

MEMÒRIA DEL TREBALL DE FI DE MÀSTER

Short Tandem Repeats en la investigació biològica de la paternitat. Estudi d'un cas de paternitat per gestació subrogada

Marta Tell Sànchez

Màster en Genètica, Química i Física Forense



Nom del Tutor: Rubén García

Nom del Tutor de la URV: Raúl Beltrán

Centre on s'ha realitzat el treball: Neodiagnostica SL

ABSTRACT

Per a l'estudi de paternitat, l'anàlisi de marcadors genètics s'ha convertit en una eina molt important i àmpliament reconeguda. Per a la realització d'aquesta prova, s'estudien diferents regions del genoma humà que posseeixen una elevada variabilitat entre la població: els STRs (Short Tandem Repeats). Aquestes seqüències tenen la característica que estan formades per una seqüència consens d'entre 2 a 5 parells de bases que es van repetint X vegades a través del cromosoma on es localitzen. A més a més, són seqüències de DNA no codificant, és a dir, no codifiquen per a cap proteïna. Aquest nombre de repeticions és molt variable entre individus i és on recau la diferenciació d'aquests.

A partir de l'estudi d'un conjunt de STRs s'obté els perfils genètics dels individus involucrats en una prova de paternitat (normalment presumpte pare i els corresponents fills/es) i així poder excloure o incloure aquest presumpte pare a una paternitat biològica lligada a una valoració estadística.

For the study of a paternity between an alleged father and his progenitor, the paternity testing it's a very useful tool and widely recognized. To carry out this test, some specifically regions of the genome are analysed: STRs. These sequences are formed by a consensual sequence which is being repeated X times in the chromosome that is located. Furthermore, they belong to the no-coding DNA, translated to a protein. The number of repetitions is very variable between individuals and it's where the importance of the differentiation of individuals is.

Studying a STR system, a genetic profile of all the involved individuals is going to be obtained (usually alleged father and sons or daughters) and then include or exclude this alleged father of a biological paternity with a statistical valuation.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	5
· Què és el DNA?	5
· Estructura del DNA	5
· Tipus de DNA	6
· Polimorfismes del DNA: Short Tandem Repeats (STRs)	8
· Mutació dels STRs	9
2. ETAPES DE LA PROVA DE PATERNITAT	10
· Extracció del DNA	11
· PCR Múltiplex	12
· Electroforesis capil·lar	14
· Edició de l'electroferograma	16
· Elaboració de l'informe	19
3. OBJECTIU	22
4. METODOLOGIA	22
· Antecedents	23
· Formulació hipòtesis	25
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ	25
· Estudi estadístic	27
· Anàlisis STRs cromosoma X de la filla vs el presumpte pare	29
· Veredicte de l'informe	30
6. CONCLUSIONS	31
7. ANNEXOS	32
8. REFERÈNCIES	42

1. INTRODUCCIÓ

Què és el DNA?

El DNA, àcid desoxiribonucleic, és un compost orgànic localitzat al nucli de les cèl·lules, com també als mitocondris i ribosomes. En la seva seqüència, formada per desoxiribonucleòtids, du codificada les instruccions per a formar tots els altres components cel·lulars i actua a més a més, com a motlle per a la producció de molècules idèntiques de DNA, les quals seran distribuïdes a la progènie al dividir-se la cèl·lula.

La unitat funcional i fonamental del DNA són els gens, els quals contenen la informació per a la síntesis de proteïnes, és a dir, són les regions que es transcriuen a RNAs missatgers i finalment es tradueixen a proteïnes als ribosomes.

Tot el conjunt de gens d'un organisme és el que s'anomena genoma. Tenint en compte que el genoma dels éssers humans conté 3164,7 milions de bases nucleotídiques organitzades en 23 parells de cromosomes, la suma de tots els gens suposa només un 2% del genoma. Per tant, el 98% del genoma humà és DNA no codificant, o el que és el mateix, DNA que no conté informació rellevant per a la síntesi de proteïnes.

Estructura del DNA

El DNA és un polímer de nucleòtids. Cada un d'aquest nucleòtid està format per una base nitrogenada (adenina, timina, citosina i guanina), un sucre (desoxiribosa) i un grup fosfat, el qual permet que els nucleòtids que formen el polímer estiguin enllaçats. Tota la seqüència en qüestió és el que s'anomena estructura primària.

No obstant, aquesta seqüència de nucleòtids (estructura primària) no es troba de forma lineal en l'espai, sinó en forma de doble hèlix, on les dues cadenes estan unides mitjançant ponts d'hidrogen. Aquestes dues cadenes són complementaries, és a dir, si a la cadena principal en la posició X hi ha una C, en la complementaria en aquella mateixa posició hi haurà una G, el mateix succeeix amb la A, on la seva base complementaria és la T. A més a més, aquestes cadenes són antiparal·leles, és a dir, a l'extrem 3' d'una d'elles enfronta l'extrem 5' de l'altra cadena.

Finalment, aquesta doble hèlix en la cèl·lula es troba compactada en forma de cromosoma. És el que s'anomena estructura terciària.

Aquest nombre de cromosomes cel·lulars és el mateix en totes les cèl·lules de l'organisme, i en el cas dels humans tenim 22 parells de cromosomes no sexuals o autosòmics i els sexuals (XX o XY).

A excepció dels bessons univitel·lins, el DNA d'un individu és únic. Com que un dels cromosomes s'hereta del pare i l'altre de la mare, i la herència de cada cromosoma és independent dels altres cromosomes, el nombre de combinacions possibles que un fill pot rebre dels seus pares és: $2^{23+23} = 2^{46}$.

Tipus de DNA

Així doncs, de tot el DNA present en una cèl·lula, aquest es pot dividir en DNA codificant i DNA no codificant:

- **DNA codificant**: és aquell DNA que conté la informació genètica en els gens i que acaba codificant-se per una proteïna. Aquestes seqüències estan separades per llargues regions de DNA anomenades introns, les quals no tenen funció aparent. Aquest DNA no té importància en l'àmbit de la genètica forense, ja que en general és poc variable i polimòrfic entre els individus (exceptuant la regió HLA) i és compartit per la majoria dels éssers humans, ja que és el que determina a cada espècie.
- **DNA no codificant**: és aquell DNA que no es tradueix a cap proteïna. La gran majoria d'aquest DNA es localitza entre els gens en el cromosoma i la gran part de la seva funció no és coneguda, tot i que recents estudis biològics afirmen que aquesta recau en la regulació de proteïnes, on una mutació podria esdevenir en alguna malaltia genètica, com el càncer, però no només exclusivament aquest.

Al mateix temps, el DNA no codificant es pot dividir en:

- **Introns**: Són regions de DNA que es localitzen a l'interior dels gens. Són transcrits a RNA però posteriorment són eliminats, per tant no es tradueixen a proteïnes.
- **Pseudogens**: Són gens duplicats que han perdut la seva funció.

- Transposons: Són seqüències de DNA que es poden moure d'una posició a una altra del genoma en una cèl·lula concreta.
- DNA satèl·lit: Aquest DNA està localitzat en els centròmers i telòmers. Són seqüències de DNA repetitives disposades en forma de tàndem. És en aquest DNA on rau la importància en genètica forense a l'hora de la identificació d'individus i establir relacions de parentesc entre ells.
- DNA de seqüències reguladores: DNA que controla processos de transcripció d'un gen que es localitzi proper a aquest.

La Genètica Forense és la ciència que aplica les tecnologies de la biologia molecular per a l'estudi dels polimorfismes de locis de DNA d'interès forense amb la finalitat de resoldre certs problemes jurídics i legals ⁽¹⁾. Aquest estudi integra la genètica poblacional i la identificació biològica desenvolupada principalment en els següents punts:

- Investigació biològica de filiació, centrant-se particularment sobre les investigacions de paternitat.
- Investigació biològica de parentesc, que engloba també els estudis de casos de immigració.
- Identificació biològica de desconeguts, on es persegueix la identificació en els casos de desastres en massa.
- Investigació criminal biològica

Un dels tipus de perícies més sol·licitades al laboratori de genètica forense són casos d'investigació biològica de paternitat, les quals tenen un únic objectiu: la atribució, a través d'unes mostres, una relació de paternitat lligada a una valoració estadística.

En aquest treball s'estudiarà aquest tipus de perícies gràcies a la col·laboració amb un conveni de pràctiques amb Neodiagnòstica SL, laboratori acreditat per l'ENAC on la seva principal tasca és realitzar aquestes proves de paternitat, com també proves de drogues, encara que en menys freqüència. Les proves de paternitat sol·licitades es poden classificar en judicials i no judicials. Les proves de paternitat de caràcter judicial són aquelles que sol·licita el jutge per alguna raó, tals com custodies o demostració d'una paternitat quan un immigrant amb papers regularitzats vol dur els seus progenitors a Espanya.

Polimorfismes del DNA: Short Tandem Repeats (STRs)

Tal com s'ha comentat anteriorment, la individualitat biològica constitueix una fase fonamental de la perícia de la identificació biològica i actualment s'efectua a través dels polimorfismes de loci de DNA amb interès forense o de l'estudi de polimorfismes de microsatèl·lits (Short Tandem Repeats) autosòmics i del cromosoma Y. El DNA mitocondrial s'utilitza en l'estudi dels SNPs en casos complexos ⁽²⁾.

Els microsatèl·lits autosòmics o STRs són seqüències altament repetitives de 2 a 5 parells de bases d'extensió que es localitzen en determinades regions del genoma, existint per les quals una elevada taxa de polimorfisme i un gran poder de discriminació individual ⁽⁴⁾. Això és degut a que els STRs són característicament multial·lèlics amb unes regions flanquejants molt ben conservades, les quals fan que el primer durant la PCR s'hi uneixi fàcilment per complementarietat. La majoria dels STRs utilitzats en la identificació d'individus consten de repeticions de 4 parells de bases, amb al·lels d'entre 100 i 300 pb, encara que n'hi ha alguns de 350 pb, com poden ser els loci D2S1338, D18S51, CSF1PO i FGA. Aquest polimorfisme existent entre individus es manifesta com a diferències de longitud entre els diferents al·lels d'un mateix locus. Per exemple, un STR pot seguir la següent repetició en tàndem: ACTT, ACTT, ACTT, ACTT, ACTT fins un nombre de n repeticions (en aquest cas 5 repeticions de ACTT). Així doncs, diferents individus es diferenciarien per el nombre de repeticions d'aquesta seqüència en el mateix loci del cromosoma. Un individu que sigui 7-11 per aquesta seqüència significarà que en una posició específica del cromosoma té 7 repeticions de la tètrada ACTT i 11 repeticions d'aquesta mateixa en el cromosoma homòleg. A més a més de l'elevada variació, els STRs tenen una herència mendeliana simple, és a dir, un al·lel ha sigut heretat del pare i un altre de la mare, fet clau per a atribuir una relació de parentesc biològic entre un presumpte pare i un fill/a.

