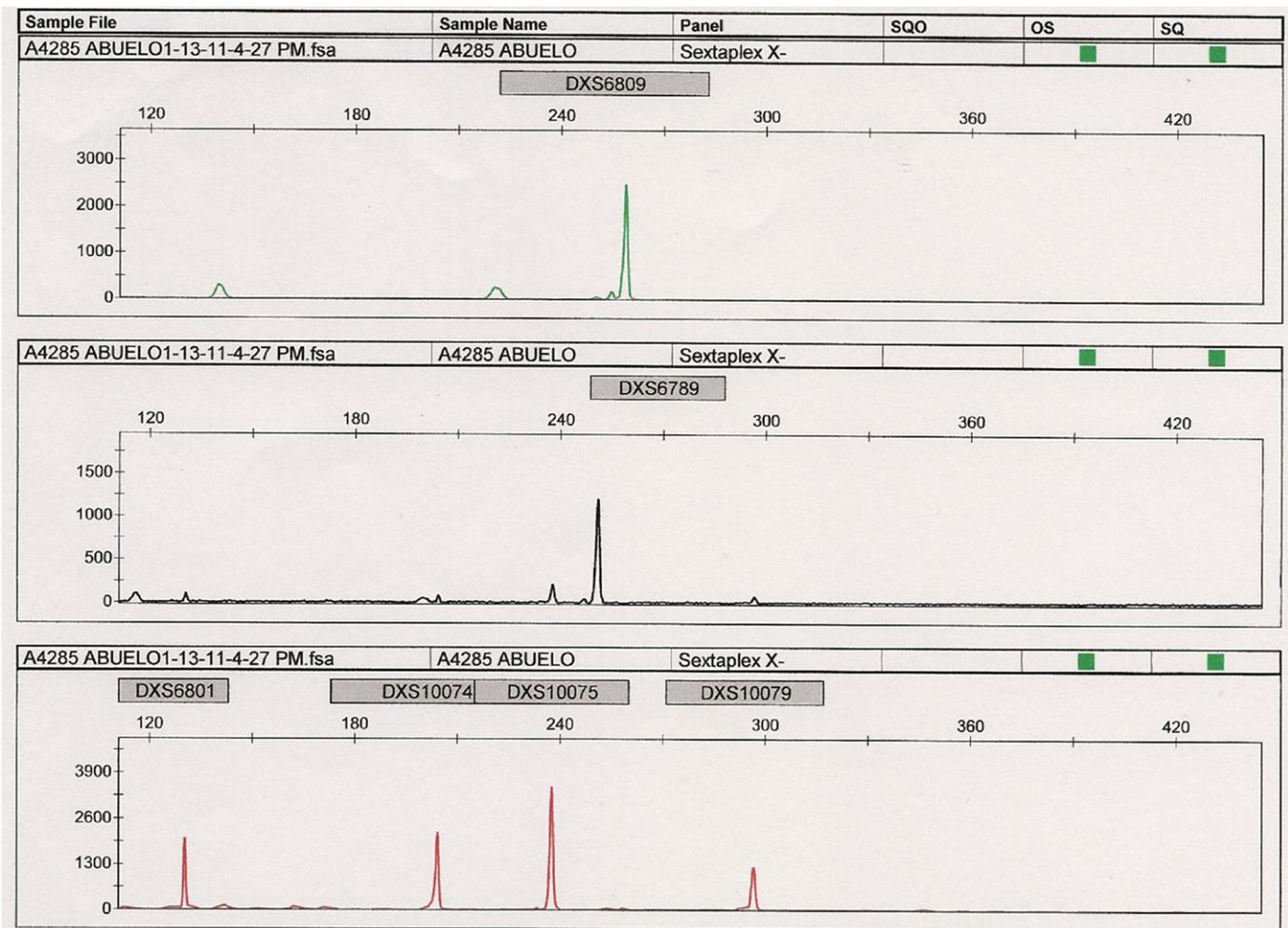


Fig. 2. Typical electropherogram of a male profile for the X-STR Sextaplex.

