

Identificació Biològica del Parentesc (IBP)

Treball de Final de Màster

Judit Mateus Porta

Màster en Genètica, Física i Química forense

Projecte realitzat a NASERTIC

Tutoritzat a NASERTIC per Paula Sánchez-Diz

Co-tutoritzat a NASERTIC per Mariola Elia

Tutoritzat a la URV per Ximena Terra Barbadora



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



Pamplona, Juliol 2018

Enamora't del procés i els resultats arribaran

AGRAÏMENTS

A Paula Sánchez-Diz, la meva guia en aquesta aventura. Gràcies per fer-me sentir com si fos a casa en un lloc una mica fred com és el *Norte*. Per la teva paciència, tant dins com fora del laboratori. Per tot el que m'has ensenyat i pel que m'has fet gaudir (tot i que musicalment, no t'he fet massa cas). Pel temps que m'has dedicat.

A Ximena Torra, per fer-me de tutora. Per tot el suport i ajuda que m'ha donat durant aquests cinc mesos. Per dedicar-me del seu temps en la correcció del treball. Pels seus consells.

A les noies del laboratori de biologia molecular: Susana, Rakel, Lara, Mariola i Lola. Per tot el que heu compartit amb mi, per la vostra comprensió tant en l'àmbit professional com personal.

A NASERTIC, per donar-me l'oportunitat d'endinsar-me en el món de la genètica forense des d'aquesta perspectiva.

A les meves companyes de pis, Bea i Lorena, i amics de Pamplona. Per tot el que hem compartit amb tan poc temps. Per ajudar-me a conèixer Pamplona des d'una altra perspectiva.

A l'Adri, en Perera, l'Alba i en Marc, per compartir les penes durant el nostre període de pràctiques realitzant els treballs. Perquè "*mal de muchos, consuelo de tontos*". Aquell sentiment de saber que no estàs sol, gràcies.

A la Gemma i l'Albert. Per demostrar que la distància no és una barrera. Per la vostra paciència en les meves mil i una trucades. Per tot el que m'heu ensenyat i m'ensenyareu.

I, sobretot, als meus pares, Joan i Dolors, que m'ho han donat tot i més. Per ajudar-me en la meva formació tant professional com personal. Per donar-me el vostre suport en totes les aventures.

GLOSSARI

Al·lel: és una forma alternativa d'un gen que es localitza en una posició específica d'un cromosoma específic. Aquest codi genètic determina les diferents característiques que s'heretaran de pares a fills.

Fenotip: conjunt de característiques o trets físics d'un organisme.

Gen: segment de DNA que conté informació per la síntesi de proteïnes

Genoma no codificant: segments del genoma que no contenen informació per la síntesi de proteïnes

Genotip: conjunt d'al·lels per un determinat gen.

Haplogrup: grup gran d'haplotips. En genètica humana, els haplogrups més estudiats són els de cromosoma Y i els de DNA mitocondrial, els quals són utilitzats per determinar i definir poblacions genètiques.

Haplotip: conjunt de variacions del DNA, o polimorfismes, que acostumen a ser heretats junts. També pot fer referència a un conjunt de SNP en un cromosoma particular que està estadísticament associat.

Heterozigot: Organisme que per un gen determinat presenta en cada cromosoma homòleg un al·lel diferent.

Homozigot: Organisme diploide que té dos al·lels idèntics en un o més *loci* genètics.

Locus: es tracta de lloc que ocupa un gen o al·lel en el cromosoma. El plural de *locus* és *loci*.

Mitocòndria: orgànul cel·lular encarregat de subministrar la major part de l'energia necessària per a l'activitat cel·lular (respiració cel·lular).

Mostra dubitada: resta biològica de procedència desconeguda, és a dir, que no es coneix a qui pertany

Mostra indubitada: també anomenada de referència. És aquella resta biològica la qual es coneix la procedència, és a dir, es coneix a qui pertany

Perfil genètic: patró de diferents STRs que ens permet diferenciar entre diferents individus.

Polimorfisme: existència dins d'una població de múltiples al·lels d'un gen. És una variació en un locus entre els individus de la població.

Seqüència de Cambridge (rCRS-revised **C**ambridge **R**eference **S**equence): seqüència de referència pel DNA mitocondrial a partir de la qual s'obtenen els diferents haplotips mitocondrials.

STR: (sigles de Short Tandem Repeat) seqüències curtes de DNA en què es repeteixen moltes vegades de forma consecutiva. Els polimorfismes de STR es deuen al fet que el nombre de còpies de la unitat de repetició és diferents dins d'una població d'individus.

SNP: (sigles de Single Nucleotid Polymorphisms) es tracta d'un simple canvi d'un nucleòtid en una seqüència del genoma que dóna lloc a diferents al·lels. Es diferencia de la mutació per la seva freqüència, és a dir, un al·lel de menor freqüència en la població té una freqüència major de l'1%. En canvi, una mutació té una freqüència en la població menor a l'1%.

RESUM

Es pot definir la genètica forense com l'aplicació de les tècniques de biologia molecular amb la finalitat d'identificar biològicament un individu d'acord amb el seu genoma. En molts casos no es té una mostra de referència de la persona a la qual es vol identificar provocant la necessitat de buscar relacions de parentiu amb altres individus (mostres indubitades).

L'objectiu destacat d'aquest treball és mostrar l'aplicació dels diferents marcadors moleculars emprats en la genètica forense amb la intenció d'identificar un individu basant-se en el genotip dels seus parents. Per tal de provar la relació entre les dues mostres, es requerirà un posterior estudi estadístic amb el propòsit de donar un resultat en base a una probabilitat.

Per mostrar tot el procediment d'anàlisi en un laboratori de genètica forense, aquest treball conté el mètode dut a terme en tres casos d'identificació a través del parentiu: (1) estudi de la paternitat, (2) estudi de memòria històrica i (3) estudi de la germanor, a partir de diferents matrius biològiques.

En el cas de l'estudi de la paternitat s'utilitzen els STR autosòmics per tal de determinar la relació de filiació entre les mostres fill i dos presumptes pares, coneixent qui és la mare biològica. Per altra banda, en el projecte de memòria històrica el que es pretén és identificar unes restes òssies a partir de diferents familiars a través dels marcadors autosòmics i de cromosoma Y. Per últim, en l'assaig de germanor, en tractar-se de dues dones, es vol realitzar una identificació biològica a partir dels STR autosòmics i els polimorfismes de DNA mitocondrial, marcador de llinatge matern.

Forensic genetics can be defined as the application of molecular biology techniques to identify an individual based on their genome. In many cases, there is no a reference sample of the person wanted to be identified, and in consequence, seeking kinship relationships with other individuals (conclusive samples) will be needed.

The main objective of this project/research is to show the application of the different molecular markers used in forensic genetics to identify an individual based on the comparison with the genotype of their relatives. In order to prove the relationship between two samples, a statistical study will be required, giving a result based on probability.

To show the entire analysis procedure carried out in a forensic genetics investigation, we show here three cases of individual identification by kinship analysis: (1) study of paternity, (2) historical memory investigation and (3) analysis of the sisterhood, from different biological sources.

In the case of paternity study, autosomal STRs are used to determine the relationship between a child and two presumed parents, knowing who his mother is. On the other hand, in the historical memory project we aim to identify remains of missing war victims based on the comparison with different relatives through the autosomal markers and the Y chromosome. Finally, in the sisterhood analysis, since they are two women, it is intended to perform a biological identification from the autosomal STR and the polymorphisms of mitochondrial DNA, a marker of maternal lineage.

ÍNDIX DE CONTINGUTS

1	Introducció.....	1
1.1	DNA: aspectes principals	1
1.2	Polimorfismes en el genoma	3
1.3	Marcadors genètics utilitzats en l'anàlisi forense	4
1.3.1	STR autosòmics.....	5
1.3.2	STR del cromosoma Y	6
1.3.3	Polimorfismes del DNA mitocondrial	8
1.4	Utilitat en la genètica forense	9
1.4.1	Investigació biològica del parentesc.....	10
1.4.2	Criminalística biològica.....	10
1.4.3	Identificació biològica.....	11
1.5	Procés d'anàlisi de mostres.....	11
1.6	Expressió de resultats	12
1.7	Avantatges i interès forense d'aquests marcadors	13
1.8	Perspectiva de futur.....	14
2	Objectius.....	15
3	Materials i mètodes.....	16
3.1	Mostres	16
3.1.1	Cas paternitat	16
3.1.2	Cas memòria històrica	16
3.1.3	Cas germandat.....	17
3.2	Extracció (Automate ®)	17
3.3	Quantificació.....	17
3.4	Estudi de STR.....	19

3.4.1	Amplificació	19
3.4.2	Anàlisi de fragments	19
3.5	Estudi de DNA mitocondrial.....	19
3.5.1	Amplificació	19
3.5.2	Seqüenciació.....	20
3.6	Anàlisi estadístic ²⁴	21
4	Resultats	22
4.1	Cas 1: Investigació biològica de la paternitat	23
4.2	Cas 2: Investigació biològica en memòria històrica.....	24
4.3	Cas 3: Investigació biològica de la germanat.....	25
5	Conclusions.....	27
6	Bibliografia.....	30

1 INTRODUCCIÓ

Es defineix genètica forense com l'ús de diferents tècniques utilitzades en la genètica per la identificació d'individus partint de l'anàlisi del seu genoma. Aquesta ciència està basada en què cada ésser humà és diferent per la qual cosa es pot crear un "codi de barres" de cada individu a través de l'estudi del DNA. Aquest tipus de perícies són totalment objectives, ja que tenen fonaments científics plenament demostrats i validats que han permès ajudar a aclarir com s'han desenvolupat uns fets o qui ha intervingut en aquests.

1.1 DNA: ASPECTES PRINCIPALS

La cèl·lula és la unitat morfològica i funcional de tot ésser viu. Dins d'aquesta es troba el DNA (*desoxiribonucleic acid*), macromolècula constituïda a partir d'àcids nucleics que conté tota la informació genètica utilitzada en el desenvolupament i funcionament de la cèl·lula. El conjunt d'aquesta informació s'anomena, en funció de la seva localització intracel·lular, **DNA nuclear** o **DNA mitocondrial**.¹

Es denomina **genoma humà** al contingut total de DNA en cada cèl·lula organitzat en 23 parells de cromosomes en el nucli. (En l'espècie humana és diploide, exceptuant les cèl·lules sexuals que són haploides i els glòbuls vermells de la sang que són anucleats). La paraula diploide fa referència al fet que cada individu presenta dues còpies del genoma en les cèl·lules gràcies a la presència de cromosomes homòlegs procedents un per via paterna i l'altre per via materna. La transmissió d'aquestes còpies es produirà a través dels gàmetes.