Per a establir una relació de parentesc biològic entre dos individus, el mètode més comú d'estudi d'aquests STRs és la PCR múltiple amb electroforesis capil·lar i la seva detecció mitjançant fluorescència ⁽³⁾, tal com es mostra en la següent imatge:

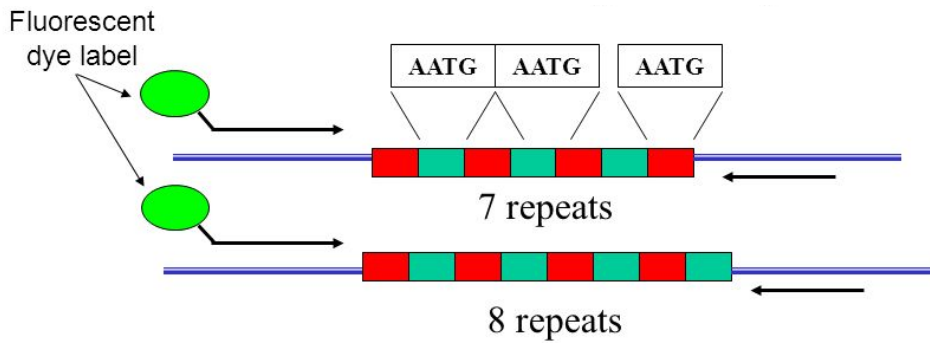


Figura 1. Representació gràfica d'un STR d'un individu heterozigot. En un dels cromosomes hi ha 7 repeticions de la tètrada AATG i en l'altre cromosoma, 8 repeticions. També es pot observar les regions flanquejants de color lila, les quals estan molt ben conservades i són on els primers marcat fluorescentment s'hi unirà.

Mutació dels STRs

Els STRs solen presentar una elevada taxa de mutació degut a un fenomen anomenat "lliscament de la polimerasa", el qual és molt característic de les zones de DNA repetitiu. Aquest fenomen té lloc quan durant la replicació, on la DNA polimerasa produeix un lliscament sobre la cadena motlle que com a resultat es forma una bombolla a la nova cadena⁽⁹⁾. El mecanisme de reparació del DNA elimina aquesta bombolla, on es produeixen insercions o delecions, fent que el nombre de repeticions de l'al·lel augmenti o disminueixi, tal com s'observa en la següent figura:

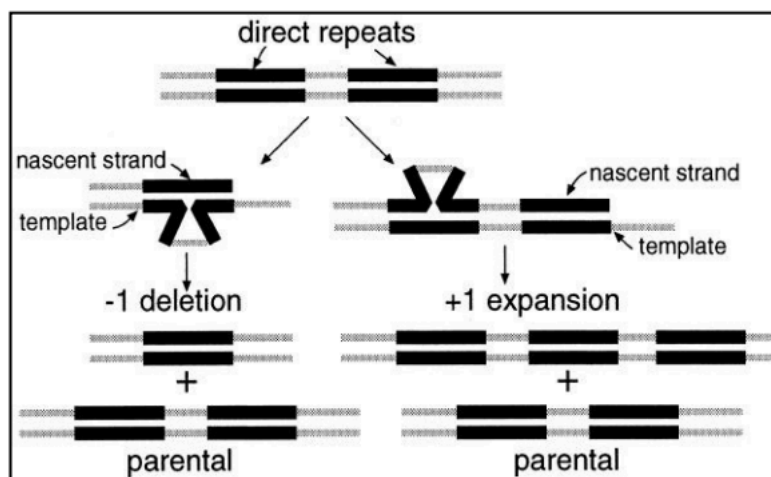


Figura 2. Conseqüències del lliscament de la polimerasa durant la replicació: augment o disminució del nombre de repeticions en un al·lel

La taxa de mutació dels STRs depèn de varis factors: en els STRs compostos i en els complexos la taxa de mutació és més freqüent que en els locis simples. A més a més, s'observen més mutacions en aquells STRs més llargs que en els de menys repeticions. No obstant, es conserva el polimorfisme degut a que el guany o la pèrdua de les repeticions té lloc amb igual freqüència.

Les mutacions tenen lloc més freqüentment en les cèl·lules germinals dels testicles que en la dels ovaris, ja que mentre que la oogina experimenta només 22 cicles de divisió abans de la primera ovulació, la espermatogina experimenta unes 30 mitosis abans d'arribar a la maduració sexual, a partir de llavors realitza entre 20 i 30 cicles de divisió cel·lular per any. Per aquest motiu s'ha establert fins a un màxim de 3 incompatibilitats entre el genotip del presumpte pare i l'al·lel d'origen patern del fill, les quals no es menyspreen a l'hora de realitzar la valoració estadística, on el que es procedirà és a augmentar el nombre de STRs analitzats.

2. ETAPES DE LA PROVA DE PATERNITAT

Quan es realitza una prova de paternitat, el resultat que s'obté és una valoració estadística lligada a una exclusió o inclusió d'una relació de paternitat biològica entre dos o més individus (essent aquests el presumpte pare i fill/a o fills/es)⁽⁵⁾. Aquest resultat es plasma en un informe judicial el qual s'enviarà directament a l'ambaixada, al client o a l'advocat que l'ha sol·licitat. Durant la realització de la prova, des de la presa de mostres, s'ha de garantir la continuïtat de la cadena de custòdia. Aquesta cadena de custòdia representa el procés que garanteix que les mostres preses corresponen als individus participants i que es salvaguarden les mostres en cada etapa del procés, és a dir, que aquestes són resguardades, que cada pas que es realitza sigui documentat amb els fulls de treballs corresponents i que només les mostres estan en possessió de les persones autoritzades, per a així evitar qualsevol possible manipulació d'aquestes per tercers garantint els resultats de la prova del DNA. Aquesta cadena de custòdia comença quan es realitza la presa de la mostra i es manté durant tota la prova del DNA.

Els passos per a la realització de la prova de paternitat són els següents:

1. Extracció del DNA

El primer pas és la extracció del DNA de les mostres que han proporcionat els individus a estudiar. L'objectiu d'aquest pas és la separació dels àcids desoxiribonucleics de la resta de components cel·lulars.

En la majoria dels casos en proves de paternitat, les mostres són hisops bucal, és a dir mostres indubtables i el DNA s'extraurà de les cèl·lules epitelials que s'han adherit al cotonet degut a la pressió física produïda per el raspat.

A Neodiagnòstica SL la extracció d'aquest DNA es realitza amb un kit comercial anomenat DNA IQ™ System, de Promega, el qual està format d'un buffer de lisis (quan s'enceta el potet s'ha d'afegir DTT), un buffer d'elució i un buffer de rentat. Aquesta extracció de DNA automatitzada es duu a terme per l'instrument anomenat Maxwell ®16 seguint les instruccions del fabricant ⁽⁸⁾. Gràcies a aquest instrument, es purifica el DNA de la mostra utilitzant el principi bàsic de separació la lisi cel·lular i la unió a partícules de sílice magnetitzades. Entre els passos automatitzats que realitza l'instrument s'inclouen:

- Lisis de la mostra en presència d'un agent caotròpic i detergent.
- Unió del DNA a partícules de sílice magnetitzades.
- Rentat de les partícules unides per separar-les de la resta dels components cel·lulars.
- Elució del DNA en un tampó que permet afegir-los directament a la PCR.

La temperatura de les mostres es regula mitjançant un sistema d'escalfament controlat per el protocol.



Imatge 1. Instrument Maxwell ®16

2. PCR múltiplex

Tot seguit, un cop s'ha realitzat correctament la extracció automatitzada del DNA amb Maxwell ® 16, el següent pas és la realització de la PCR múltiplex, on els diferents al·lels dels STRs són amplificats simultàniament.

La PCR múltiplex és una tècnica que està basada en la reacció en cadena de la polimerasa, tal com el seu nom indica. Es realitzen mitjançant varies reaccions a diferents temperatures moltes còpies dels fragments d'interès. La reacció té lloc en diferents cicles cada un dels quals té els següents passos: desnaturalització, hibridació i extensió.

La desnaturalització (95-96°C) és quan es produeix la separació de la doble hèlix de DNA com a conseqüència del trencament dels ponts d'hidrogen que uneixen les dues cadenes.

La hibridació (50-60°C) és el pas en que els primers s'uneixen de forma específica a les seves seqüències complementaries.

En la extensió (72°C) la TaqPolimerasa incorpora nucleòtids en l'extrem 3' del primer utilitzant com a motlle la cadena de DNA prèviament desnaturalitzada.

Per a la realització d'aquesta PCR múltiplex, s'ha utilitzat el kit comercial PowerPlex® 16 System de Promega ⁽⁶⁾. Aquest kit amplifica simultàniament 16 locis amb una

probabilitat de coincidència aleatòria de $1,2 \cdot 10^{-18}$. Aquests locis amplificats són els següents:

Taula 1. Locis STR amplificats pel kit comercial kit comercial PowerPlex® 16 System de Promega, la seva localització cromosòmica i la seqüència repetitiva.

Loci STR	Localització cromosòmica	Seqüència repetitiva
D3S1358	3p21.31	[TCTG][TCTA]
TH01	11p15.5	TCAT
D21S11	21q21.1	[TCTA][TCTG]
D18S51	18q21.33	AGAA
Penta-E	15q26.2	AAAGA
D5S818	5q23.2	AGAT
D13S317	13q31.1	TATC
D7S820	7q21.11	GATA
D16S539	16q24.1	GATA
CSF1PO	5q33.1	TAGA
Penta-D	21q22.3	AAAGA
Vwa	12p13.31	[TCTG] [TCTA]
D8S1179	8q24.13	[TCTA][TCTG]
TPOX	2p25.3	GAAT
FGA	4q31.3	CTTT
Amelogenina	Xp 22.22 Yp11.2	No aplicable

Quan es realitza la PCR múltiplex a més a més de les mostres a amplificar, s'hi afegirà un control negatiu, mostra la qual no conté DNA, i que serveix per a indicar que no hi ha cap contaminació de DNA i que la PCR s'està realitzant correctament. També un control positiu, el qual és una mostra de DNA on es coneixen perfectament els al·lels de cada marcador a amplificar. Aquest control serveix per a verificar que s'està fent una assignació correcta dels al·lels en cada marcador. A més a més, la dilució per a les mostres serà de 1/20 i la del control positiu 1/15. El blanc no porta dilució, doncs com que no conté DNA no es necessita realitzar-ne cap. Aquests factors de dilució estan estandarditzats i sempre són els mateixos, gràcies a la realització d'un estudi amb diferents dilucions quan es va posar en marxa el laboratori. A cada mostra a amplificar se li afegirà la màster mix, de la casa Promega, la qual està formada per:

- Water, amplification grade. Utilitzada com a solvent.
- Powerplex HS 5X Master Mix. Formada per la Taq Polimerasa, dNTPs, MgCl₂ i buffers de reacció a concentracions òptimes per a una amplificació adient del DNA.
- Poweplex HS 10X Primer Mix. Conté els primers marcats fluorescentment (Forward i Reverse). Són uns oligonucleòtids sintètics de 15-20 bases que són complementaries a les zones flanquejants (molt conservades) de la regió que es vol amplificar.