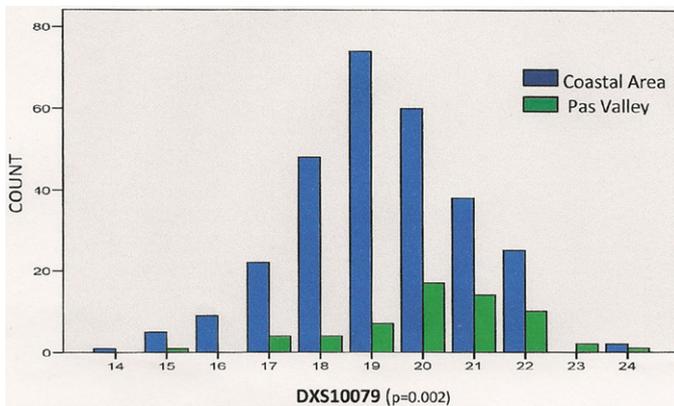


Fig. 3. Bar chart shows the allelic frequency distribution of loci DXS10079.

One allele located in the locus DXS10079 was unique in the Pas population valley (Allele 23).

Population comparisons using AMOVA analysis showed an overall  $F_{st}$  value of 0.011 (1.1%).

#### 4. Discussion

The 6 X-linked microsatellites, reported in this paper, are grouped into two haplotypic blocks (DXS10079/DXS10074/

DXS10075) and (DXS6809/DXS6801/DXS6789) and all these markers can be amplified in a single PCR reaction. In conclusion, this set of tetranucleotide X-linked STRs may be quite useful in complex kinship and forensic cases.

Although given the small sample size these results must be considered as preliminary, they suggest, as in the case of previous Y-chromosome microsatellites frequencies studies, that care should be taken to interpret X-linked markers in cases involving individuals from relatively isolated populations whose frequencies can differ from the general population data.

#### Conflict of interest

None.

#### References

- [1] R. Szibor, et al., Use of X-linked markers for forensic purposes, *Int. J. Legal Med.* 117 (2003) 67–74.
- [2] M.T. Zarrabeitia, et al., Differences in Y-chromosome haplotype frequencies at the microgeographical level, *Int. Congr. Ser.* 40 (2003) 9–412.
- [3] S. Hering, et al., DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases, *Int. J. Legal Med.* 120 (2006) 337–345.
- [4] R. Szibor, et al., Haplotyping of STR cluster DXS6801–DXS6809–DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing, *Int. J. Legal Med.* 119 (2005) 363–369.

**TECHNICAL NOTE****CRIMINALISTICS**

María Castañeda,<sup>1</sup> M.S.; Verónica Mijares,<sup>1</sup> José A. Riancho,<sup>2</sup> M.D., Ph.D.;  
and María T. Zarrabeitia,<sup>1</sup> M.D., Ph.D.

## Haplotypic Blocks of X-linked STRs for Forensic Cases: Study of Recombination and Mutation Rates\*

**ABSTRACT:** In complex kinship cases, markers situated in haplotypic blocks may provide additional clues to other unlinked markers. We have established a protocol to amplify six X-chromosome microsatellites, located in two haplotype blocks, using PCR with fluorochrome-labeled primers and capillary electrophoresis. The segregation stability was explored in 92 unrelated families with individuals from three generations. Sixty-one different haplotypes were found in the DXS10079-DXS10074-DXS10075 block in the grandfathers and 96 in the mothers, with estimated haplotype diversities of 0.9828 and 0.9842, respectively. Fifty and 73 different haplotypes were found in the DXS6801-DXS6809-DXS6789 block in the grandfathers and the mothers, with estimated haplotype diversities of 0.9711 and 0.9742, respectively. We observed 10 between-cluster and one within-cluster recombinations in 99 female meioses. The overall per-locus mutation rate was 0.0034. This protocol allows for the characterization of the alleles of two sets of linked markers of the X-chromosome that can be useful in complex forensic cases.