El genoma humà² està format per 3.000 milions de parells de bases, però això no implica que totes aquestes continguin informació genètica. És a dir, no tot el DNA conté informació que posteriorment podrà ser traduïda a una proteïna. Per tant, el genoma humà es divideix en:

- a. **DNA codificant**: conté informació en gens sobre una proteïna que realitza una funció determinada.

- b. **DNA no codificant:** és la major part del genoma i conté seqüències transcripcionalment inactives, és a dir, que no codifiquen per aminoàcids (proteïnes). Aquest tipus de seqüències poden aparèixer com DNA de còpia única o de múltiples còpies (DNA repetitiu).

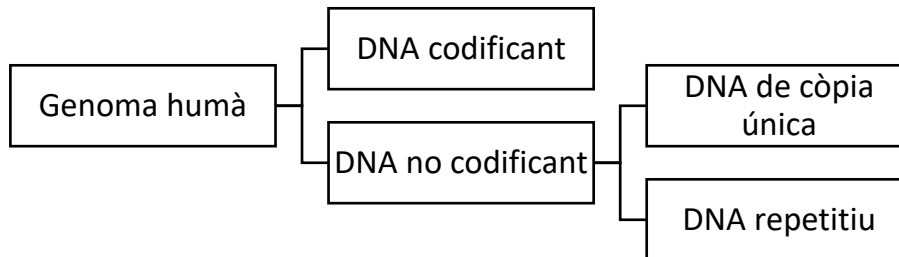


Figura 1 Esquema de les regions del genoma humà

Pel que fa al DNA codificant existeix poca variabilitat individual, donat que el marge de variació d'aquestes regions permès és molt baix, ja que si es produeix una mutació en aquest tipus de seqüència, tindrà una repercussió fenotípica com la modificació de la funció o activitat d'una proteïna implicada en un procés biològic de la cèl·lula.

Per tant, les **regions no codificants** tindran un interès forense, gràcies a la seva alta variabilitat que ens permetrà identificar individus sense obtenir informació fenotípica del donant de la mostra. L'alt nivell de polimorfisme es pot explicar gràcies al fet que és material no codificant de cap proteïna, fent que un canvi en aquesta regió no tindrà cap efecte negatiu per la cèl·lula. Per tant, no està lligat a la pressió selectiva podent suportar alts nivells de variació sense repercussió en la viabilitat de l'individu.

Així és que, els polimorfismes amb major variabilitat del genoma humà utilitzats en genètica forense per la identificació de persones es localitzen en les regions no codificants del DNA. En aquestes zones trobem **DNA de còpia única**, és a dir, seqüències que es veuen representades una o molt poques vegades en el genoma, i **DNA repetitiu**, que són aquelles amb múltiples còpies.

Les regions repetides les podem classificar en:

- **Repeticions disperses:** unitats de repetició que es troben al llarg del genoma de forma estesa. Els elements que es troben en quantitats més importants són els LINEs (*Long Interspersed Nuclear Elements*) i SINEs (*Short Interspersed Nuclear Elements*), que es diferencien en la grandària de la unitat de repetició.

- **Repeticions en tàndem:** blocs de seqüències repetides agrupades en tàndem on en funció de la mida d'aquesta unitat de repetició es poden diferenciar tres subtipus:
 - **Satèl·lit:** seqüències d'entre 5 i diversos centenars de nucleòtids que es repeteixen en tàndem milers de vegades generant regions d'unes 100 Kb fins a diverses megabases.
 - **Minisatèl·lit:** seqüència on la unitat de repetició és d'uns 6-25 nucleòtids en tàndem creant regions d'entre 100 i 20.000 parells de bases. A causa de la seva inestabilitat tenen una elevada variabilitat entre individus i són considerats polimorfismes multial·lèlics, també anomenats VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*).
 - **Microsatèl·lit:** seqüències on la unitat bàsica de repetició està formada per 2-4 nucleòtids, generant seqüències menors a 150 bases. També es consideren polimorfismes multial·lèlics, però en aquest cas s'anomenen STR (*Short Tandem Repeats*). Són aquests els que s'utilitzaran en genètica forense per identificació individual.

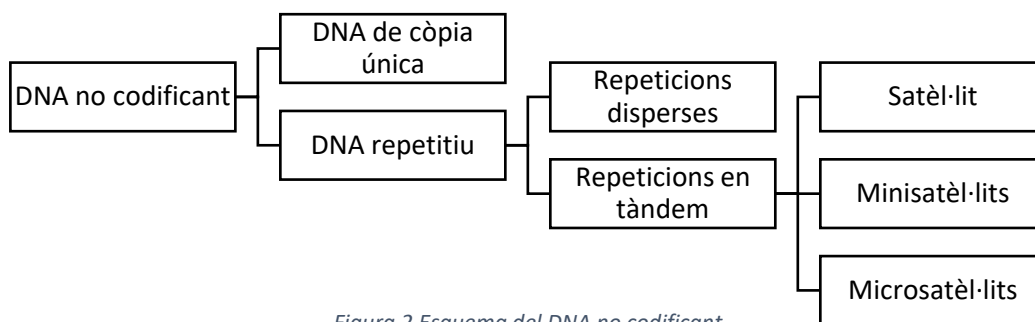


Figura 2 Esquema del DNA no codificant

1.2 POLIMORFISMES EN EL GENOMA

Avui en dia, en l'estudi de DNA en l'àmbit forense es duu a terme mitjançant l'anàlisi de les regions repetitives amb un alt nivell de polimorfisme. En general, pel que fa a un locus, es considera polimòrfic quan l'al·lel més comú d'aquest té una freqüència inferior al 99% o quan la freqüència al·lèlica menor té un valor mínim de l'1% de la població. Pel que fa a l'estudi de variacions del DNA trobarem polimorfismes de dos tipus: de seqüència i de mida.

Els **polimorfismes de seqüència** són aquells en què es produeix el canvi d'un o més nucleòtids en la seqüència de DNA. Aquests polimorfismes on solament hi ha la modificació d'un únic nucleòtid s'anomenen SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) i són els més

freqüents dins d'aquest grup causats per una mutació puntual que s'ha mantingut (**Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.**).

Els **SNP** es caracteritzen per ser els polimorfismes més abundants en el genoma humà i s'estima que hi ha un SNP cada 500-1000 nucleòtids³. A més a més, són marcadors molt estables amb taxes de mutació de l'ordre de 10^{-9} , menor que els microsatèl·lits. Un avantatge que presenta aquest tipus de polimorfisme, en comparació amb els STR, és l'anàlisi d'aquests en material genètic degradat, pel fet que s'obtidrien més bons resultats al tractar-se de l'estudi de regions molt més petites.

Per altra banda, els **polimorfismes de longitud** són aquells causats per insercions o delecions d'un o més nucleòtids. En aquest subgrup, el tipus més representatiu són els microsatèl·lits o STR. Consisteixen en repeticions de les unitats bàsiques (2-7 bp) en tàndem d'un número variable de vegades (Figura 3).

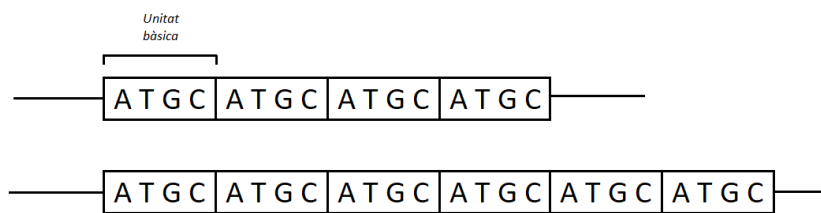


Figura 3 Polimorfisme de longitud (STR)

Els **STR** es caracteritzen per estar distribuïts al llarg de tot el genoma, tant en cromosomes autosòmics com sexuals. A més a més, presenten una taxa de mutació relativament baixa, tot i mostrar un grau de variació elevat. Una altra característica d'aquests, que els fa ser un bon polimorfisme en genètica forense, és que són marcadors que no expressen, és a dir, no donen informació codificant i/o fenotípica.

Per poder utilitzar aquests en la investigació forense es requereix un estudi previ poblacional amb la finalitat de seleccionar aquells *loci* que siguin més polimòrfics i que al mateix temps tinguin una mida mitjanament petita, per tal que en mostres degradades es puguin obtenir resultats.

1.3 MARCADORS GENÈTICS UTILITZATS EN L'ANÀLISI FORENSE

Dins d'una mateixa població hi ha un elevat nivell de diversitat genètica i cal disposar d'un mètode per tal d'identificar individus a partir d'informació genètica no codificant.

D'ençà que en 1985 Alec Jeffreys ^{4,5} va introduir el concepte d'empremta genètica, hi ha hagut una evolució contínua amb el tipus de marcadors i tecnologies que s'han utilitzat en aquesta branca. És per aquest motiu, que actualment en la genètica forense, es troben tres marcadors estrella en la individualització de mostres: (1) STR autosòmics, (2) STR del cromosoma Y i (3) DNA mitocondrial. ⁶

1.3.1 STR autosòmics

Els microsatèl·lits o STR (*Short Tandem Repeats*) es tracten de petites regions del DNA repetides en tàndem (de 100-500 nucleòtids) compost per una seqüència o unitat bàsica (de 4-5 parells de bases) un nombre de vegades que varia en funció de l'individu. A més a més, al ser regions no codificants tenen una elevada variabilitat de mida entre individus d'una població. És per aquest motiu que els **STR autosòmics** són els marcadors en el camp de la genètica forense més utilitzats per la identificació individual, ja que poden ser estudiats de forma molt senzilla.

A partir d'aquestes regions, es pot obtenir un perfil genètic on el patró d'herència d'aquest és **50% materna i 50% paterna** (Figura 4), permetent la identificació a través de familiars directes.