Un cop realitzada la PCR mitjançant els encebadors marcats fluorescentment, el nombre de repeticions de la seqüència consens en cada locus determinarà la mida definitiva de l'amplicó gràcies a la realització d'una electroforesis capil·lar.

3. Electroforesis capil·lar

Aquesta electroforesis té lloc a l'interior d'un capil·lar buit ⁽⁷⁾. Un cop aquesta comença, i gràcies a un estàndard de mida de referència o ladder, es van identificant mitjançant un lector de fluorescència els diferents fragments de DNA que conclouen el seu transit per el capil·lar electroforètic. El temps transcorregut en aquest trànsit, és a dir, el temps que tarda el fragment de DNA en travessar tot el capil·lar i arribar al detector, serà directament proporcional la seva mida. Com més gran sigui el fragment de DNA (per més repeticions estigui format) més temps necessitarà per travessar el capil·lar, i com

més petit sigui el fragment, més ràpid el travessarà. Aquesta electroforesis capil·lar es duu a terme amb l'anàlitzar ABI PRISM 310.

Com que el DNA és una molècula que està carregada negativament, quan es punxa la mostra de DNA a un extrem del capil·lar, gràcies a l'aplicació d'un camp elèctric, aquest començarà a desplaçar-se per el capil·lar direcció el pol positiu del capil·lar.

Al final del capil·lar hi ha un detector òptic el qual està format per una càmera CCD en un extrem i un làser a l'altre costat. Quan els STRs travessen el làser, aquest s'excita, emetent una fluorescència en diferents colors degut a que cada marcador està marcat amb un fluorocrom diferent. Aquesta fluorescència emesa és recol·lectada per la càmera i transmesa al software de l'equip on separarà les senyals en funció del color donant lloc a un electroferograma.

El software porta incorporat la informació sobre les diferents longituds que pot tenir un loci en qüestió, la qual depèn del nombre de repeticions del tàndem. Gràcies a que durant la PCR s'han marcat els STRs amb fluorocroms i l'estàndard intern incorporat (pics vermells), el software pot determinar amb precisió quina és la longitud de cada STR i per tant, el nombre de repeticions que aquest conté.

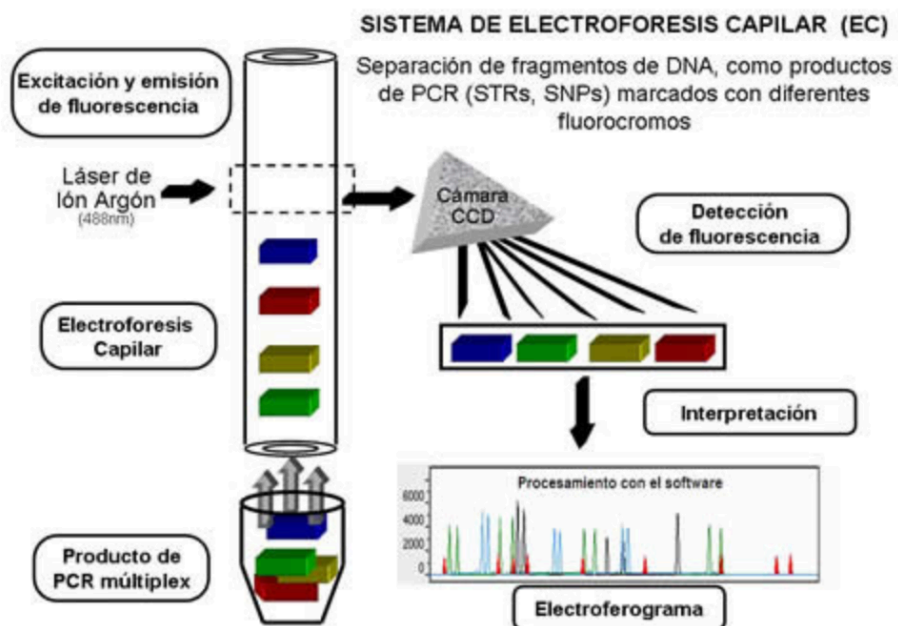


Figura 3. Representació dels passos que involucra l'anàlisi de fragments de DNA per electroforesis capil·lar.

Cada un dels pics de l'electroferograma ens proporciona informació de:

- Perfil genètic. El determina, és a dir, per un marcador es sap quins al·lels el formen.
- Si només apareix un pic significa que per aquell marcador l'individu en qüestió n'és homozigot. És a dir, en els dos al·lels del loci el nº de repeticions del tàndem és el mateix (Ex. 11,11).
- Si per un marcador apareixen dos pics voldrà dir que per aquell marcador l'individu n'és heterozigot. És a dir, en cada al·lel el nombre de repeticions del tàndem és diferent (Ex 12,13).
- Posició del pic. Com més petits són els al·lels més a l'esquerra de l'electroferograma apareixen. Per contra, com més grans més a la dreta de l'electroferograma apareixeran.
- Quantitat de DNA que conté la mostra, la qual serà directament proporcional a l'altura del pic del marcador. Si per un marcador un individu és homozigot, la altura del pic sol ser més alta que si fos heterozigot.
- El sexe de l'individu, gràcies al marcador de l'amelogenina. En el cas de les dones només s'observarà un sol pic i en els homes dos pics

4. Edició de l'electroferograma

Un cop s'obté l'electroferograma pel programa GeneMapper, on per a cada marcador hi ha indicat els seus dos al·lels corresponents, resultant de la separació dels fragments amplificats per pes, aquest s'ha d'ajustar, ja que hi ha una sèrie d'artefactes que poden interferir en els al·lels reals.

Durant la amplificació dels al·lels STRs per mitjà de la tècnica de la PCR, poden sorgir un nombre d'artefactes que interfereixen en la clara interpretació dels resultats i, per tant, en el genotipat dels al·lels presents en el DNA motlle. En una reacció múltiple la probabilitat de formació d'aquests artefactes és major, pel que s'ha de tenir en compte la necessitat de variació i optimització d'alguns dels paràmetres, tals com les condicions

cíclicues de la reacció i els components de la mateixa, amb la finalitat d'aconseguir un rendiment equilibrat en la amplificació simultània dels locis escollits.

Els artefactes que es poden trobar en les reaccions múltiplex són els següents:

- Amplificacions inespecífiques com:

Bandes Stutter.

Aquest artefacte és degut al lliscament de la polimerasa durant l'amplificació de la cadena motlle. Mentre que per simple lògica la gran majoria dels artefactes poden ser exclosos i qualificats com a productes no al·lèlics, no resulta possible excloure d'aquesta manera aquestes bandes, ja que si que són productes al·lèlics que es diferencien estructuralment de l'al·lel associat només per una sola unitat de repetició.

Encara que habitualment els stutters apareixen en parella, aquesta dada no és necessàriament diagnòstica. Si un al·lel té seqüències no consens o parcials, llavors hi haurà més tendència a generar bandes stutters que l'al·lel que consisteixi de repeticions complertes.

Algunes altres característiques dels stutters són les següents:

- Representa menys del 10% del pes del pic de l'al·lel principal.
- La quantitat de stutters depèn tant de les condicions de la PCR com de la polimerasa utilitzada.
- La propensió per a formar stutters disminueix amb les unitats de repeticions més llargues (repeticions pentanucleotídiques < tetra < tri < dinucleotídica).

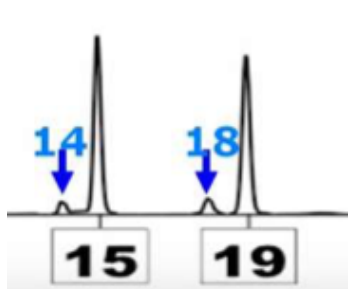


Figura 4. Al·lels 15 i 19 d'un marcador, on els pics alts i primers són els pics que corresponen als al·lels vertaders i els que tenen davant d'ells, els quals són molt baixets són els pics que corresponen als stutters.

- **Artefactes inespecífics**

Aquests es generen com a resultats de la hibridació de fragments de DNA degradat o bacterià i corresponen a pics de mida petita, on les seves característiques són les següents:

1. Tenen l'àrea del pic baixa i la seva morfologia és aberrant.
2. La majoria no estan dins del rang al·lèlic del loci.
3. Estan relacionats amb hibridació del primer en un altre lloc del genoma.
4. També s'observen en mostres de DNA degradats.

Aquests artefactes inespecífics són:

Pull-up

Són pics degut a la interacció hardware/matriu, que és defineix com un pic menor en un color diferent i directament per sota d'un pic al·lèlic major o pics petits en els carrils adjacents a un pic gran exactament en la mateixa posició. S'han observat habitualment en mostres sobreamplificades i amb molta concentració de DNA, i necessiten ser diferenciats dels al·lels veraders per mitjà de posició i morfologia del pic. Si un electroferograma té molts pull-ups, s'haurà de baixar el temps d'injecció. Si realitzant aquest pas aquests artefactes no desapareixen en el nou electroferograma, s'haurà de repetir la PCR amb un factor de dilució més elevat.

Quan la intensitat de la senyal és molt elevada no es pot mesurar el vertader valor de la senyal i, per tal de compensar-ho, es genera un solapament espectral

de colors. Com a resultat, es generen uns pics que solen estar presents en la mateixa posició, però amb un color diferent.

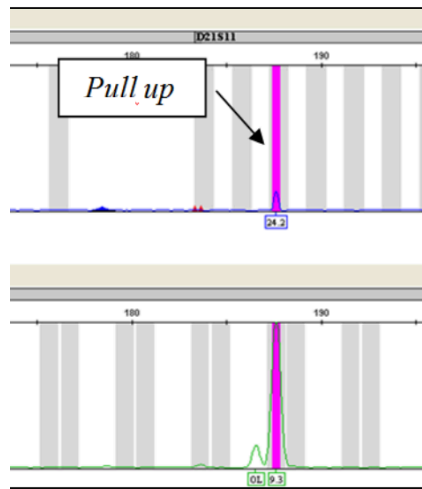


Figura 5. Exemple de pull-up en un electroferograma

Spikes

Són pics molt alts i prims, els quals es generen degut a una pujada sobtada de la corrent, partícules que travessen el capil·lar durant la electroforesis o per partícules de pols presents durant les captures de la càmera CCD.