**KEYWORDS:** forensic science, DNA typing, short tandem repeat, X-chromosome, haplotypes, recombination, mutation, kinship

Microsatellites of the X-chromosome have emerged in recent years as a useful tool in kinship analysis and other forensic cases (1,2). As the fathers transmit the same X-chromosome to all their daughters, these markers are particularly useful in deficiency cases, when the child is female and the alleged father is unavailable for testing. For example, it can lead to paternity exclusion if two sisters or half sisters are available because female descendants share the same paternal allele (3–6). Several multiplex protocols have been published to study sets of markers distributed along the chromosome (7,8). In theory, unlinked markers are preferable because the power of discrimination (PD) is usually higher when independent loci are considered. However, in certain complex cases it is more useful to have clusters of linked markers, as haplotype blocks may allow for the reconstruction of the chromosomal structure of the ancestors (9–12). Therefore, the aims of this study were to establish a protocol to amplify six short tandem repeats (STRs), which have been reported to lie within two independent clusters (13,14) and to analyze the mutation rates and the within- and between-cluster recombination rates by studying three-generation families.

### Materials and Methods

#### Individuals

DNA samples were extracted from unrelated volunteer students and their families. They were Caucasians of Spanish ancestry living

<sup>1</sup>Unit of Legal Medicine, University of Cantabria-IFIMAV, Av Herrera Oria s/n, Santander 39011, Spain.

<sup>2</sup>Department of Medicine, University of Cantabria-IFIMAV, Av Herrera Oria s/n, Santander 39011, Spain.

\*Supported in part by a grant from IFIMAV (API 11/26).

Received 30 May 2010; and in revised form 24 Nov. 2010; accepted 26 Nov. 2010.

in Santander, a 200,000-habitant city in Northern Spain. Ninety-two families were included: 85 with a son, five with two sons, one with three sons, and one with four sons. The purposes of the study were explained to potential study subjects. After they gave verbal informed consent, buccal swabs were obtained and labeled by a non-identifiable family-generation code to preserve privacy.

#### DNA Extraction and Amplification

Genomic DNA was obtained from buccal swabs using a commercial method (Prep Mini Spin kit; GE Healthcare Spain, Barcelona, Spain). The amount and purity of the DNA was checked by light absorbance at 260/280 nm using a Nanodrop-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). The sequences of the primers used to amplify DNA by polymerase chain reaction (PCR) are shown in Table 1. The forward primers were 5'-labeled with fluorochromes (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR amplification was carried out in a Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems), by mixing 5  $\mu$ L of Multiplex PCR master mix (Qiagen, Hilden, Germany), 1  $\mu$ L (10 pmol) of each primer, and 5 ng of genomic DNA in an 18  $\mu$ L PCR final volume. Cycling conditions consisted of an initial denaturation step for 15 min at 95°C, followed by 10 cycles with denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 60°C for 90 sec, and an extension at 72°C for 60 sec. Then 20 cycles at 94°C for 30 sec, 58°C for 90 sec, and 72°C for 60 sec, followed by a final extension at 60°C for 60 min.

#### Fragment Analysis

An aliquot of 1.5  $\mu$ L of PCR product was mixed with 24.5  $\mu$ L formamide and 0.5  $\mu$ L Gene Scan 500 Liz (Applied Biosystems) as an internal size standard. It was heated at 95°C for 5 min and

TABLE 1—Primer sequences (13,17).

Primer	Sequence	Label
DXS6801		
Forward	CATTTCTCTAACAAGTCTCC	PET
Reverse	CAGAGAGTCAGAATCAGTAG	-
DXS6809		
Forward	TCCATCTTTCTCTGAACCTTCC	VIC
Reverse	TGCTTTAGGCTGATGTGAGG	-
DXS6789		
Forward	CTTCATTATGTGCTGGGGTAAA	NED
Reverse	ACCTCGTGATCATGTAAGTTGG	-
DXS10079		
Forward	AGATTGTGCCAATGCTCTCC	PET
Reverse	GTTTGCCCTGTGTTGTAACATCCTT	-
DXS10074		
Forward	ACTTCCTACTGCCCCACCTT	PET
Reverse	GTTTCCCCTCAGAGAGCTGACACA	-
DXS10075		
Forward	AGGAGGGCCTAGACAAGTG	PET
Reverse	CAGATTATGCTTGGGCCTGT	-