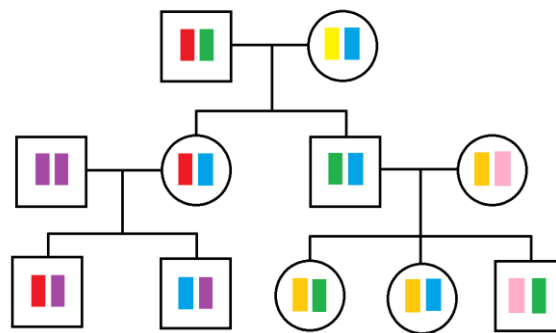


Figura 4 Patró d'herència en els STR autosòmics en tres generacions

Cada marcador o sistema STR té un nom propi que acostuma a fer referència a la seva localització dins de la molècula de DNA. Com cada individu hereta un al·lel de cada progenitor (mare i pare), podem trobar: (1) **homozigot** (mateix al·lel en un *loci*) i (2) **heterozigot** (diferents al·lels en un mateix *loci*). Finalment s'obté un electroferograma (Figura

5) on es visualitzaran diferents pics en cada zona destinada a un marcador, el que contribueix al perfil genètic de l'individu.

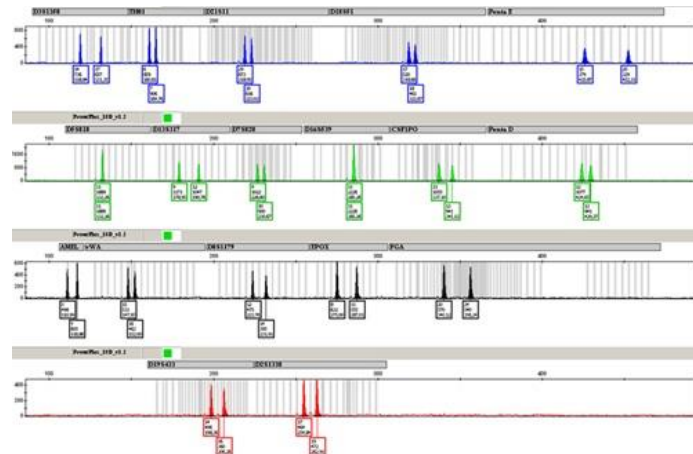


Figura 5 Electroferograma dels STR autosomals

Aquest perfil genètic està mancat de poder identificatiu fins que no és comparat amb una mostra de referència. Per tant, l'estudi d'aquestes regions no codificants aporta un "codi de barres" que permet identificar l'individu.

Un cop s'enfronten els perfils de les mostres, es determina un índex de versemblança (*Likelihood Ratio*) amb la finalitat d'excloure o incloure aquell individu com a donant d'aquella mostra.

Per poder obtenir un resultat amb suficient pes estadístic es necessita analitzar diferents marcadors d'una mostra pel fet que dues mostres diferents poden coincidir, per atzar, amb dos al·lels en un marcador. Com major sigui el nombre de marcadors analitzats, més grans són les possibilitats de distingir dues mostres sense cometre error.

1.3.2 STR del cromosoma Y

En els humans, el sexe dels individus està determinat per la presència de dos cromosomes X (sexe femení) o per la presència d'un X i d'un Y (sexe masculí). Per tant, es pot veure com en el genoma nuclear es troba un cromosoma específic dels homes (Figura 6).

Els Y-STR són repeticions en tàndem que es troben distribuïdes al llarg de les regions de no recombinació del cromosoma sexual.

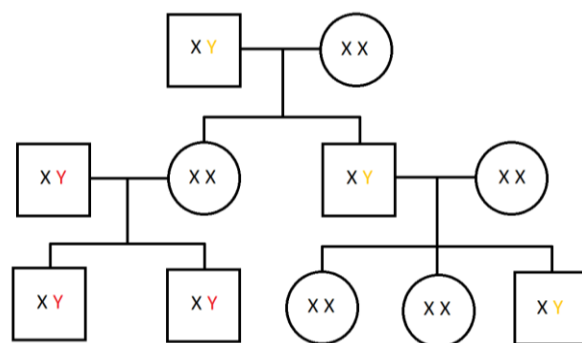


Figura 6 Patró d'herència del cromosoma Y en tres generacions

El fet que el seu patró d'herència en bloc en el **linatge patern** i la seva estabilitat al llarg de generacions permeten que aquest tipus de repeticions en tàndem del cromosoma Y s'hagin convertit en una eina important en la investigació forense on es veuen implicats individus masculins com en casos de paternitats, d'identificació de familiars o en agressions sexuals.

Pel que fa als electroferogrames (Figura 7), només es visualitza un únic pic anomenant-se així, en lloc de perfil genètic, **haplotip** ja que solament es té un únic al·lel, en la majoria dels casos (excepció **DYS485** i **DYF387S1**) provinent del pare biològic.

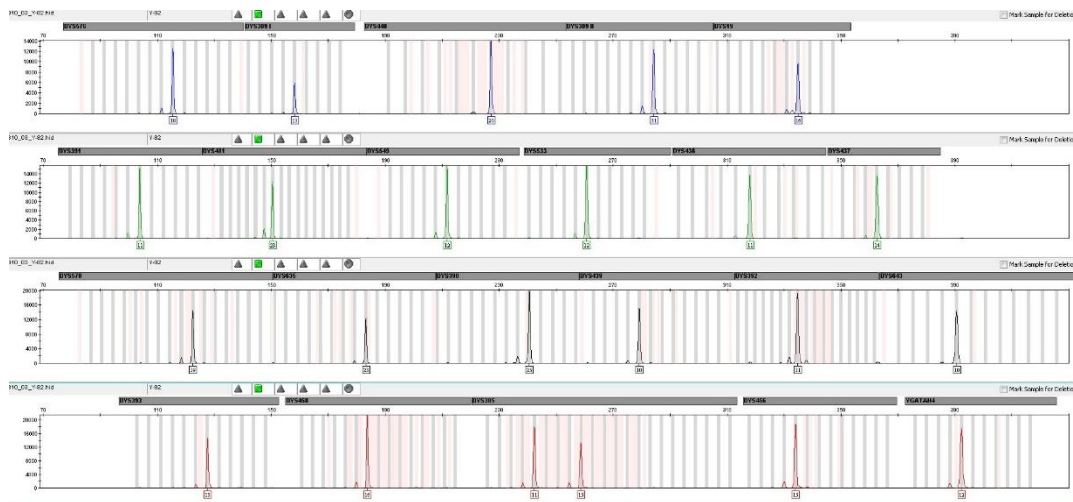


Figura 7 Electroferograma dels STR de cromosoma Y

S'ha de tenir en compte que és una eina que no permet identificar, pel fet dins d'una família tots els individus masculins emparentats per línia paterna tindran el mateix haplotip. Per altra banda, ajudarà a la identificació a partir de familiars que no siguin directes i/o ens ajudarà a l'exclusió d'individus.

En els últims anys, s'han descrit al voltant de cinquanta polimorfismes del cromosoma Y del tipus STR. Primerament, es va definir el nombre mínim de marcadors que es requeria per realitzar un haplotip mínim amb la finalitat de realitzar uns marcadors comuns en els diferents laboratoris. Posteriorment, es va crear la base de dades *Y-STR Haplotype Reference Database (YHRD)* ⁷ amb els objectius de:

- Generar estimacions fiables de les freqüències dels haplotips de cromosoma Y pel seu ús en casos de forense i de parentiu.
- Avaluació de l'estratificació de la població masculina entre les poblacions mundials reflectida en les distribucions de la freqüència dels STR i SNP de cromosoma Y.

- Subministrament de les eines avançades i recursos addicionals relacionats amb els Y-SNP i Y-STR.

Avui en dia, la YHRD és un instrument fonamental per l'anàlisi estadístic en l'estudi d'haplotips de Y-STR, tant en l'anàlisi forense com en el de poblacions.

1.3.3 Polimorfismes del DNA mitocondrial

A més a més del material genètic nuclear, les cèl·lules eucariotes també contenen mitocondries les quals emmagatzemen un genoma circular bicatenari, d'uns 16.569 parells de bases, que s'anomena **DNA mitocondrial (mtDNA)**.

Aquest genoma presenta la peculiaritat que s'hereta exclusivament per via materna, ja que les mitocondries són aportades pel citoplasma de l'òvul. Aquest DNA mitocondrial també presenta variabilitat genètica permetent ser una eina útil en l'anàlisi forense en la identificació del llinatge matern (Figura 8).

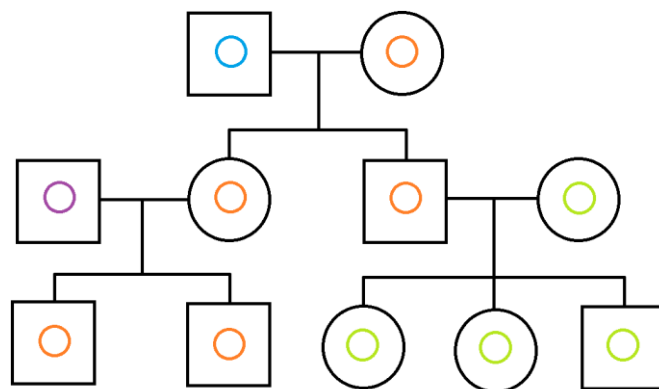


Figura 8 Patró d'herència del DNA mitocondrial en tres generacions

Un avantatge d'aquest genoma és la sensibilitat que presenta a causa del fet que el nombre de còpies d'aquest és molt superior al genoma nuclear (100-10000 còpies de DNA mitocondrial per còpia de nuclear, segons el tipus de cèl·lules) fent que en mostres degradades es pugui obtenir un millor resultat. D'altra banda, en tenir un patró d'herència per via materna, no és un marcador que ens permeti individualitzar mostres, però sí determinar relacions de parentiu més llunyanes per llinatge matern.

La regió d'estudi en l'anàlisi forense és la regió control o D-loop, regió on es troba l'inici de replicació del genoma mitocondrial i que conté les regions d'hípervariabilitat I, II i III. En lloc d'analitzar repeticions en tàndem, en aquest DNA s'estudien els polimorfismes de seqüència, que es tracten de modificacions d'una o més bases, on el que s'obtéindrà serà un haplotip. Per tant, en aquest cas estem seqüenciant una regió del genoma mitocondrial per conèixer quines han estat les bases que s'han modificat comparant-ho amb la seqüència de Referència de Cambridge (rCRS) ⁸.