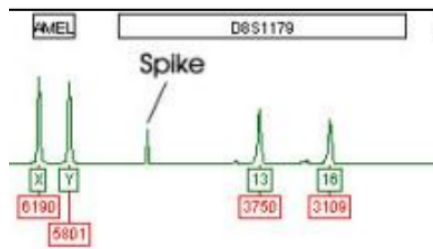


Figura 6. Exemple d'un Spike en un electroferograma

- Al·lels off-ladder

Són els al·lels que no estan inclosos en el ladder. El ladder és un marcador de DNA de referència, el qual permet identificar i assignar els al·lels de cada STR estudiat, però pot succeir que un STR tingui un al·lel molt poc freqüent en la població que no estigui incorporat en el ladder. Aquests al·lels seran assignats pel GeneMapper com un off-ladder. La assignació de l'al·lel real s'haurà de fer a ma a partir dels pesos moleculars.

5. Elaboració de l'informe:

Un cop es tenen els electroferogrames del presumpte pare i fill/s, s'haurà de comparar els al·lells de cada individu per a cada marcador. Tal com s'ha comentat anteriorment, els STRs tenen una herència mendeliana simple, per tant, un dels al·lells de cada marcador del presumpte pare haurà de coincidir amb un dels al·lells del fill, ja que és l'al·lel que li haurà transmès el pare: l'al·lel obligat, sempre donada una parella biològica mare-fill com a verdadera.

Quan es comparen els al·lells poden donar-se dues situacions:

1. Exclusió de paternitat. Quan 4 o més al·lells no coincideixen. En aquest cas no és necessari associar un valor estadístic a la prova realitzada.
2. No exclusió. Quan els perfils tenen els mateixos al·lells obligats en cada loci. S'associa un valor estadístic.

En el cas de no exclusió, poden existir incompatibilitats genètiques entre el presumpte pare i el fill/a. Si es detecten dues o menys incompatibilitats genètiques serien a conseqüència d'una mutació puntual. En aquest cas es procediria a comparar 7 STRs addicionals per veure si s'observen més exclusions. En el cas que no se'n observessin més es donaria la paternitat com a positiva i es procediria al càlcul estadístic.

Tal com s'ha comentat, s'ha establert un marge de 3 exclusions com a màxim per a donar com a positiva la paternitat ja que existeixen mutacions puntuals en aquests STRs. En la investigació biològica de la paternitat, els STRs estudiats han de tenir una baixa taxa de mutació, no obstant, s'observen mutacions a nivell dels polimorfismes en pràcticament tots els locis STRs d'interès forense. Varis tipus de mutacions implicant a una sola base o algunes poques poden ser conseqüència de la inserció d'una unitat de repetició, la deleció d'una unitat de repetició o la substitució puntual d'una base. Les mutacions per inserció o deleció es localitzen en una zona de repetició de la estructura dels STRs, mentre que la mutació per substitució puntual més freqüent en la zona d'unió dels primers.

Tanmateix, hi ha dues classes d'exclusions, de primer i de segon ordre:

A) Exclusió de primer ordre:

- Quan el suposat fill/a té un al·lel que està absent en el presumpte pare i en la mare.
- Quan en el suposat fill/a no es detecta cap dels al·lells que estan presents en el presumpte pare, en heterozigosis d'aquest i/o del fill/a.

B) Exclusió de segon ordre:

- Quan el suposat fill/a i el presumpte pare són homozigots per al·lells diferents. És a dir, que per un marcador específic el pare sigui 11,11 i el fill sigui 13,13.

Quan no existeixen incompatibilitats genètiques en els sistemes estudiats, es calcula la probabilitat de paternitat entre el presumpte pare implicat i el fill versus un individu escollit a l'atzar de la població de referència i que no té relació biològica amb el presumpte pare biològic. És a dir, es contrasta la probabilitat que els al·lells presents en el fill vinguin del presumpte pare versus la probabilitat que els hagi rebut de qualsevol altre individu escollit a l'atzar de la població de referència.

Per a realitzar aquesta valoració estadística, el primer que es realitza és formular dues hipòtesis: H_1 i H_0 .

H_0 és la hipòtesis que recolza que el presumpte pare és el pare biològic.

H_1 , és la hipòtesis que recolza que el pare biològic és un individu escollit a l'atzar de la població de referència i que no té cap relació biològica amb el presumpte pare.

Tot seguit, es calculen les probabilitats següents:

X = probabilitat dels perfils genètics evidenciats en les mostres estudiades acceptant la hipòtesis 1.

Y = Probabilitat dels perfils genètics evidenciats en les mostres estudiades acceptant la hipòtesis 2. Aquestes freqüències al·lèliques dependran de la població que s'esculli com a població de referència i els seus valors estan dipositats en diferents bases de dades, ja que seria impossible tenir totes les probabilitats dels marcadors de tots els individus de la població de referència. Per a la població europea, la base de dades que s'utilitza per

a obtenir les freqüències al·lèliques dels marcadors estudiats s'anomena ENFSI DNA WG STR Population Database.

Aquestes freqüències fan referència al nombre de vegades que apareix un al·lel en una determinada població dividit pel total d'aquella població

Llavors, l'índex de paternitat o raó de verosimilitud de X i Y, és a dir, de les dues hipòtesis, sorgirà de dividir el valor de X entre el de Y, tal com es mostra en la següent expressió:

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

Aquest IP es calcula a partir dels al·lells (genotips) de cada marcador STR estudiat. El IP s'estima individualment per a cada STR, ja que s'hereten independentment:

- Per a un marcador homocigot (AA), on l'al·lel té una freqüència p, $P = p^2$
- Per a un marcador heterocigot (AB), on els al·lells tenen unes freqüències p i q, llavors $P = 2pq$.

Finalment s'obté un IP total o un índex de paternitat acumulat, multiplicant tots els IP individuals de cada marcador, tal com es mostra a continuació:

$$IP_{\text{total}} \text{ o } CPI = IP_{STR1} \cdot IP_{STR2} \cdot IP_{STR3} \cdot IP_{TSTRn}$$

A partir d'aquests valors, s'obté l'índex de paternitat, suposant una probabilitat a priori de 0.5, ja que el presumpte pare té tantes possibilitats de ser-ho com de no ser-ho, d'aquí a que a la fórmula del IP al numerador hi hagi $0,5 \cdot 0,5$.

Aquest índex de paternitat (IP_{total} o CPI) es converteix a una probabilitat, anomenada probabilitat de paternitat (PP), la qual sorgeix de la següent expressió:

$$\text{Probabilitat de paternitat (PP)} = \frac{CPI}{1+CPI}$$

3. OBJECTIU

L'objectiu d'aquest treball, i de qualsevol projecte que arriba a Neodiagnostica SL és proporcionar un informe judicial recolzat d'una valoració estadística on hi figuri un resultat positiu o negatiu de la prova de paternitat realitzada a partir d'unes mostres genètiques del presumpte pare/mare i fill proporcionades pels demandants de la prova.

4. METODOLOGIA

Quan arriba un projecte a Neodiagnòstica el primer que es realitza és la entrada d'aquest a una base de dades interna, és a dir, la mostra (normalment hisop) amb nom i cognoms, la qual està continguda dins d'un sobre judicial, se li atribueix un codi, el qual és el següent: 18FIDXXX, on 18 fa referència a l'any 2018, FID significa "forensic identification" i les XXX fan referència a la posició que ocupa la mostra respecte a totes les mostres rebudes en l'any en qüestió.

En aquest treball s'ha estudiat la mostra 18FID0357, és a dir, és el projecte número 357 de l'any 2018. A més a més, darrere el número hi apareixerà -M1, -M2, -M3, etc, tants MX com mostres formin part del projecte. És a dir, si hi ha un presumpte pare i dos fills, aquests s'etiquetaran com M1 el presumpte pare i M2 i M3 els dos fills.

Seguidament, un cop es tenen les mostres etiquetades es guarden a la nevera fins que siguin analitzades. L'ordre d'anàlisis d'aquestes dependrà de diferents factors, tals com si la mostra és urgent, si s'ha abonat el 100% del preu de la prova o només una part, antiguitat, etc.

A continuació s'exposa el cas:

Antecedents:

En data 3 de maig de 2018 es presenten a la Secció Consular de la Ambaixada d'Espanya a Kiev (Ucraïna), un home (suposat pare biològic) i la seva filla per a la realització d'una prova de paternitat.

El suposat pare, juntament amb la seva parella han tingut dues filles per gestació subrogada a Ucraïna (a Espanya no és legal però a Ucraïna si). La primera de les filles ja

es va demostrar que era filla del pare biològic, quan aquesta va néixer (actualment té 10 anys).

S'entén com a gestació subrogada una forma de reproducció assistida en la que, a més a més dels futurs pares, participa una dona que gesta l'embrió. Aquest embrió pot ser resultat d'una inseminació artificial o d'una fecundació in vitro i les gàmetes poden provenir de un dels progenitors i d'una donant, dels dos progenitors o de dos donants. En aquest cas, la gàmeta masculina prové del presumpte pare i l'òvul d'una donant, el qual no és de la dona que gestarà l'embrió.

La situació de la gestació subrogada a Espanya és alegal. L'article 10 de la Llei 14/2006, de 26 de Maig, sobre Tècniques de Reproducció Humana Assistida, estableix que el contracte per al que es convingui la gestació, amb o sense preu, a carrer d'una dona que rebutja a la filiació materna a favor del contractant o tercer és nul de ple dret.

No obstant, la Instrucció de 5 d'octubre de 2010 de la Direcció General dels Registres i el Notariat ha deixat sense contingut efectiu la prohibició de la gestació subrogada al contemplar la inscripció en el Registre Civil de nens fruits d'aquesta tècnica, sempre que el procediment s'hagi dut a terme en un país on aquesta tècnica estigui regulada, que un dels pares sigui espanyol i que existeixi una resolució judicial que garanteixi, entre altres aspectes, els drets de la dona gestant. En la anotació que es realitzi als registres no figurarà el nom d'aquesta dona.

Per tant, el client que ha contactat amb Neodiagnòstica SL s'ha hagut de desplaçar fins a Ucraïna, país on si es legal la gestació subrogada per a poder proporcionar el seu material genètic i s'ha de demostrar via la Ambaixada d'Ucraïna a Espanya mitjançant una prova de DNA la relació parental amb la filla nascuda a partir d'un embaràs de subrogació, i que no es tracta d'un tràfic de menors.

Les mostres dels 2 individus van consistir en hisops bucal de tots els participants, considerant-se indubtables i seguint el protocol de presa de mostres amb cadena de custòdia.

Els dos participants van ser conscients de la prova encarregada i varen donar el seu consentiment exprés i voluntari. Les mostres varen ser guardades en dos sobres

separats i identificats com a suposat pare i filla 1 . Aquests varen ser segellats, firmats i es va omplir la custòdia de les mostres, tot garantint la inviolabilitat de les mateixes. Els sobres amb les mostres dels participants junts amb la documentació, varen ser guardats en una bossa de custòdia per al transport amb codi de barres 01166658. En aquesta bossa es va omplir la fulla de ruta, es va segellar i firmar, garantint la inviolabilitat del seu contingut.