quenched at 4°C for 5 min. It was injected into an ABI Prism 310 sequencer (Applied Biosystems) to separate and detect the PCR products by capillary electrophoresis with the denaturing polymer POP4 (Applied Biosystems), the electrophoresis voltage was 15 kV, and the injection time was 5 sec. Fragment size was analyzed by the Southern method (15,16) using the GENEMAPPER ID v3.2 software (Applied Biosystems). As controls, we used DNA from the immortalized cell lines K562 and 9947A. The alleles at the six loci were concordant with previous reports (13,17). Allele designation was based on PCR product size and comparison to known samples and control genotypes.

Data Analysis

Allelic frequencies were estimated by counting the female genotypes. The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested with GENALEX software (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx>). The forensic efficiency at a single-locus level was calculated with the formulae published by Desmarais (18). In particular, the PD was computed as an index of efficiency in identity cases, and the power of exclusion (PE) as an index in kinship cases. Haplotype

frequencies were computed by counting the haplotypes in the grandfathers’ and mothers’ samples, and the haplotype diversity for each block was estimated as  $1 - \sum P_i^2$ , where  $P_i$  is the individual haplotype frequency. The haplotypes in the mothers were elucidated by comparing the mother’s genotypes with the grandfather’s haplotype. The existence of recombination in the maternal meioses was analyzed by the comparison of the maternal haplotypes and the haplotypes in the sons. The genetic distance was estimated using Haldane’s Mapping Function (19). The possibility of linkage disequilibrium was estimated with GDA software (11). The mutation events were studied in both meioses (grandfather–mother and mother–son). The increase or decrease in one repeat was assumed based on the 4 bp change in the fragment size but not confirmed by sequencing. In some families, additional X-chromosome STRs (DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS7132 and DXS9902) (17,20), located outside the two blocks (Fig. 1), had to be studied to elucidate whether a mutational event or a recombination event had occurred.

Results

Sextaplex Performance

The six STRs were successfully amplified in a single reaction, as shown in Fig. 2. Allele designation proposed here is in compliance with the recommendations of the International Society for Forensic Genetics (21).

Segregation Stability

We studied six STRs in three-generation families, including a mother, at least a son and his maternal grandfather. These markers have been previously reported to be located in two clusters in the long arm of the X-chromosome (13,14) (Fig. 1). Some maternal meioses were not informative because women were homozygotes for three markers of the cluster. Therefore, the occurrence of recombination could be studied in 99 meioses. Ten between-cluster recombinations occurred, resulting in an estimated genetic distance of 11.16 cm. Two apparent within-cluster recombinations were found, but after studying additional markers, one of them was identified as a single-locus mutation. Thus, only one recombination event was found within the linked clusters. It occurred between loci DXS6801 and DXS6809 (Table 2).

Overall, four mutations were found: one in DXS10079 from grandfather to mother, one in DXS6789, and two in DXS10074 from mother to son. In two cases, the gain of one repeat unit was observed, whereas a loss of one repeat was found in the other cases. Therefore, the global mutation rate was 0.020, and the average per-locus rate was 0.0034.

Allelic Frequencies and Forensic Efficiency

The allelic frequencies (available from the authors upon request) were similar to those previously published in other populations (13,14). Alleles in female samples did not reveal deviations from HWE (Table 3). DXS10074 and DXS10079 showed the highest forensic efficiency, with a PD of 0.9580 and 0.9467 in women, and 0.8439 and 0.8247 in men, with a PE in trio cases of 0.8263 and 0.8021, respectively, and with a PE in motherless cases of 0.7184 and 0.6856, respectively (Table 3). The pair-wise analysis of linkage disequilibrium revealed only significant *p*-values for locus DXS10074-DXS10075 (*p* = 0.0037) and DXS10079-DXS6801 (*p* = 0.0310). The haplotype list is available from the authors