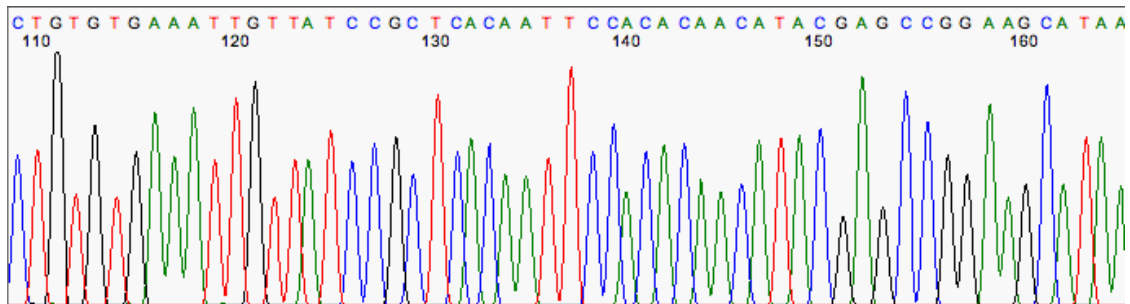


Figura 9 Resultat d'una seqüenciació

1.4 UTILITAT EN LA GENÈTICA FORENSE

La genètica forense és una subespecialitat de les ciències forenses destinada a ajudar als jutges i jurats a resoldre qüestions legals, tant en àmbits criminals com civils. Per tant, és l'aplicació pràctica de la genètica en el procés legal.

La finalitat d'aquesta ciència és la individualització biològica de cada persona basant-se en què les molècules de DNA d'un individu són úniques i es mantenen estables al llarg de la seva vida. Per tant, l'anàlisi genètic d'una mostra es basa en l'obtenció d'un codi de barres que serà atribuït a un individu de la població.

Per crear aquest codi de barres s'utilitzen els polimorfismes genètics o marcadors moleculars que són transmesos per herència mendeliana simple i ens permetran realitzar estudis amb diferents finalitats. Tot i això, les diferents aplicacions tenen un punt amb comú: necessitat d'una mostra de referència.

Un perfil genètic per si sol no té cap valor informatiu i requereix un perfil de referència, del qual es conegui la procedència, per tal de crear una relació amb la mostra problema o dubitada.

Els tipus d'anàlisi més sol·licitats en un laboratori de genètica forense pels tribunals són casos d'investigació biològica de la paternitat, perícies de criminalística biològica (estudi

de pèls, sang, esperma, mostres de contacte,...) i finalment, investigacions d'identificació.

1.4.1 Investigació biològica del parentesc

La prova de paternitat es basa en l'anàlisi del DNA per estudiar la filiació d'un suposat individu. De forma general, un individu té dos al·lells de cada marcador genètic, un provinent de la mare i l'altre del pare biològic. Per tant, es realitzarà una comparació entre els perfils genètics de les mostres per tal d'identificar el suposat pare o mare biològic.

L'estudi de marcadors genètics per la determinació de paternitats va ser iniciat per Karl Landsteiner, farà més de 100 anys, a partir de l'anàlisi del grup sanguini ABO⁹. Va ser ell mateix el que va postular la teoria de les exclusions de Landsteiner:

- **Primera norma de Landsteiner o d'exclusió directa:** Tot caràcter que tingui el fill però no el té la mare, ha de venir forçadament del pare biològic. Si el presumpte pare no el té, es produeix una exclusió de **primer ordre**.
- **Segona norma de Landsteiner o d'exclusió indirecta:** el fill i el pare són homozigots per un al·lel diferent en un mateix *locus*, es produeix una exclusió de **segon ordre**.

Si solament s'obté una única exclusió de primer ordre (primera norma) i dos de segon ordre (segona norma), s'ha de calcular l'índex de paternitat d'aquelles mostres sense tenir en compte els marcadors causants de les exclusions.

1.4.2 Criminalística biològica

S'anomena criminalística al conjunt de tècniques i procediments d'investigació amb la finalitat de descobrir, explicar i provar els delictes així com la verificació dels seus autors i víctimes.

Per tant, la genètica forense té un paper rellevant en aquesta branca de la investigació a través de mostres biològiques, ja que una de les qualitats del genoma humà és que permet individualitzar una mostra a una persona de forma específica a través de les regions d'alta variabilitat.

En aquest tipus de perícia les mostres dubitades que s'obtenen poden provenir de diferents matrius (sang, semen, cèl·lules bucals, pèls...) en distints suports amb concentracions cel·lulars variades. Cal tenir en compte que les mostres que es reben poden

tractar-se de barreges de dos o més individus, fent que la seva anàlisi sigui més complex i no sempre es puguin extreure conclusions.

Així doncs, el tipus de mostra que arriba pot ser molt variada fent que les proves que s'hagin de realitzar variïn en funció de la qualitat i quantitat de material per treballar de què es disposi.

1.4.3 Identificació biològica

Per poder realitzar una identificació d'una persona, les peces clau en aquest procés són: **mostra de referència**, tant d'un familiar directe com un objecte personal de la persona a identificar, i una **mostra problema**, la qual volem saber l'origen. Aquesta aplicació de la genètica forense és la utilitzada en la identificació de cadàvers en catàstrofes en massa o en memòria històrica.

Els ossos són una font de DNA d'elevat valor tant en l'anàlisi forense com en les investigacions antropològiques. Moltes vegades, aquests tipus de matriu ha estat exposada en condicions ambientals crítiques que ha provocat que el material genètic es trobi amb un elevat índex de degradació. És per aquest motiu que per tal de poder recopilar suficient informació per realitzar una identificació a través d'un parentesc es requereixi una anàlisi més acurada i sensible de les mostres, ja que es tracta d'un material molt susceptible a ser contaminat a causa de la baixa quantitat de DNA.

1.5 PROCÉS D'ANÀLISIS DE MOSTRES

El genoma humà es troba localitzat dins de les cèl·lules de mostres biològiques, fet que es requerirà el tractament previ per tal d'alliberar-ho al medi. Els indicis biològics que es tracten en aquests processos són classificats en:

- a. **Mostres de referència** o indubitades: restes biològiques les quals es coneix la procedència. Seria el cas de mostres de familiars d'un desaparegut on no acostuma ha haver-hi problemes en el pas d'extracció.
- b. **Mostres dubitades** o evidències: restes biològiques les quals no es coneix el donant. És a dir, no se sap qui és el contribuent principal com seria les de l'escena d'un crim o unes restes òssies sense identificar.

En aquest tipus de mostres, les matrius són molt diverses des d'hisops amb cèl·lules bucals passant per ungles fins a restes òssies i peces dentals. Això comporta que no tots els suports

tinguin la mateixa quantitat i qualitat de DNA causant que el tractament de les mostres segueixi protocols diferents.

Cal recordar que es requereix una mostra de referència per tal de poder extreure conclusions de la mostra dubitada, ja que per si sola no conté informació codificant. No és necessari que aquesta mostra de referència provingui del mateix tipus de matriu, és a dir, que es pot comparar diferents tipus de restes biològiques entre si pel fet que el DNA és igual en totes les cèl·lules de l'organisme.

No obstant això, només s'estudiaran unes regions determinades¹⁰ fent que el procediment que és dur a terme de normal en genètica forense serà:

- (1) **Extracció de DNA:** procés de separació de les molècules de DNA de les restes cel·lulars. En aquest pas és indiferent quin estudi de marcadors es realitzi posteriorment, està relacionat amb el tipus de matriu que es tingui.
- (2) **Quantificació de DNA:** determinació de la concentració de DNA que es troba en l'extracte de la mostra. Es pot realitzar de forma específica, on sol es detecta la quantitat de DNA humà que hi ha en la mostra (PCR a temps real), o inespecífica, detecció a través dels nivells d'absorbància de la mostra (espectrofotometria).
- (3) **Amplificació de DNA:** procés de còpia d'un fragment en concret del DNA que es pretén estudiar per tal d'obtenir-ne suficientment per poder detectar-ho. També s'anomena PCR (*Polymerase Chain Reaction*) i en el cas dels STR es realitza de forma simultània amb els diferents marcadors (PCR multiplex).
- (4) **Electroforesis del producte amplificat:** procés de separació dels fragments amplificats que ens permet detectar i caracteritzar els diferents marcadors estudiats en una mostra. En el cas del genoma mitocondrial, es vol detectar la seqüència dels fragments amplificats.

1.6 EXPRESSIÓ DE RESULTATS

Un cop s'ha realitzat l'estudi molecular, es duu a terme l'anàlisi estadística dels resultats, és a dir, es realitza un assaig del valor estadístic que dóna la probabilitat de trobar aquell perfil genètic en la població de referència.

Les conclusions que s'extrauran vindran condicionades per si es disposa o no de mostra de referència. En el cas que es **tingui un indicatiu de referència**, els resultats seran:

- (a) **Coincidència** (criminalística) o **compatibilitat** (parentiu): el perfil genètic que s'ha obtingut en totes dues mostres és coincident o compatible. S'haurà de realitzar una valoració estadística per tal de determinar si aquesta coincidència o compatibilitat no és deguda a l'atzar i sigui realment que l'evidència prové del donant de la mostra de referència.
- (b) **No coincidència** o **incompatibilitat**: el perfil genètic obtingut en les evidències no coincideix amb les mostres de referència (casos de criminalística). Mentre que en els casos de paternitat, el suposat pare no comparteix al·lels amb el fill. En aquests casos no serà necessari realitzar una valoració estadística, ja que l'exclusió es pot afirmar amb seguretat.

En els casos de què **no es tingui una mostra de referència** es pot realitzar el càlcul per tal de conèixer quin valor de probabilitat té aquell perfil d'aparèixer en la població de referència. El següent pas serà la introducció del genotip en una base de dades de perfils anònims obtinguts a partir d'evidències o en altres de perfils procedents de cadàvers sense identificar i de familiars de desapareguts.

1.7 AVANTATGES I INTERÈS FORENSE D'AQUESTS MARCADORS

El genoma humà té el **principi bàsic d'universalitat**, és a dir, independentment del teixit que s'extregui el DNA d'un individu, el perfil genètic que s'obté serà el mateix. Això és un avantatge a l'anàlisi comparatiu entre mostres dubitades i indubitades, ja que si s'obté el mateix perfil genètic, voldrà dir que prové de la mateixa persona.

Un dels punts claus de l'estudi d'aquests marcadors del genoma és el poder de discriminació individual que permet obtenint valors de LR en què la freqüència d'aparició d'aquest perfil en la població és tan baixa que fa teòricament impossible l'existència d'un altre individu, no relacionat genèticament, amb el mateix perfil de DNA.