Les mostres biològiques varen ser conduïdes al laboratori central de NEODIAGNOSTICA, SL, localitzat en el Parc Científic, Ed. H3, Pl. 1, Of. 1 de Lleida, per el servei de missatgeria urgent UPS, controlant-se el seu codi i la seva integritat (Y004 883 284 4).

La recollida de les mostres biològiques, transport i emmagatzematge temporal de les mostres i documents s'han realitzat segons els protocols interns que garanteixen la seva total inviolabilitat i el manteniment constant de la cadena de custòdia.

En data 8 de maig de 2018, NEODIAGNOSTICA, SL va rebre les mostres biològiques i es va procedir a verificar la integritat de la bossa de custòdia i els sobres, considerant-se les mostres com a inalterades, per tant, NEODIAGNOSTICA SL certifica el manteniment constant de la cadena de custòdia de les mostres durant el transport, fins al laboratori en qüestió, per el que es va procedir a la integració de les mostres rebudes en el procés analític.

L'etiquetatge de les mostres va ser el següent:

Mostra procedent del presumpte pare: 18FID0357-M1

Mostra procedent de la filla: 18FID0357-M2

Formulació hipòtesis:

- **Hipòtesis a verificar (H_0):**
 - El suposat pare biològic (18FID0357-M1) és el pare biològic de la filla (18FID0357-M2).

- **Hipòtesis alternativa (H₁):**

- El pare biològic de la filla (18FID0357-M2) és qualssevol altre individu desconegut de la població de referència agafat a l'atzar no relacionat genèticament amb el suposat pare.

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

La prova de paternitat realitzada a Neodiagnostica SL, es basa en l'anàlisi de 16 STRs, al·lels dels quals es mostren a continuació (Per a veure els electroferogrames consultar els annexos).

Taula 2. Resultats al·lels 16 STRs presumpte pare vs filla

Marcador	Al·lels pare (Ped1)		Al·lels filla 1		Al·lels coincidents
D3S1358	17	18	16	18	18
TH01	6	9.3	9.3	9.3	9.3
D21S11	29	32.2	32.2	33.2	32.2
D18S51	16	18	12	15	Inconsistència **
Penta E	14	19	10	18	Inconsistència **
D5S818	11	11	11	11	11
D13S317	11	12	11	11	11
D7S820	7	10	7	10	7-10
D16S539	11	12	11	13	11
CSF1PO	11	12	12	12	12
Penta D	12	13	9	12	12
vWA	14	19	18	19	19

D8S1179	10	14	12	14	14
TPOX	8	10	8	10	8-10
FGA	20	23	20	25	20
Amelogenina	X	Y	X	X	----

Tal com s'observa en la Taula 2, hi ha dues inconsistències o exclusions de dos marcadors del suposat pare amb la filla, és a dir, es detecten dos marcadors no coincidents. Aquests marcadors són D18S51 i Penta E. Per al marcador D18S51 el suposat pare és 16,18 i la filla és 12,15. Per al marcador Penta E el presumpte pare és 14,19 i la filla és 10,18. Aquestes dues incompatibilitats poden ser degudes a una mutació en aquests dos STRs. Les observacions experimentals mostren que aproximadament el 96% de les mutacions que tenen lloc als STRs tenen lloc en les cèl·lules germinals són ocasionades per la pèrdua o guany d'una sola repetició. Cal comentar que la freqüència de mutació de D18S51 és de 0,0025 i la del Penta-E és de 0,0016.

Segons la literatura específica ⁽¹⁰⁾, no s'ha de considerar la exclusió de la paternitat fins la detecció, de com a mínim, 3 marcadors inconsistents. Degut a això, s'ha procedit a l'anàlisi de 7 marcadors STRs autosòmics addicionals amb la finalitat de completar els perfils genètics i augmentar la fiabilitat dels anàlisis.

Així doncs, s'ha realitzat una amplificació per la tècnica de la PCR dels següents 7 marcadors genètics addicionals del suposat pare i la filla: D2S1338, D19S433, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 i D12S391 amb el kit PowerPlex Fussion, de Promega.

Els resultats que es van obtenir van ser els següents:

Taula 3. Resultats dels al·lels dels 7 STRs addicionals analitzats del presumpte pare i la filla.

Marcador	Al·lels pare (Ped1)		Al·lels filla		Al·lels coincidents
D2S1338	18	20	18	20	18-20
D19S433	14	16	13	16	16
D10S1248	13	14	13	13	13
D22S1045	16	17	16	18	16
D2S441	14	14	11	14	14
D1S1656	11	16	16	16	16
D12S391	23	24	23	23	23

En l'estudi d'aquests 7 marcadors STRs autosòmics addicionals no s'observen inconsistències.

Estudi estadístic:

El càlcul de l'índex de paternitat i la probabilitat de paternitat s'ha realitzat segons la base poblacional GHEP i el programa informàtic Familias versió 1.81 per a la filla 1. Familias és un programa informàtic que s'utilitza per a calcular les probabilitats de parentiu entre els individus estudiats quan hi ha exclusions.

A partir dels perfils al·lèlics de l'electroferograma obtinguts pel GeneMapper i coneixent les freqüències al·lèliques de la població de referència, es calcularà el IP i la CPI.

S'han introduït al programa Familias els al·lels de cada marcador del presumpte pare i la filla, fixant la relació mare-filla com indubtable, i aquest ha elaborat el següent informe (tots els valors elaborats pel programa Familias es poden consultar a annexos).

Prior probability: 0,5

Posterior probability: 0,973982293112035 Probabilitat de paternitat acumulada

Likelihood: 4,42677696802679E-61

Posterior ratio versus Ped2: 37,4353626668988

Likelihood ratio versus Ped2: 37,4353626668988 Probabilitat de paternitat

System:	Likelihood:	LR versus Ped2:	
D3S1358	0,009400751061	1,29065565307176	
TH01	0,017575718768	1,91864927091328	
D21S11	0,000790956775	2,21827861579414	Índex paternitat per l'al·lel
D18S51	6,1241179843787E-07	1,13770055807425E-03	
PENTAE	4,42349067377778E-08	1,74718381192382E-03	
D5S818	0,036264691	3,02114803625378	
D13S317	0,026408304702	1,62284972411555	
D7S820	0,00198919476	11,7988647828531	
D16S539	0,018289834608	0,825627476882431	
CSF1P0	0,029895619811	1,58679784195493	
PENTAD	0,00582036	1,4792899408284	

Figura 7. Part de l'informe que elabora el programa Familias

Probabilitat a priori: 0,5

Probabilitat a posteriori: 0,973982293112035

Likelihood: 4,4267769682067·10⁻⁶¹

Probabilitat de paternitat: 37,4353626668

Degut a que la probabilitat de paternitat no arriba al 99,73% (valor requerit per acceptar una paternitat) i ja que no es pot analitzar la mare biològica de la filla, s'ha procedit a la determinació de 12 marcadors STRs del cromosoma X, amb la finalitat d'augmentar la fiabilitat estadística i confirmar els resultats obtinguts (excloure o incloure el presumpte pare).

Anàlisi de STRs del cromosoma X de la filla vs presumpte pare:

Descripció de la prova: La prova de paternitat mitjançant l'anàlisi del cromosoma X realitzada a NEODIAGNOSTICA SL es base en l'anàlisi de material genètic mitjançant la tècnica de la PCR s'analitzen 12 marcadors STR (fragments curts de DNA repetits) presents en el cromosoma X.

Totes les dones tenen dos cromosomes X, procedent del pare i un altre de la mare. En canvi, els homes només en tenen un, procedent del de la mare. En aquest cas, es compararà el cromosoma X del suposat pare amb el de la filla. Per a cada marcador, l'al·lel del pare ha de coincidir amb un de la filla.

Anàlisi realitzats:

1. Amplificació per la tècnica de la PCR dels següents marcadors genètics: DXS10103, DXS8378, DXS10101, DXS10134, DXS10074, DXS7132, DXS10135, DXS7423, DXS10146, DXS10079, HPRTB, DXS10148, D21S11 i el gen de la amelogenina humana, mitjançant l'investigador Argus X-12 QS Kit (Qiagen) de les mostres 18FID0357-M1 i 18FID0357-M2.
2. Detecció dels al·lells per a les regions DXS10103, DXS8378, DXS10101, DXS10134, DXS10074, DXS7132, DXS10135, DXS7423, DXS10146, DXS10079, HPRTB, DXS10148, D21S11 i el gen de la amelogenina humana mitjançant electroforesis capil·lar en condicions desnaturalitzants, utilitzant un analitzador de fragments automàtic ABI PRISM 310.

Els resultats dels 12 STRs del cromosoma X resultants d'analitzar la mostra 18FID0357-M1 (presumpte pare) i la mostra 18FID0357-M2 (filla) són els següents:

Taula 4. Al·lells dels 12 STRs del cromosoma X analitzats del preusmpte pare i filla

Marcador	Al·lells pare	Al·lells filla		Al·lells coincidents
DXS10103	19	19	19	19

DXS8378	12		12	12	12
DXS10101	31		31	31.2	31
DXS10134	38		34	38	38
DXS10074	15		15	18	15
DXS7132	15		14	15	15
DXS10135	21		21	25	21
DXS7423	16		14	16	16
DXS10146	29		25	29	29
DXS10079	20		20	21	20
HPRTB	13		13	13	13
DXS10148	25.1		25.1	26.1	25.1
D21S11	29	32.2	32.2	33.2	-
Amelogenina	X	Y	X	X	-

Tal com s'observa en la Taula 4, no hi ha cap incompatibilitat quan s'estudia els STRs presents al cromosoma X. Així doncs, ja es pot procedir al calcul del LR.

Veredict de l'informe:

Càlcul del Índex de verisimilitud (LR) de la hipòtesis inicial H_0 enfront a la hipòtesis alternativa segons la bases de dades poblacional "Qiagen Population Data for Investigator Argus X12 Kit (2010)".

Índex de verosimilitud (LR) de la hipòtesis H_0 enfront de la H_1 : 20395 → Indica que la H_0 és 20395 vegades més probable que la Hipòtesis 1, és a dir, que la probabilitat del suposat pare biològic sigui el pare biològic de la filla 1 és 20395 contra 1.

Per a determinar el resultat estadístic final de la prova, s'ha tingut en compte l'índex de paternitat obtingut per l'anàlisi de STRs autosòmics i l'índex de verosimilitud obtingut de l'anàlisi de STRs del cromosoma X. La combinació dels dos resultats es coneix com a índex de verosimilitud combinat.