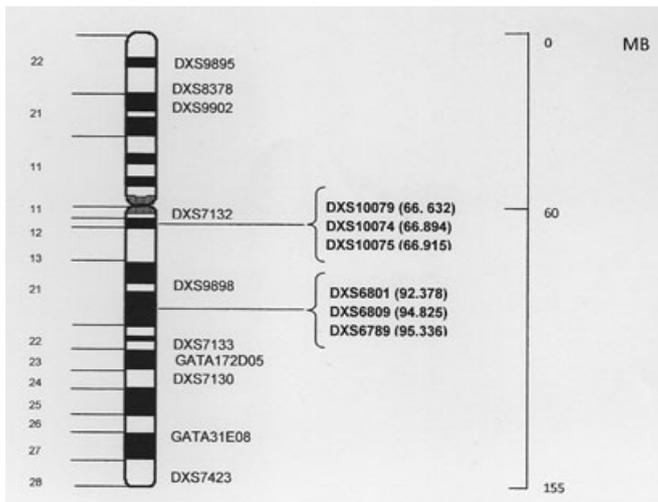


FIG. 1—Location of the two linked marker groups on the X-chromosome. Other common markers and the cytogenetic bands are also shown. The numbers in parentheses represent the chromosomal position in kilobases (based on references [2] and [3]).

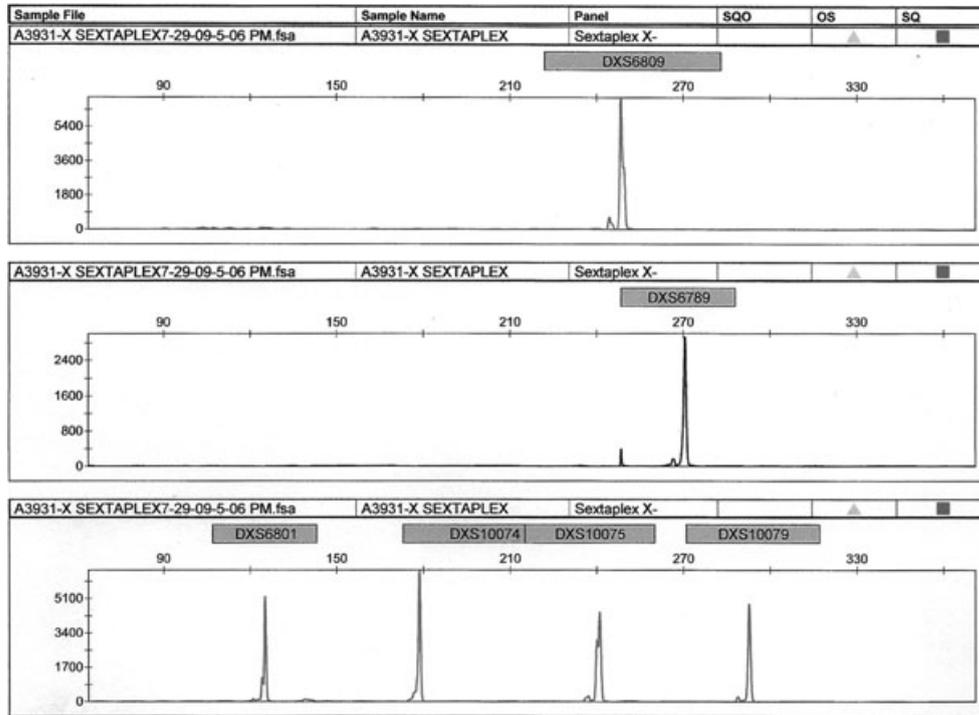


FIG. 2—Typical electropherogram of the six markers in a male individual, as shown in the ABI 310 sequencer output. The x-axis represents the fragment size in pairs of bases and the y-axis represents the height of peaks in relative fluorescent units. The small peaks in front of the main peaks represent stutter band peaks.

TABLE 2—Example of a family trio that shows a recombination within the linked cluster.

	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS6801	DXS6809	DXS6789
Grandfather	<u>19</u>	<u>15</u>	<u>17</u>	<u>12</u>	<u>34</u>	<u>20</u>
Mother	<u>19</u> , <u>21</u>	8, <u>15</u>	<u>17</u>	8, <u>12</u>	31, <u>34</u>	<u>20</u> , <u>21</u>
Grandson	21	<u>8</u>	<u>17</u>	<u>8</u>	<u>34</u>	<u>20</u>

Grandfather's alleles are underlined.