A més a més, en el cas dels **STR autosòmics** ⁶, al tractar-se d'una herència 50/50, es tracta d'una eina molt potent per poder realitzar anàlisis de parentius, tant ascendents com descendents directes. Això aporta un poder d'exclusió, a priori, superior al 99.99%.

D'altra banda, tant l'anàlisi del cromosoma Y com el DNA mitocondrial es veu limitada en funció del que es vulgui estudiar i quines mostres es tinguin. Tot i això, un estudi conjunt amb els STR autosòmics augmenta el paràmetre estadístic de forma significativa. Tanmateix, és una eina molt utilitzada en l'estudi de poblacions.

Els **STR de cromosoma Y** serà un polimorfisme útil en casos de:

- (a) Casos de paternitat, on no es tingui material biològic de la mare o no existeix presumpte pare però si familiars més llunyans d'aquest individu per via paterna.
- (b) Casos de barreges, com passaria en agressions sexuals en què hi ha una mescla entre la víctima i l'agressor on es pot determinar l'haplotip de cromosoma Y d'aquest últim. També pot servir per conèixer el nombre de barons implicats en una barreja.

En el cas dels **polimorfismes del DNA mitocondrial**, poden ser útils on les mostres tinguin un alt nivell de degradació. El mtDNA ens servirà en aquests casos pel fet que la quantitat de mitocondries en les cèl·lules és major i, per tant, es té un nombre més elevat de còpies d'aquest tipus de DNA que del nuclear. A més a més, també pot ser útil, en l'establiment de relacions familiars comparant-ho amb mostres amb relacions més llunyanes i no directes per via materna.

En els casos de barreges, l'ús d'una combinació d'aquest tipus de marcadors pot ajudar en la determinació de quants individus es troben i ajudar a extreure conclusions més acurades. Així doncs, en l'estudi genètic no es realitza l'anàlisi d'un únic tipus de marcadors, sinó que dependrà del tipus de mostra que es tingui i quines qüestions/hipòtesis es plantegin.

1.8 PERSPECTIVA DE FUTUR

Un dels principals reptes de futur en la genètica forense és solucionar els problemes que troben els analistes quan tracten amb mostres amb un baix nivell de qualitat, fent que les tècniques convencionals no siguin suficients per extreure bons resultats.

D'una banda, la investigació de nous polimorfismes de longitud (STR) on hi hagi una elevada variabilitat però en segments del genoma més petits per tal que no falli en aquelles mostres on el nivell de degradació és elevat. D'altra banda, amb perspectiva de futur i que no es troba tan llunyana, és l'ús de polimorfismes de seqüència, principalment SNP¹¹, amb la finalitat de poder extreure més informació d'aquest tipus de mostres compromeses.

A part de tenir un poder identificatiu els SNP autosòmics, els SNP de cromosoma Y i de mtDNA també permetran un estudi més acurat de llinatges paterns i materns,

respectivament, per tal de traçar l'origen geogràfic de les persones així i fins i tot obtenir dades dels trets físics a partir d'una mostra biològica. ¹¹

Avui en dia no interessa analitzar tot el genoma humà per realitzar una identificació, ja que, a més a més del temps i els costos que es requereixen, bona part de la molècula de DNA és comú en tots els humans i no permetria distingir entre aquests. Tot i això, la constant evolució de les tècniques de seqüenciació massiva⁴ està fent que ja no es tracti de ciència-ficció. És a dir, l'optimització respecte a temps d'anàlisi i abaratiment dels costos d'aquestes tècniques està fent que ja es comencin a plantejar la seqüenciació a gran escala de cromosomes sencers o de tot el genoma aplicat en les ciències forenses.

2 OBJECTIUS

Els polimorfismes que es troben en el genoma són una de les peces claus en la genètica forense on s'utilitzen els STRs o els SNP, en funció de les característiques del cas en qüestió. L'anàlisi dels STR autosòmics és l'estratègia que s'utilitza predominantment en la majoria de casos, però dependrà de la qualitat, quantitat i tipus de mostra la que determinarà els estudis complementaris com serien els STR de cromosoma Y o SNP del genoma mitocondrial.

Per tant, tenint en compte aquest context, l'objectiu principal d'aquest treball consisteix a mostrar les diferents aplicacions dels polimorfismes no codificants que es troben en el genoma humà destinat a la identificació biològica d'individus en estudis forenses a partir de familiars en casos reals.

- (1) Mostrar l'aplicació dels STR autosòmics per la identificació d'individus a través de familiars directes.
- (2) Presentar l'aplicació dels STR de cromosoma Y per la identificació d'individus utilitzant familiars per via paterna i exposar el rendiment que se'n pot extreure del marcador de llinatge patern (no identificatiu).
- (3) Mostrar la utilitat i rendiment que es pot obtenir dels polimorfismes no codificants del genoma mitocondrial, com a marcador del llinatge matern, en casos d'identificació biològica d'un individu a través de parentiu per via materna.

- (4) Desenvolupar coneixements en la valoració estadística dels resultats en els casos que s'ha d'analitzar perfils de STR autosòmics.
- (5) Desenvolupar l'anàlisi estadística dels resultats obtinguts en l'estudi dels marcadors haplotípics dels Y-STR i dels polimorfismes de DNA mitocondrial. A més a més, aplicar les bases de dades poblacionals d'utilitat forense per l'anàlisi dels resultats.

3 MATERIALS I MÈTODES

3.1 MOSTRES

Totes les mostres implicades en l'estudi han estat obtingudes sota el consentiment informat corresponent seguint el protocol de la *Llei d'Investigació Biomèdica, article 2*.¹²

3.1.1 Cas paternitat

En aquest estudi, s'han analitzat un total de 4 mostres procedent d'epiteli bucal recol·lectades a través de l'ús d'hisops¹³, amb les següents referències: A (presumpte pare 1), B (presumpte pare 2), C (mare) i D (fill). Les mostres van estar proporcionades per un jutjat de Navarra.

3.1.2 Cas memòria històrica

Les mostres utilitzades en aquest estudi es divideixen en dos grups: restes procedents de desapareguts (dubitats) enterrats en fosses comuns pròximes a Pamplona (Navarra) i hisops bucal de familiars vius (indubitades).

Les matrius utilitzades en aquests tipus de casos són tant restes òssies com peces dentals¹⁴ per les mostres procedents de dubitats. En aquestes mostres, les condicions ambientals en què s'han trobat han afectat en la qualitat del material causant problemes en el moment d'obtenir material genètic, i per tant, perfils. Per altra banda en les mostres dels familiars (indubitats), les matrius amb les quals s'ha treballat han estat hisops amb cèl·lules de l'epiteli bucal¹³.

Les mostres dubitades estudiades tenien les següents referències: Individu M, Individu N, Individu O, Individu P i Individu Z. Juntament amb aquestes, es tenen mostres dels presumptes familiars amb referència: I, J i K.

3.1.3 Cas germandat

En aquest tercer cas, s'han analitzat un total de dues mostres corresponents a l'individu R i l'individu Q. La mostra R correspon a una mostra de sang de la víctima en una en targeta FTA, mentre que la Q es tracta d'un hisop amb epitel·li bucal procedent d'una possible germana, proporcionades per un jutjat de Navarra.

3.2 EXTRACCIÓ (AUTOMATE[®])

El DNA ha estat extret utilitzant el kit comercial PrepFiler *Express*TM Forensic DNA Extraction (Thermo Fisher Scientific)¹⁵ pels diferents tipus de matrius (sang, cèl·lules bucal, restes cadavèrics). Posteriorment, s'introdueixen els lisats cel·lulars a l'aparell AutoMate *Express*TM Forensic DNA Extraction System, seguint les instruccions del fabricant (Thermo Fisher Scientific, MA USA).¹³

Aquest kit comercial s'ha desenvolupat amb la finalitat d'automatitzar el procés d'extracció de DNA des de diferents mostres de tipus forense basat en un sistema de boles magnètiques on romanen unides les molècules de DNA que s'ha alliberat gràcies al tampó de lisi. Seguidament es realitzen uns rentats a partir d'etanol a diferents concentracions. Finalment, s'obté el DNA de la mostra determinada en un volum final de 50 µL.

3.3 QUANTIFICACIÓ

El procés de determinació la concentració de DNA en els extractes es realitza a través de PCR a temps real, on es basa en la detecció de la fluorescència del producte amplificat a cada cicle de PCR. Els resultats s'observen en una corba d'amplificació on es poden diferenciar tres fases: (i) fase "lag", (ii) fase exponencial i (iii) fase "plateau" (Figura 10).

A partir d'aquesta fase exponencial, es podrà determinar la concentració que es troben en els diferents extractes. Per cada corba d'amplificació, s'ha de definir un **cicle llindar** (C_T)¹⁶ que és el nombre de cicles en què la corba sobrepassa el llindar de fluorescència. Un C_T baix indica una major concentració de DNA en l'extracte inicial. En canvi, que un

C_T alt indica un major nombre de cicles per arribar al llindar de fluorescència, i per tant, una menor concentració inicial de DNA.

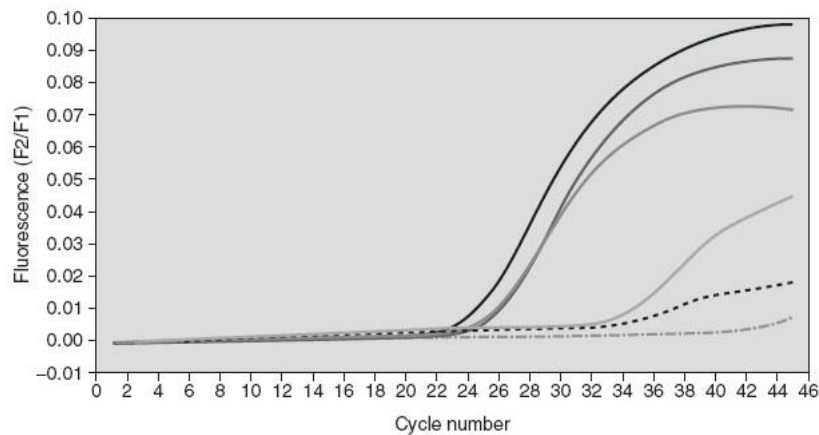


Figura 10 Cinètica d'amplificació de la PCR a temps real

Per determinar de forma quantitativa la concentració de DNA que es troba en els extractes es requerirà realitzar una interpolació amb la corba d'estàndards de diferents concentracions conegudes.