En aquest estudi l'índex de verosimilitud combinat és de 763498. Aquest resultat indica que és 763498 vegades més probable que el suposat pare biològic sigui el pare biològic de la filla, enfront que ho sigui un individu triat a l'atzar de la població de referència; el que correspon a una paternitat del 99,9999%.

6. CONCLUSIONS

Actualment els STRs són uns marcadors molt importants en el camp de la Genètica Forense, els quals gràcies a ells es poden realitzar estudis de paternitats, ja que presenten una elevada variabilitat entre els individus i tenen un elevat grau de discriminació podent-se així establir relacions de parentesc biològic.

En el cas que s'ha discutit en aquesta memòria s'ha pogut comprovar que en les proves de paternitat poden presentar-se exclusions entre els marcadors del presumpte pare biològic i el fill/a, les quals són degudes a mutacions d'aquests, pel fenomen anomenat "lliscament de la polimerasa": produint-se insercions o delecions i com a conseqüència un augment o disminució de la repetició consens en un al·lel determinat. Normalment aquestes mutacions tenen lloc en més elevada freqüència en les cèl·lules germinals dels homes que en les dones degut al nombre de divisions cel·lulars que els espermatozoides pateixen fins a arribar a l'edat adulta; no obstant, en el cas presentat la mutació de la filla 1 versus el presumpte pare venia donada per les cèl·lules de la mare, ja que la filla 2, mitjançant STRs del cromosoma X no presentava cap exclusió amb el pare, ja que les dues filles provenien de donants d'òvuls diferents.

7. ANNEXOS

Taula 5. Likelihood del Ped1 per a cada marcador i LR

Marcador	Likelihood _{Ped1}	LR _{Ped1} /LR _{Ped2}
D3S1358	0,009400751061	1,29065565307176
TH01	0,017575718768	1,91864927091328
D21S11	0,000790956775	2,21827861579414
D18S51	6,1241179843787E·10 ⁻⁷	1,13770055807425·10 ⁻³
PENTA-E	4,42349067377778·10 ⁻⁸	1,74718381192382·10 ⁻³
D5S818	0,036264691	3,02114803625378
D13S317	0,026408304702	1,62284972411555
D7S820	0,00198919476	11,7988647828531
D16S539	0,018289834608	0,825627476882431
CSF1PO	0,029895619811	1,58679784195493
PENTA-D	0,00582036	1,4792899408284
vWA	0,00111689116	4,30292598967298
D8S1179	0,00235694443	1,00725221595487
TPOX	0,02567111739	3,24674959542149
FGA	0,00158979172	1,94552529182879
D10S1248	0,026911410435	1,62284972411555
D2S1338	0,00267395523	5,36286559292917
D22S1045	0,00010314882	0,660501981505945

D19S433	0,00376471216	5,68181818181818
D2S441	0,031813315484	1,59540523292916
D1S1656	0,0008796875	4
D12S391	0,000245477898	5,35905680600214

Taula 6. Likelihoods dels STRs estudiats d'un individu escollit a l'atzar de la població de referència (Ped2).

Marcador	Likelihood_{Ped2}
D3S1358	$7,2837019220628 \cdot 10^{-3}$
TH01	$9,1604646218816E \cdot 10^{-3}$
D21S11	0,00035656331417
D18S51	$5,38289090298486 \cdot 10^{-4}$
PENTA-E	$2,53178322944 \cdot 10^{-5}$
D5S818	0,012003612721
D13S317	$1,62727973573724 \cdot 10^{-2}$
D7S820	0,00016859204649
D16S539	$2,21526476772096 \cdot 10^{-2}$
CSF1PO	$1,88402196048922 \cdot 10^{-2}$
PENTA-D	0,00393456336
vWA	0,000259565505584
D8S1179	0,002339974430104

TPOX	0,00790671304809
FGA	0,00081715294408
D10S1248	0,016582811110047
D2S1338	4,986056770704·10 ⁻⁴
D22S1045	0,00015616731348
D19S433	0,00066258934016
D2S441	1,99405861453712·10 ⁻²
D1S1656	0,000219921875
D12S391	4,58061757668·10 ⁻⁵