TABLE 3—Forensic efficiency parameters.

	DXS10079	DXS10074	DXS10075	DXS6801	DXS6809	DXS6789
PD-female	0.9467	0.9580	0.8617	0.7791	0.9324	0.8790
PD-male	0.8247	0.8439	0.6963	0.5945	0.7999	0.7234
PE-trio	0.8021	0.8263	0.6503	0.5380	0.7723	0.6790
PE-mo	0.6856	0.7184	0.5058	0.3914	0.5386	0.6480
p-value	0.5976	0.8767	0.9828	0.4003	0.6590	0.9086
Het male		0.9828			0.9711	
Het female		0.9842			0.9742	

PD-female, single-locus power of discrimination in female cases; PD-male, single-locus power of discrimination in male cases; PE-trio, single-locus power of exclusion in trio cases; PE-mo, single-locus power of exclusion in motherless cases; p-value, p of the Hardy-Weinberg equilibrium test; Het male, Haplotype heterozygosity in each block (in grandfathers); Het female, Haplotype heterozygosity in each block (in mothers).

upon request. Considering the two blocks independently, 61 different haplotypes were found in the DXS10079-DXS10074-DXS10075 block in the grandfathers and 50 in the DXS6801-DXS6809-DXS6789 block. There were 39 unique haplotypes in the first block and 32 in the second one, with a haplotype diversity of 0.9828 and 0.9711, respectively. Similar results were found in the mothers: 96 haplotypes were found in the first block and 73 in the second block, with estimated haplotype diversities of 0.9842 and 0.9742, respectively.

### Discussion

In this study, we found single-locus allelic frequencies similar to those previously reported for these markers in other Caucasian populations (13,14). The study of three-generation families allowed us to scrutinize the stability of the two clusters of linked microsatellites across the meioses, as well as the mutation rates.

We found no within-cluster recombination events at the Xq12 region, which was not unexpected, as those markers (DXS10079,

DXS10074, and DXS10075) are located within a 280 Kb region (13). On the other hand, we found a single recombination event within the three-marker block located in a 3 Mb region at Xq21. Therefore, our data suggest that, from a practical point of view, either of the two clusters can be considered to be inherited as a single haplotypic block, which may be very useful in some deficiency cases. Specifically, the analysis of these markers can help to solve paternity cases if the alleged father is unavailable and two sisters are under analysis because all daughters share their paternal X-chromosome haplotype. The protocol we used provides a convenient method to genotype those markers in a single reaction. It is worth emphasizing that these six markers are tetranucleotide repeats located outside the known coding regions, without known functional consequences, providing only identity information. Thus, they may represent an advantage over trinucleotide repeats, which are more likely to show interpretation difficulties related to stutter peaks. Likewise, they are free of the ethical concerns raised by the markers located in coding regions of the genome.

We found four mutations, all consisting in one-repeat difference, with an average per-locus mutation rate of 0.0034, which is similar to previous reports of STR mutations (13,14,22).

In conclusion, our study suggests that DXS10079-DXS10074-DXS10075 and DXS6801-DXS6809-DXS6789 provide stable haplotype blocks that can help to solve complex kinship cases.