El kit comercial utilitzat per quantificar és el Quantifiler™ Trio DNA Quantification (Thermo Fisher Scientific) ¹⁷, que a més a més de determinar la quantitat de DNA en les mostres també dona una idea de la qualitat, en termes de degradació, a través de l'amplificació de tres regions del genoma: fragment llarg, fragment curt i presència de cromosoma Y. ¹⁸

Pel que fa a les mostres indubitades no es requereix la quantificació a través de PCR a temps real. En el cas de mostres en hisop es realitza una dilució de 2 µL d'extracte en un volum final de 200 µL, mentre que en el cas de targeta FTA 4 µL d'extracte en un volum final de 100 µL. Mentre que pel que fa amb les mostres dubitades o les que es troben en males condicions, com les restes òssies, es requerirà la quantificació amb l'aparell 7500 Real Time PCR Cycle (Thermo Fisher Scientific) ¹⁹

El procés de PCR (*polimerse chain reaction*) s'ha de dur a terme utilitzant un rang de concentració de DNA genòmic entre 0,05 a 0,250 ng/µL (òptima: 0,2 ng/µL) amb un volum final de reacció de 12,5 µL.

3.4 ESTUDI DE STR

3.4.1 Amplificació

Per l'amplificació dels **STR autosòmics**, s'ha utilitzat el sistema múltiplex GlobalFiler²⁰ seguint les instruccions del fabricant (Thermo Fisher Scientific, MA USA). Aquest kit, a més a més de tenir tres marcadors per la determinació del sexe (amelogenina, DY391 i Yindel), compren els següents 21 sistemes distribuïts en cinc colors: D31358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S3931 i D2S1338.

En el cas d'amplificació dels **Y-STR**, s'ha utilitzat el sistema múltiplex Y-Filer Plus²¹, seguint les instruccions del fabricant (Thermo Fisher Scientific, MA USA). Aquest kit està format per 25 marcadors del cromosoma Y distribuïts en cinc colors: DYS576, DYS389I, DYS635, DYS389II, DYS627, DYS460, DYS458, DYS19, YGATAH4, DYS448, DYS391, DYS456, DYS390, DYS438, DYS392, DYS518, DYS570, DYS437, DYS385, DYS449, DYS393, DYS439, DYS481, DYS387S1 i DYS533.

El pas de l'amplificació, tant STRs autosòmics com del cromosoma Y, el termo-ciclador utilitzat ha estat un Veriti 96 Thermal Cycle Well (Thermo Fisher Scientific).^{18,21,22}

3.4.2 Anàlisi de fragments

Els productes de PCR han estat analitzats per electroforesis capil·lar utilitzant un ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) amb el polímer desnaturalitzant POP4. El software utilitzat ha estat el GeneMapper ID-X Version 1.4 on hi ha designat els pics dels electroferogrames per la seva mida en funció de l'estàndard intern GS600LIZ. El número de l'al·lel s'atorga a través de la comparació de la mida proporcionada per l'estàndard intern mitjançant l'*allelic ladder*.¹⁸

3.5 ESTUDI DE DNA MITOCONDRIAL

3.5.1 Amplificació

En el cas de les presumptes germanes, s'ha requerit l'anàlisi de les posicions polimòrfiques (SNPs) de la regió control del **DNA mitocondrial**²³. Aquesta regió control o *loop D* es tracta d'un segment d'unes 1122 bp del DNA mitocondrial on el nivell de variabilitat és molt elevat fent que sigui la regió diana. El segment està format per tres regions

híper-variables: HVI (16024-16365), HVII (73-340) i HVIII (438-574), els quals seran comparats a la seqüència de referència de Cambridge (rCRS)⁸ per tal de determinar l'haplotip mitocondrial.

L'anàlisi d'aquestes mostres es realitza un cop estan normalitzades, és a dir, que tenen una concentració similar als 0,2 ng/μL. En aquells extractes que es trobin per sota d'aquesta concentració, es realitza directament del estoc del DNA. De forma general, els primers utilitzats per l'amplificació dels dos fragments són:

- 15997L i 017H que inclou la regió HVI
- 16555L i 649H que inclou les regions HVII i HVIII

Taula 1 Primers utilitzats en l'anàlisi de DNA mitocondrial

Primer	Seqüència 5'-3'
15997L	CACCATTAGCACCCAAAGCT
017H	CCCGTGAGTGGTTAATAGGGT
16555L	CCCACACGTTCCCTTAAAT
649H	TTTGTATTGGGGTGATGTGA

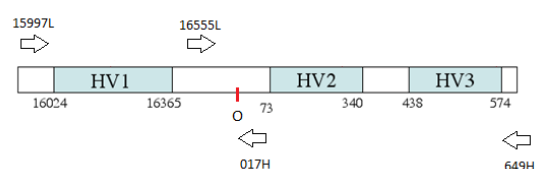


Figura 11 Regió control amb els primers utilitzats

En mostres com pèls o DNA parcialment degradat es realitza una amplificació amb fragments petits (4 primers per regió d'hípervariabilitat) amb l'objectiu d'amplificar la mateixa regió a partir de fragments més petits.

El pas de l'amplificació, el termo-ciclador utilitat ha estat un Veriti 96 Thermal Cycle Well (Thermo Fisher Scientific).^{18,21-23}

3.5.2 Seqüenciació

En el cas de DNA mitocondrial, un cop s'obté la regió que es vol realitzar la seqüenciació, es procedeix amb una purificació de les restes de la primera PCR amb l'ExoSAP-ITTM (Thermo Fisher Scientific, MA USA). Un cop es tenen sol les regions, es realitza una seqüenciació basada amb el mètode de Sanger a partir del kit comercial BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing seguint les instruccions del fabricant (Thermo Fisher Scientific, MA USA). Per últim, es realitza una purificació amb Etanol/EDTA/Acetatsòdic, amb la finalitat d'eliminar les restes de nucleòtids terminadors (ddNTPs).²³

Els polimorfismes mitocondrials han estat analitzats per electroforesis capil·lar utilitzat un ABI PRISM[®] 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) amb el polímer

desnaturalitzant POP4. El programa utilitzat per l'anàlisi d'aquest tipus de resultats és el SeqScape Version 2.5 (Thermo Fisher Scientific, MA USA).

3.6 ANÀLISIS ESTADÍSTIC ²⁴

Per últim, es requerirà realitzar un estudi estadístic amb la finalitat de donar unes conclusions en funció de probabilitats determinades per les hipòtesis que es plantegin des de l'inici de l'anàlisi.

A partir del teorema de Bayes es pot calcular el **coeficient de versemblança** o "*Likelihood ratio*" (LR), on s'expressa la probabilitat del succés suposant la hipòtesi 1 al davant la probabilitat del succés suposant la hipòtesi 2. Aquestes hipòtesis o successos han de ser independents entre si.

$$LR = \frac{P(H_1|E)}{P(H_2|E)} = \frac{\left(\frac{P(E|H_1) \cdot P(H_1)}{P(E)}\right)}{\left(\frac{P(E|H_2) \cdot P(H_2)}{P(E)}\right)} = \frac{P(E|H_1) \cdot P(H_1)}{P(E|H_2) \cdot P(H_2)}$$

Aquests supòsits es desenvolupen des de l'inici, on es té la **hipòtesi nul·la** (H_1) i la hipòtesi contrària a aquesta anomenada **alternativa** (H_2), on partir d'aquestes afirmacions plantejades s'obtenen conclusions.

En els casos de parentiu, el coeficient de versemblança se sol anomenar Índex de paternitat, germanor, ... Però en general, s'acostuma a designar **Índex de Parentiu** (IP). A partir d'aquest es podrà determinar la **probabilitat de parentiu** (W).

Taula 2 Hipòtesis plantejades en casos de IP

Hipòtesi nul·la (H_1)	La probabilitat de què el material genètic present en la mostra provingui de dos individus relacionats genèticament dins de la població de referència
Hipòtesi alternativa (H_2)	La probabilitat de què el material genètic present en la mostra sigui d'un altre individu es calcula com la probabilitat de trobar aquest perfil en un individu agafat a l'atzar de la població de referència

En aquest tipus de casos, hi ha un consens en determinar una **probabilitat a priori de 0.5**, on es considera que la persona implicada en el cas té la mateixa probabilitat d'estar relacionat genèticament amb la persona "problema" com que no ho estigui. Per tant, el valor del IP expressa quantes vegades és més probable la relació descrita (paternitat, maternitat, germanat, ...) en funció del material present en l'evidència E en respecte a

la hipòtesi alternativa, on la relació està establida amb un altre individu a l'atzar de la població de referència.

Els valors de les freqüències al·lèliques utilitzats en el present estudi per al càlcul del IP dels perfils genètics (**STR autosòmics**) trobats corresponen a la població espanyola de les freqüències al·lèliques publicades per *García O. et al.* ²⁵⁻³⁰, base de dades aconsellada per la CNUFADN ³¹. En el càlcul estadístic, s'ha suposat que la població de referència utilitzada es troba en equilibri Hardy-Weinberg. ³²

Pel que fa al càlcul estadístic de l'haplotip del **DNA mitocondrial**, correspon al proporcionat per la base de dades de l'EMPOP la versió 3, release 11 ³³. Com es tracta d'un marcador haploide, igual que el cromosoma Y, el càlcul del IP serà diferent dels STRs autosòmics. Per fer-ho, es busca en la base de dades la freqüència d'aquell haplotip en la població, podent realitzar el càlcul del LR.

Com la probabilitat de què es doni la hipòtesi 1 és del 100%, ja que aquest haplotip ha aparegut en l'anàlisi, i la probabilitat de què es doni la hipòtesi alternativa serà la freqüència d'aquest en la població, la fórmula queda simplificada a:

$$LR_{\text{haplotip}} = \frac{P(H_1|\text{haplotip})}{P(H_2|\text{haplotip})} = \frac{1}{f(\text{haplotip})}$$

En el cas de **cromosoma Y**, l'anàlisi estadístic es realitza a través de les freqüències poblacionals europees (*Western-European*) obtingudes a través de la base de dades YHRD ⁷, release 56. Un cop s'entra l'haplotip en la base de dades, s'obté la freqüència d'aquest dins de la població de referència (en aquest cas l'europea) a partir del qual es realitza el càlcul del LR utilitzant la mateixa fórmula que en el mitocondrial.