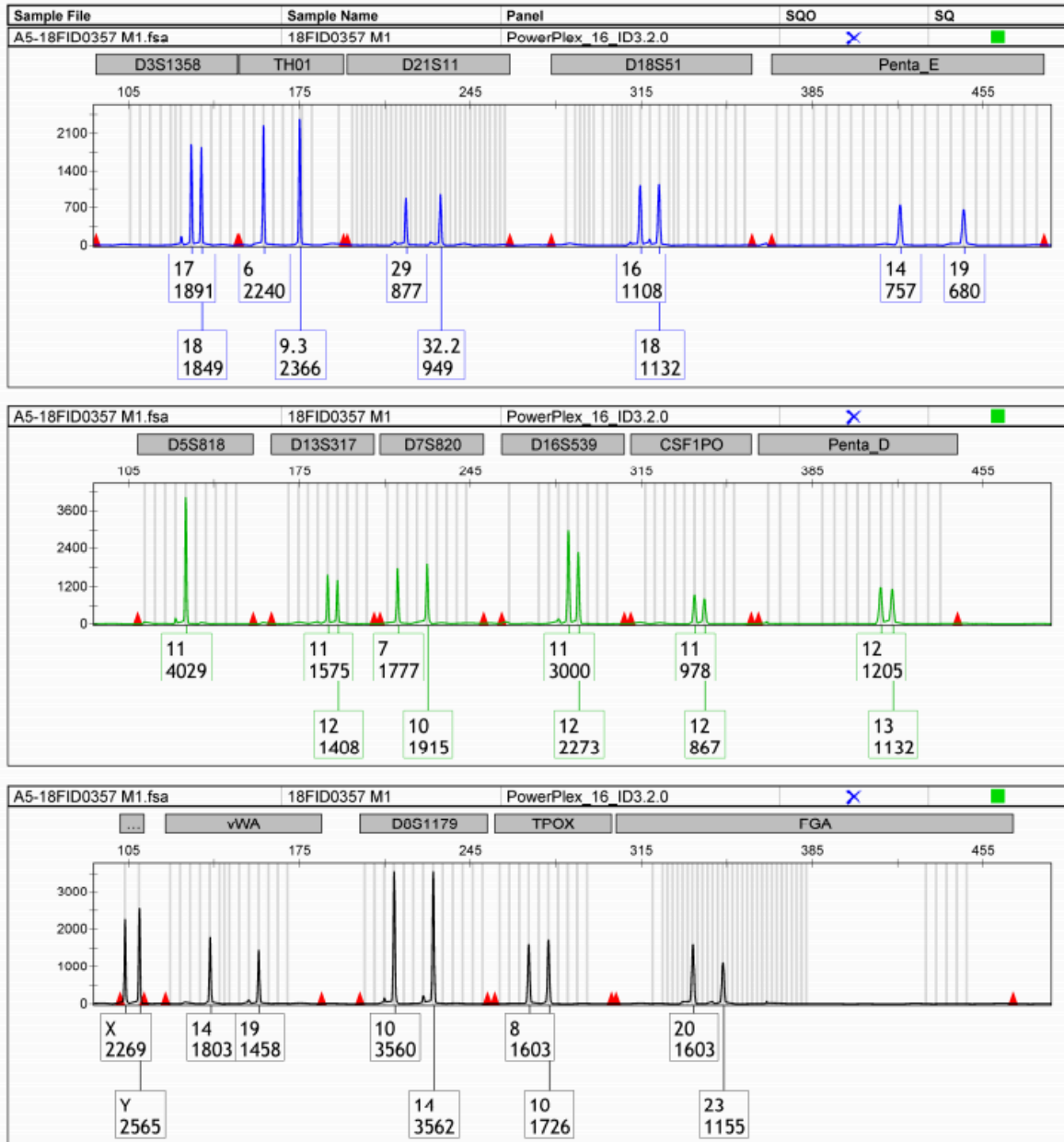


Figura 8. Electroferograma presumpte pare 16 STRs

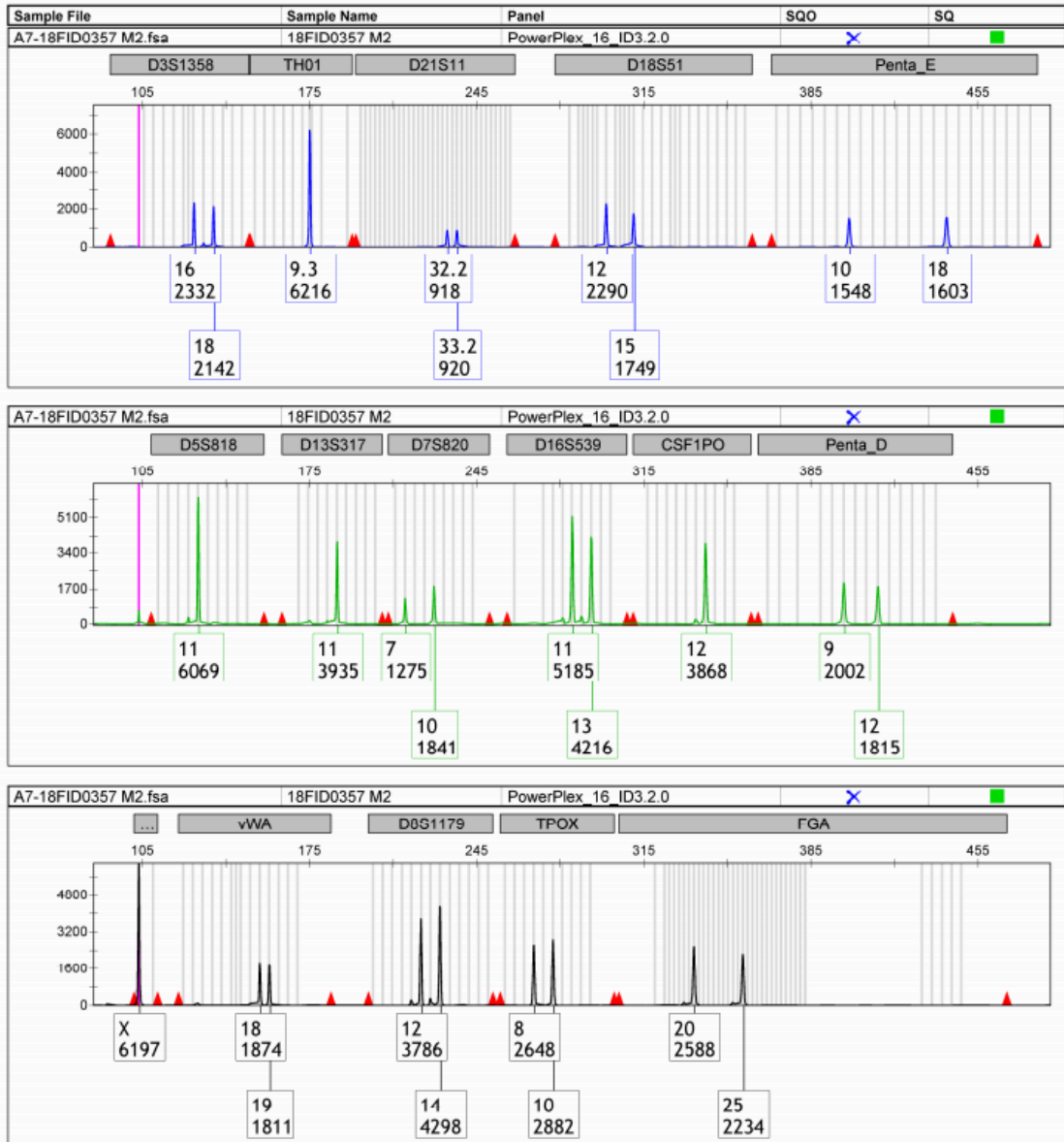


Figura 9. Electroferograma filla 16 STRs

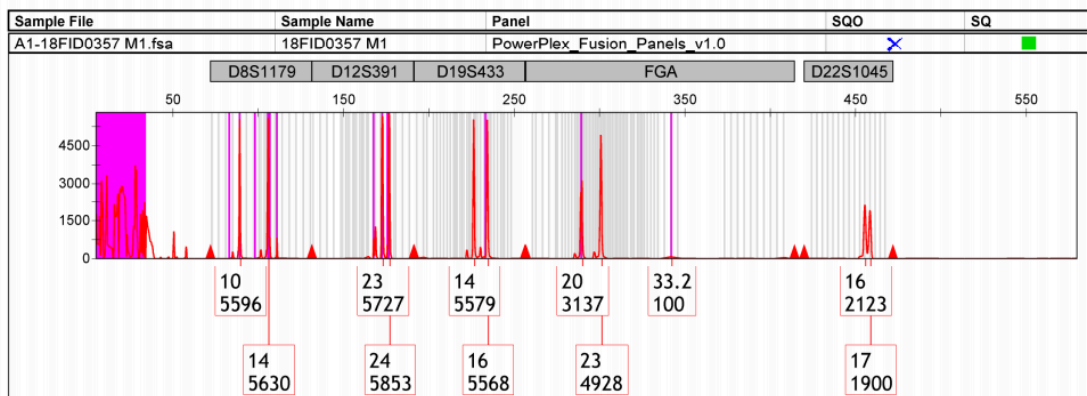
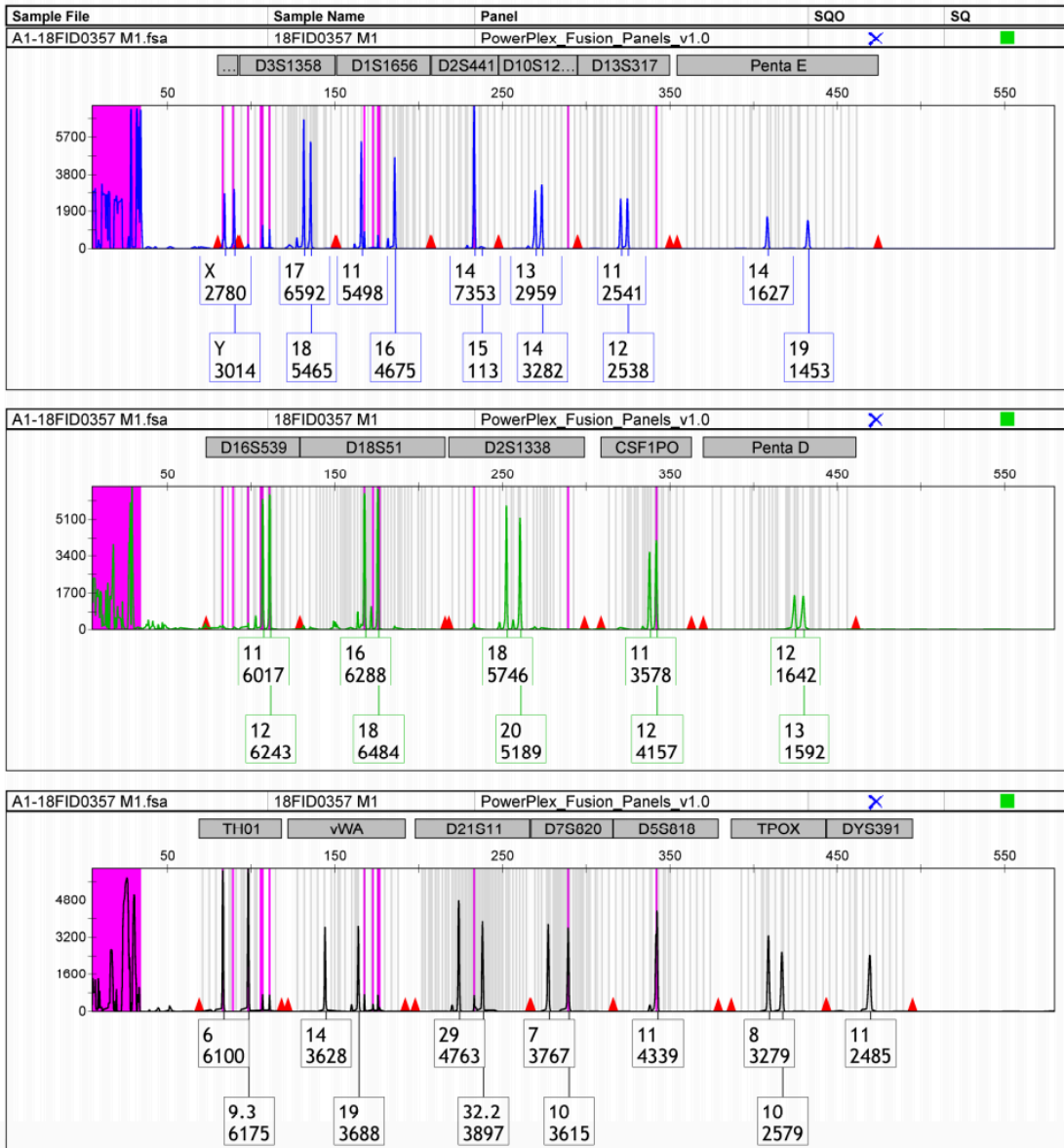


Figura 10. Electroferograma pare 7 STRs extres

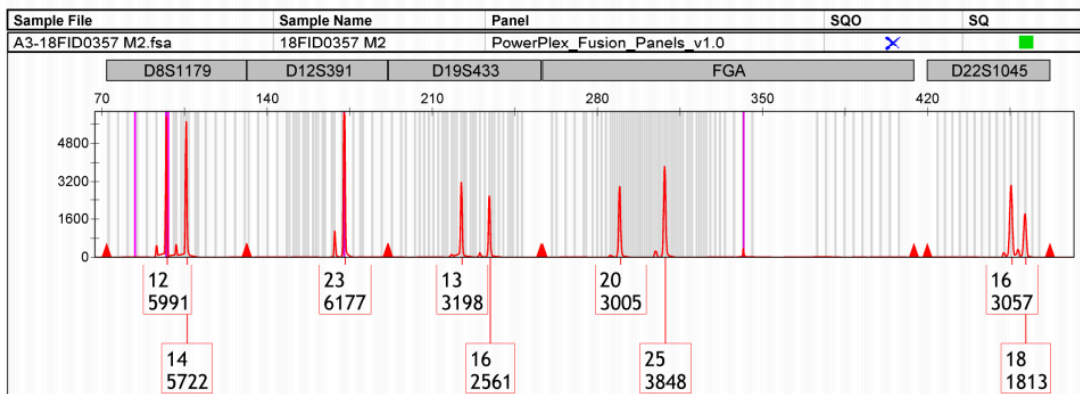
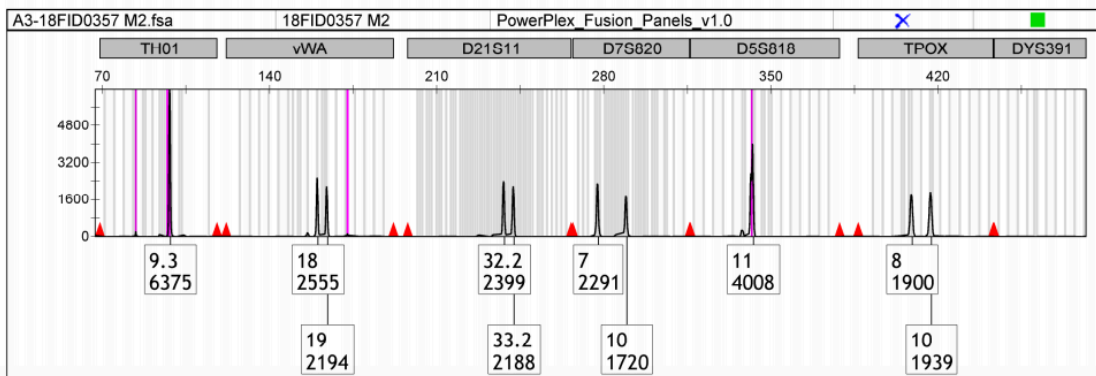
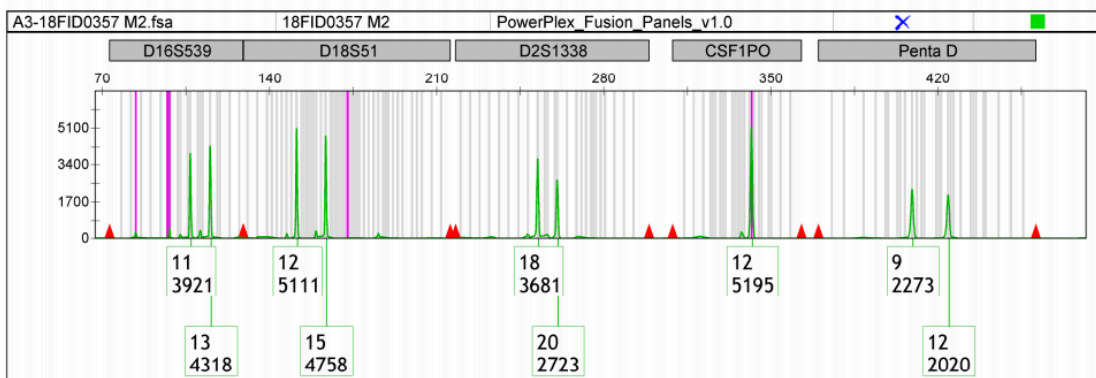
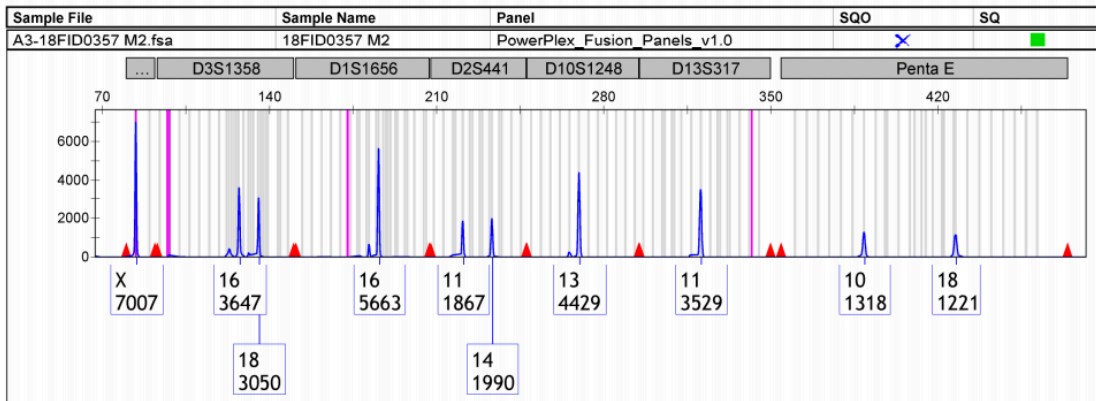