## References

- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 2003;117:67–74.
- Szibor R. X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1:93–9.
- Zarrabeitia MT, Alonso A, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Martin JC, Escudero M, et al. Study of six X-linked tetranucleotide microsatellites: population data from five Spanish regions. *Int J Legal Med* 2006;120:147–50.
- Turrina S, Atzei R, Filippini G, De Leo D. Development and forensic validation of a new multiplex PCR assay with 12 X-chromosomal short tandem repeats. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1:201–4.
- Aquino J, Peixe C, Silva D, Tavares C, De Carvalho EF. A X-chromosome STR hexaplex as a powerful tool in deficiency paternity cases. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 2009;2:45–6.
- Silva DA, Manta FSN, Desidério M, Tavares C, De Carvalho EF. Paternity testing involving human remains identification and putative half sister: usefulness of an X-hexaplex STR markers. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* 2009;2:230–1.
- Zarrabeitia MT, Amigo T, Sañudo C, Zarrabeitia A, Gonzalez-Lamuno D, Riancho JA. A new pentaplex system to study short tandem repeat markers of forensic interest on X chromosome. *Forensic Sci Int* 2002;129:85–9.
- Becker D, Rodig H, Augustin C, Edelmann J, Gotz F, Hering S, et al. Population genetic evaluation of eight X-chromosomal short tandem repeat loci using Mentype Argus X-8 PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet* 2008;2:69–74.
- Edelmann J, Hering S, Augustin C, Kalis S, Szibor R. Validation of six closely linked STRs located in the X centromero region. *Int J Legal Med* 2010;124:83–7.
- Hering S, Augustin C, Edelmann J, Heidel M, Dreßler J, Szibor R. A cluster of six closely linked STR-markers: recombination analysis in a 3.6-Mb region at Xq 12-13.1. *Int Congr Series* 2006;1288:289–91.
- Tillmar AO, Mostad P, Egeland T, Lindblom B, Holmlund G, Montelius K. Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers. *Forensic Sci Int Genet* 2008;3:37–41.
- Rodig H, Kloep F, Weiaßbach L, Augustin C, Edelmann J, Hering S, et al. Evaluation of seven X-chromosomal short tandem repeat loci located within the Xq26 region. *Forensic Sci Int Genet* 2010;4:194–9.
- Hering S, Augustin C, Edelmann J, Heidel M, Dressler J, Rodig H, et al. DXS10079, DXS10074 and DXS10075 are STRs located within a 280-kb region of Xq12 and provide stable haplotypes useful for complex kinship cases. *Int J Legal Med* 2006;120:337–45.
- Szibor R, Hering S, Kuhlisch E, Plate I, Demberger S, Krawczak M, et al. Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int J Legal Med* 2005;119:363–9.
- Hartzell B, Graham K, Mc Cord B. Response of short tandem repeat systems to temperature and sizing methods. *Forensic Sci Int* 2003;133:228–34.
- Sguelgia JB, Geiger S, Davis J. Precision studies using the ABI Prism 3100 genetic analyzer for forensic DNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 2003;376:1247–54.
- Gusmão L, Sánchez-Diz P, Alves C, Gomes I, Zarrabeitia MT, Abovich M, et al. A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR Decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int J Legal Med* 2009;123:227–34.
- Desmarais D, Zhong Y, Chakraborty R, Perreault C, Busque L. Development of a highly polymorphic STR marker for identify testing purposes at the human androgen receptor gene (HUMARA). *J Forensic Sci* 1998;43:1046–9.
- Casares P. A corrected Haldane's map functions to calculate genetic distances from recombination data. *Genetica* 2007;129:333–8.
- Zarrabeitia MT, Pinheiro F, Martinez De Pancorbo M, Cainé L, Cardoso S, Gusmão L, et al. Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. *Forensic Sci Int Genet* 2009;3:63–6.
- Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, et al. DNA commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat system. *Int J Legal Med* 1997;110:175–6.
- Qiu-ling L, De-jian L, Xiang-lin W, Hong-yu S, Xin-yao W, Hui-ling L. Development of a five ChX STRs loci typing system. *Int J Legal Med* 2008;122:261–5.

Additional information reprint requests:

María T. Zarrabeitia, M.D., Ph.D.

Unit of Legal Medicine

University of Cantabria

Av Herrera Oria s/n

39011 Santander

Cantabria

Spain

E-mail: zarrabet@unican.es

*Development and validation of a multiplex reaction analyzing eight miniSTRs of the X chromosome for identity and kinship testing with degraded DNA*

Castañeda M, Odriozola A, Gómez J, Zarrabeitia MT

Int J Legal Med. 2013 Jul;127(4):735-9. DOI: [10.1007/s00414-012-0795-2](https://doi.org/10.1007/s00414-012-0795-2).