Els softwares seleccionats per realitzar l'anàlisi estadística han estat el *Genética Forense Final 3.0.01* (GFF)³⁴ on per avaluar el pes de l'anàlisi dels STRs utilitzen el càlcul del *likelihood ratio* (LR).

4 RESULTATS

En un laboratori de genètica forense, alguns dels casos més habituals que s'acostumen a treballar són les identificacions biològiques a través del parentesc a partir de la

determinació de STR autosòmics o del cromosoma Y com dels polimorfismes del mtDNA. A continuació, es presenten els resultats de tres casos analitzats en el laboratori NASERTIC durant els mesos d'abril a juliol del 2018.

4.1 CAS 1: INVESTIGACIÓ BIOLÒGICA DE LA PATERNITAT

Per ordre d'un jutjat de Navarra es pretén realitzar una prova de paternitat. Les mostres indubitades de les que: Individu A - presumpte pare 1, Individu B- presumpte pare 2, Individu C - mare indubitada i Individu D - fill indubitat. La finalitat d'aquest assaig serà identificar el pare biològic de l'individu D, fill de l'individu C.

Les mostres es tractaven d'hisops buccals els quals se'ls va procedir a realitzar l'anàlisi dels STR autosòmics. Els resultats es troben en la Taula 3 de l'annex.

Així doncs, en aquest estudi es requerirà la formulació de quatre hipòtesis diferents en funció del presumpte pare que s'estigui estudiant i, per tant, un càlcul d'índex de paternitat per cadascuna de les mostres.

Càlcul pel presumpte pare 1

H1	El donant de la mostra A i la mostra C són els pares del donants de la mostra D.
H2	La donant de la mostra C és la mare del donant de la mostra D, mentre que el donant de la mostra A no està relacionat genèticament amb aquests.

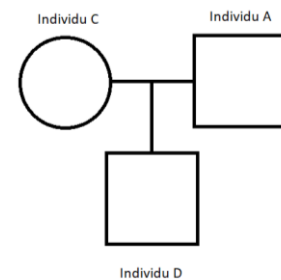


Figura 12 Arbre genealògic del cas de paternitat amb el presumpte pare A

El següent pas és el càlcul de l'índex de paternitat que basant-se als marcadors de STR autosòmics, presumpte pare número 1 ha evidenciat un perfil genètic **compatible** amb la mostra indubitada del fill. És a dir, no es pot excloure que el subjecte A sigui el pare biològic, assumint que la mare i el nen estan relacionats genèticament. (Taula 3)

En aquest cas, l'índex de paternitat obtingut presenta un valor de 639.794.298.631, fet que ens estableix la probabilitat de què l'**individu A** presenti una relació de filiació amb el nen. En termes de probabilitat de paternitat s'obté un valor del 99.9999999% (amb un valor "a priori" de 0.5).

En altres paraules, l'estudi de paternitat entre les **mostres A i C** posa en evidència de què és 639 mil milions de vegades més probable si els donants de les mostres són pare-fill que si aquestes mostres són dos individus no relacionats.

Càlcul pel presumpte pare 2

H1	Els donants de les mostres B i C són els pares del donants de la mostra D.
H2	La donant de la mostra C és la mare del donant de la mostra D, mentre que el donant de la mostra B no està relacionat genèticament amb aquests.

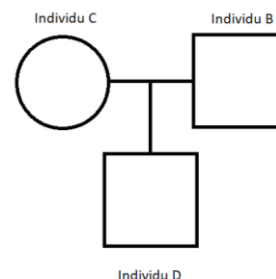


Figura 13 Arbre genealògic del cas de paternitat amb el presumpte pare B

En aquest cas, d'acord amb als marcadors de STR autosòmics, la mostra procedent del **subjecte B** ha evidenciat un perfil genètic **no compatible** amb el possible fill. És a dir, aquesta anàlisi exclou que el presumpte pare 2 sigui el progenitor, ja que es poden observar 14 exclusions de les quals dotze són de primer ordre i dos de segon ordre segons les lleis de Landsteriner¹. (Taula 3)

4.2 CAS 2: INVESTIGACIÓ BIOLÒGICA EN MEMÒRIA HISTÒRICA

A través de la Direcció General de Pau, Convivència i Drets Humans de Navarra, arriben al laboratori mostres de restes òssies i peces dentals amb la finalitat d'identificar desapareguts assassinats durant la guerra civil, que van ser enterrats en fosses comuns, a través de la comparació dels perfils genètics de les restes cadavèriques amb els dels familiars vius.

Amb les mostres dubitades es va tenir problemes per l'obtenció de perfils complets, ja que la integritat de les mostres, en bastants casos, es trobava compromesa perquè han estat exposades a condicions ambientals dures (l'acidesa i humitat del sòl o els agents degradants d'aquest). Per tant, en molts dels casos s'obtenen perfils consens obtinguts a través de diferents rèpliques i mostres.

En les taules de l'annex es troben els resultats dels STR autosòmics (Taula 4) i dels de cromosoma Y (Taula 5) de les restes cadavèriques analitzades.

Com ja s'ha comentat en l'apartat de Mètodes, es comptava amb 5 individus a identificar amb l'anàlisi genètic. Durant el procés no s'ha pogut obtenir un genotip d'una de les mostres (**Individu Z**), tot i realitzar rèpliques i l'anàlisi de diferents mostres.

Quan es comparen els diferents perfils dubitats amb els dels presumptes familiars, s'observa que l'**Individu P** pot ser familiar directe de la mostra de l'**Individu I** fent que es procedeixi a l'anàlisi estadístic de l'IP.

Aquest índex de paternitat s'ha calculat sense tenir en compte les dues exclusions que s'han observat en els perfils genètics. Es tracta d'una exclusió de segon ordre o indirecta, segons les normes de Landsteiner, pel caràcter D12S391, mentre que pel caràcter D18S51 és una exclusió de primer ordre o directa. Per tant, tot i aquestes exclusions, es procedeix a realitzar el càlcul estadístic sense tenir-les en compte.

L'índex de paternitat obtingut presenta un valor de 12.866.065. És a dir, l'estudi de paternitat entre les **mostres P i I** posa en evidència que és més de 12 milions de vegades més probable si els donants de les mostres són pare-filla que si aquestes dues mostres procedeixen de dos individus no relacionats. En termes de probabilitat de paternitat s'obté un valor del 99.9999922% (amb un valor "a priori" de 0.5).

Com ja es determina el parentiu entre aquests dos individus no es procedirà amb la mostra procedent de l'**individu P** a la determinació dels STR del cromosoma Y. Els haplotips obtinguts en l'assaig estan recopilats en la Taula 5 de l'annex.

Si es comparen els diferents haplotips dels individus implicats en l'estudi, es pot comprovar que cap d'ells coincideix, fent que s'arribi a la conclusió de què no estan relacionats genèticament.

4.3 CAS 3: INVESTIGACIÓ BIOLÒGICA DE LA GERMANDAT

La divisió de Policia Científica de Navarra sol·licita l'anàlisi comparatiu de perfils genètics amb la finalitat d'identificar un cadàver d'una dona estrangera que va aparèixer morta. Per realitzar la comparació de perfils es va realitzar amb mostra d'una presumpta germana.

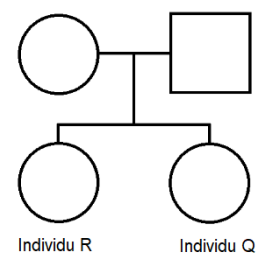


Figura 14 Arbre genealògic dels individus implicats en el cas de germanat

La mostra de la víctima (**Individu R**) es tractava d'una targeta FTA amb una taca de sang recol·lectada durant l'autòpsia mentre que les de la presumpta germana (**Individu Q**) era un hisop bucal. El següent pas va ser l'anàlisi dels STR autosòmics, resultats dels quals es troben recopilats en la Taula 6 de l'annex.

Un cop s'obté els perfils genètics dels STR autosòmics, es procedeix a l'anàlisi estadística d'aquests a través de l'índex de germandat entre les dues donants d'aquestes mostres on les hipòtesis formulades seran:

H1	Les donants de les mostres R i Q són germanes.
H2	Les donants de les mostres R i Q no estan relacionades genèticament

L'índex de paternitat (IP) el que pretén és establir la probabilitat de què entre les donants de les mostres presenti una relació de germanes en comparació a la hipòtesi alternativa, de què no ho siguin. En aquest cas, IP pren un valor de 949, on amb termes de probabilitat equivaldria a un 99.895% (valor a priori del 0.5).

Aquest IP dona un valor més baix en comparació dels casos en què es vol determinar una relació de pare-fill, ja que en una relació entre germanes la probabilitat de compartir al·lells en un mateix sistema és del 25% mentre que en els casos de paternitat és del 50%. És a dir, en una relació entre germanes es pot trobar casos en què no es comparteixi cap combinació al·lèlica en un marcador determinat (Figura 15).

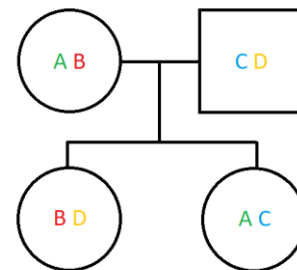


Figura 15 Patró d'herència en pares heterocigots per un mateix loci

En tractar-se de la identificació d'un cadàver trobat a Navarra (Espanya), s'utilitza la base de dades de la població espanyola²⁵⁻³⁰ per determinar la probabilitat de què es doni la hipòtesi 2, on es vol conèixer la freqüència de què es doni aquest genotip en la població espanyola, que seria l'equivalent a agafar un individu a l'atzar de la població de referència.

Pel que fa als resultats, no és suficientment informatiu per confirmar la relació de germandat entre les **mostres R i Q** fent que es necessiti realitzar una anàlisi dels SNP del DNA mitocondrial, per poder obtenir major informació sobre la relació genètica entre aquestes. A partir dels extractes de DNA inicials, es realitza la seqüenciació de les regions

d'hípervariabilitat del DNA mitocondrial de les dues presumptes germanes obtenint els resultats recopilats en la Taula 7 de l'annex.

A partir dels diferents haplotips mitocondrials obtinguts es comparen amb la base de dades de referència EMPOP³³ per tal de determinar la freqüència d'aquests en la població mundial i europea. Els resultats obtinguts mostren de què no coincideix amb els 26.407 haplotips de les regions HVI, HVII i HVIII en la població mundial fet que en la població europea tampoc es troba cap haplotip com l'evidenciat en les mostres analitzades en els 7.350 perfils que conté aquesta base de dades.