Figura 11. Electroferograma filla 7 STRs extres

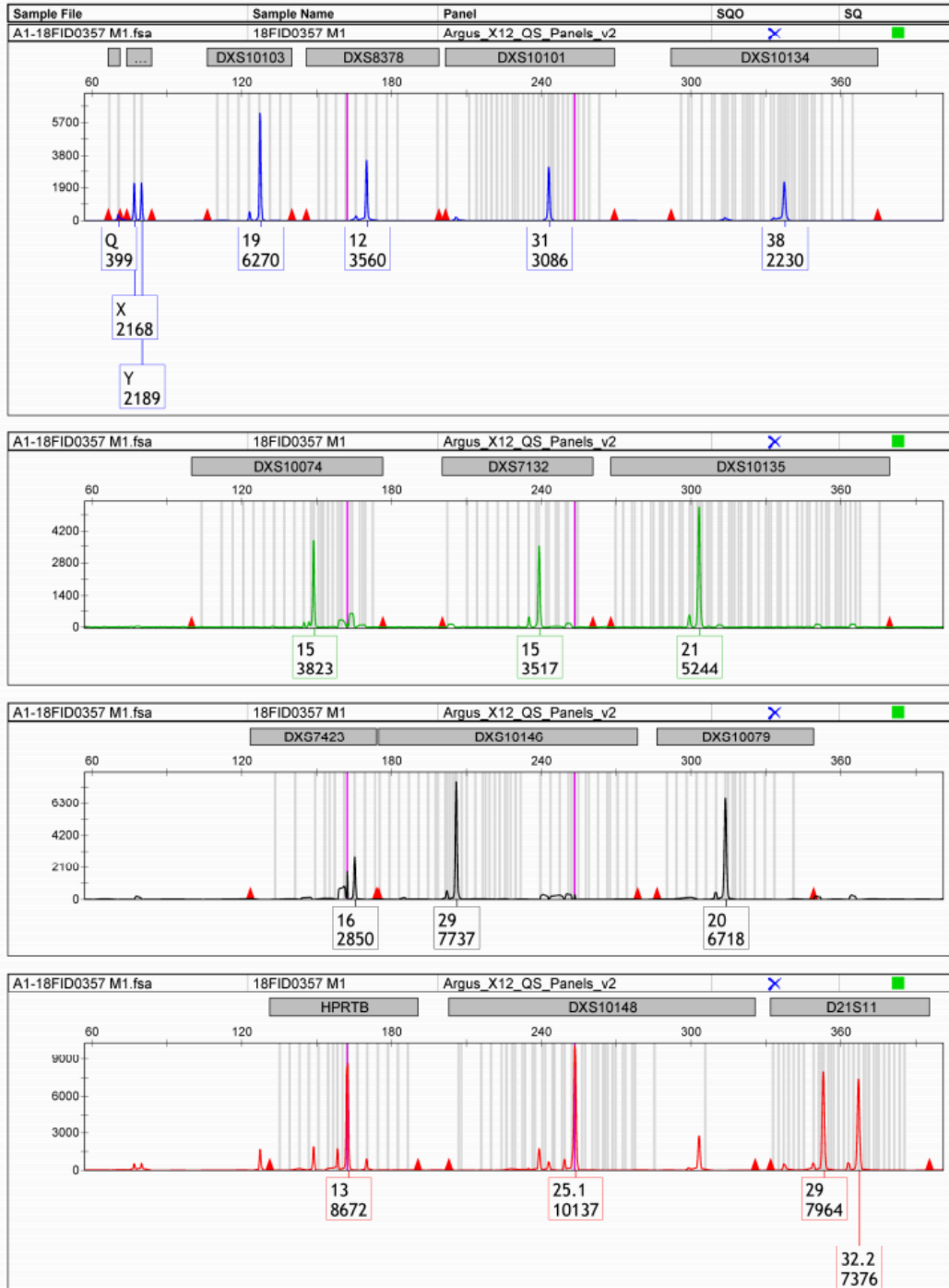


Figura 12. Electroferograma STRs Cr X presumpte pare

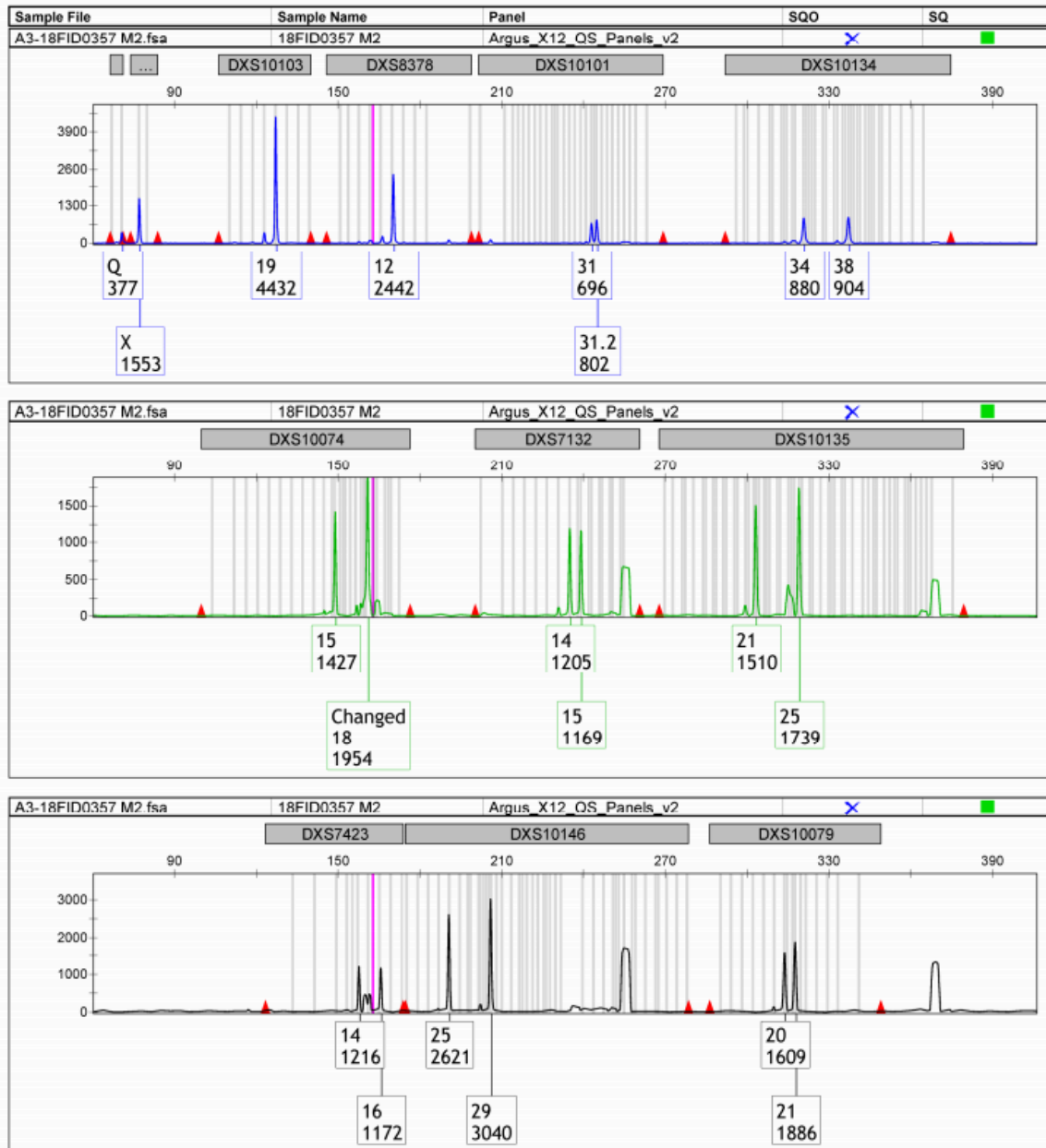


Figura 13. Electroferograma STRs Cr X filla

8. REFERÈNCIES

1. Jobling MA, Gill P. (2004) Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet.* 5(10):739-751.
2. Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* 2 ed. Massachusetts: Elsevier.
3. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* 2007; 43: Sii-Sv.
4. Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers,* (2005) 2nd edition. NewYork: Elsevier.
5. Jorquera GH, Acuña PM, Cifuentes LL. Estudios de parentesco mediante marcadores del ADN: Experiencia en resolución de casos en los últimos años. *Rev Med Chile* 2008; 136: 193-200.
6. Ensenberger, M. y Fulmer, P. (2009). *The PowerPlex® 16 HS System.* USA: Promega Corporation.
7. Applied Biosystems. (2009). *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. Applied Biosystems Chemistry Guide.* 2 ed. California: Applied Biosystems.
8. Krnajski, Z., Geering, S. y Steadman, S. (5 septiembre, 2007). Performance verification of the Maxwell 16 Instrument and DNA IQ Reference Sample Kit for automated DNA extraction of known reference samples. *Forensic Sci Med Pathol.*, 3, 264-269.
9. Butler JM, Commonly used short tandem repeat markers, *Biology of STRs: stutters products, non-template addition, microvariants, null alleles and mutation rates, Additional DNA markers: amelogenin, Y-chromosome STRs, mtDNA, SNPs, Alu repeats.* En: Butler JM (ed), *Forensic DNA typing,* Academic Press, San Diego, USA, 2001.
10. Balloch K.J.D., Marshall J., Clugston J., Gow J.W. Reporting paternity testing results when 2 exclusions are encountered (2008) *Forensic Science International: Genetics Supplement Series,* 1 (1), pp. 492-493.