Per calcular l'índex de germanat a partir d'aquestes dades, necessitarem calcular la freqüència d'aquest haplotip en la població europea: $f(\text{haplotip}) = \frac{(x+1)}{(n+1)}$, on x fa referència al nombre d'haplotips trobats en la població estudiada i n es tracta del nombre d'individus de la població estudiada. Així doncs, la freqüència obtinguda en aquest cas tindrà un valor de $1.3604 \cdot 10^{-4}$ a partir de la qual es pot calcular el LR on la hipòtesi alternativa seria la probabilitat de trobar aquest haplotip en la població, que serà la freqüència d'aquest.

Per tant, s'obté un valor de LR o índex de germanat de 7.351, que ens indica quantes vegades és més probable de trobar aquest haplotip si aquestes dues mostres provenen de germanes per via materna de què si es tracta de dos individus agafats a l'atzar de la població.

Com es tracta de dos successos que estan relacionats, es pot obtenir un valor conjunt a través dels dos IP obtinguts a través de l'estudi dels STR autosòmics i polimorfismes mitocondrials fent que l'IP agafi un valor de 6.975.150 (99.99998% amb un 0.5 "a priori"). En altres paraules, l'estudi de germanat mostra que és 6 milions de vegades més probable de que tinguin una relació de germanat de què es tracti d'individus no relacionats genèticament.

5 CONCLUSIONS

Avui en dia, l'anàlisi genètic és una eina clau en aquesta branca de les ciències forense. En aquest estudi es pretén mostrar quines són les eines que té, actualment, la genètica

forense i visualitzar-les en diferents casos on es vol realitzar una identificació d'un individu, a través dels familiars.

L'estudi dels **STR autosòmics** és la tècnica principal utilitzada en la genètica forense per tal d'obtenir perfils genètics amb la finalitat d'identificació, ja que és una combinació única per cada individu. En el cas de l'estudi de paternitat, s'han utilitzat per realitzar la comparació entre els diferents perfils dels presumptes pares amb el fill. Els perfils que s'obtenen tenen un elevat poder de discriminació el que ens ha permès obtenir resultats amb un alt índex de parentiu.

Actualment els kits comercials de STR autosòmics tenen una elevada sensibilitat gràcies a l'optimització d'aquests incloent els mini STR. Això permet la identificació de mostres de baixa qualitat com ha passat en el cas de memòria històrica on s'ha identificat un cadàver que feia més de 50 anys que estava enterrat basant-se en un perfil de STR autosòmics.

Per altra banda, el **polimorfisme del DNA mitocondrial** és el marcador de referència del llinatge matern no identificatiu. Tot i això, aquest tipus de polimorfisme serà altament utilitzat en aquelles mostres que tinguin un alt nivell de degradació, ja que la quantitat de genoma mitocondrial és major que el nuclear.

A part de ser utilitzat en mostres amb una qualitat compromesa, la combinació dels polimorfismes del mtDNA amb els STR autosòmics ens ha permès augmentar l'índex de parentiu de milers a milions en el cas de germandat. Per tant, l'associació dels diferents marcadors utilitzats en genètica forense fa augmentar de forma significativa el poder de discriminació dels resultats.

Per últim, els **STR de cromosoma Y** són un marcador de llinatge patern utilitzat en casos d'identificació de familiars que no són directes, com seria en el cas de padrins o cosins, sempre per via paterna. Tot i que no es tracta d'un marcador identificatiu, igual que els polimorfismes de mtDNA, ens permet excloure individus de què estiguin relacionats entre si, ja que s'hereten en bloc.

Aquests tres tipus de polimorfismes utilitzats en la genètica forense es poden combinar entre si, amb la finalitat d'augmentar el valor estadístic per tal de donar un resultat amb

una major certesa. És a dir, són estudis complementaris que aporten informació diferent.

És important tenir en compte que les mostres forenses poden trobar-se en diferents concentracions de cèl·lules provocant que els perfils que s'obtinguin siguin de major o menor qualitat. Pel que fa als indicis amb els quals es treballa en aquests casos, a causa del grau de qualitat variable, provoca que siguin susceptibles a contaminació fet que provoca que tant el laboratori com el tècnic hagi de prendre mesures per tal d'evitar que hi hagi una modificació del contingut de la mostra.

Tot i tractar-se de tècniques per l'obtenció de perfils genètics o haplotips, cal remarcar que un perfil genètic per si sol no permetrà realitzar cap tipus d'identificació, ja que s'està analitzant regions del DNA no codificant. Així doncs, sense una mostra de referència sol es podrà obtenir la freqüència d'aquell perfil o haplotip en la població de referència.

Finalment, la transmissió dels resultats. La col·laboració de les ciències forenses amb els jutjats requereix una bona transmissió de les conclusions entre els pèrits forenses i els jutges. En el cas de la genètica forense, aquesta necessitat és bàsica, ja que per comprendre bé els resultats tècnics es requereix tenir coneixements teòrics. És per aquest motiu que les iniciatives de formació d'ambdues parts és necessària i arribar a un consens pel que fa a les bases objectives amb la finalitat d'intentar resoldre pas a pas aquest problema: la comunicació entre pèrits tècnics i els tribunals.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Tagliabracci, A. *et al.* *Introduzione alla Genetica Forense*.
2. Cooper, G. M. & Hausman, R. E. *La célula*. (2014).
3. Sherry, S., Ward, M. & Sirotkin, K. dbSNP- database for Single Nucleotide Polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res.* **9**, 677–679 (1999).
4. Carracedo, A., Salas, A. & Lareu, M. Problems and future challenges of forensic genetics in the XXI. *Med Forense* **16**, 31–35 (2010).
5. Jeffreys, A., Wilson, V. & Thein, S. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature* **314**, 67–73 (1985).
6. Alonso, A. A. in *Genética Humana 1860–1871* (2004).
7. Willuweit, S. & Roewer, L. YHRD - Y Chromosome Haplotype Reference Database. (2018). Available at: <https://yhrd.org>.
8. Anderson, S., Bankier, A. T. & Barrell, B. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
9. Landsteiner, K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Z. Bakteriol* **27**, 357–362 (1900).
10. Solla, L. P. in *Genética Humana 1872–1889* (2004).
11. Musgrave-Brown, E. *et al.* Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* **1**, 186–90 (2007).
12. España. Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. *Boletín Of. del Estado* (2007).
13. Nasertic. PT 192 - Extracción de bbp en vestigios biológicos mediante “Automate Express”,. **rev. 3**, (2016).
14. Nasertic. PT 157 – Extracción de ADN de restos oseos. **rev. 3**, (2017).

15. Liu, J. Y. *et al.* AutoMate Express forensic DNA extraction system for the extraction of genomic DNA from biological samples. *J. Forensic Sci.* **57**, 1022–1030 (2012).
16. Timken, M. D., Swango, K. L., Orrego, C., Chong, M. D. & Buoncristiani, M. R. *Quantification of DNA for Forensic DNA Typing by qPCR: Singleplex and Multiplex Modes for Nuclear and Mitochondrial Genomes and the Y Chromosome.* (2002).
17. Vernarecci, S. *et al.* Quantifiler® TRIO and forensic samples management: A matter of degradation. *Forensic Sci. Int. Genet.* **16**, 77–85 (2015).
18. Nasertic. PT 145 - Identificación de STR's Autosómicos y de cromosoma Y en ADN humano mediante amplificación por PCR y detección por electroforesis capilar. *rev.* **10**, (2017).
19. Edwards, K., Logan, J. & Saunders, N. *Real-time PCR: An essential guide.* (2005).
20. Wang, D. Y. *et al.* Developmental validation of the GlobalFiler Express PCR Amplification Kit: A 6-dye multiplex assay for the direct amplification of reference samples. *Forensic Sci. Int. Genet.* **19**, 148–155 (2015).
21. Gopinathe, S. *et al.* Developmental validation of the Yfiler Plus PCR Amplification Kit: An enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Sci. Int. Genet.* **24**, 164–175 (2016).
22. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. *PCR protocols: A guide to methods and applications.* CA Acad. Press (1990).
23. Nasertic. PT 149 - Análisis de las posiciones polimórficas (SNPs) en las regiones HVI, HVII y HVIII de la región control del ADN mitocondrial. *rev.* **4**, (2016).
24. Carralero, J. *Matemáticas aplicadas a la Genética Forense.* (2012).
25. Fernandez, I. *et al.* A spanish population study of the STR loci D2S1338, D19S433, D19S433, PentaD and PentaE. *J. Forensic Sci.* **48**, 1182 (2003).
26. Martin, P., García, O., Alonso, A., Albarrán, C. & Sancho, M. A spanish population study of four STR loci D8S1179, D16S539, D18S51 and D21S11. *Int. J. Legal Med.* **112**, 340–341 (1999).

27. Martín, P., García, O., Alonso, A., Albarrán, C. & Sancho, M. A Spanish population study of the STR loci HumLPL, D5S818, D7S820 and D13S317. *Int. J. Legal Med.* **112**, 70–71 (1998).
28. Martín, P., García, O., Alonso, A., Albarrán, C. & Sancho, M. Allele frequencies of D3S1358 and FGA in a central Spanish population. *Prog. Forensic Genet.* **7**, 309–311 (1998).
29. García, O., Alonso, J., Cano, J. A., García, R. & Luque, G. M. Corrigendum to 'Population genetic data and concordance study for the kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX 17 system and Investigator ESSplex in Spain'. *Forensic Sci. Int. Genet.* **9**, 192 (2104).
30. García, O. *et al.* Population genetic data and concordance study for kits Identifiler, NGM, PowerPlex ESX 17 system and Investigator ESSplex in Spain. *Forensic Sci. Int. Genet.* **6**, c78-e79 (2012).
31. Recomendaciones sobre el informe pericial y la expresión de resultados en materia de análisis genéticos forenses. *Pleno la Com. Nac. para el Uso Forense del DNA* (2015).
32. Nasertic. PT 146 - Comparación de perfiles genéticos en humanos. **rev. 5**, (2015).
33. Parson, W. & Dür, A. EMPOP mtDNA database. (2018). Available at: www.empop.org.
34. Vozmediano, A. Genética Forense Final (GFF).

ANNEX

TEOREMA DE BAYES

L'anàlisi estadístic està basat en el **Teorema de Bayes**, on l'objectiu és calcular la probabilitat d'una hipòtesi (H) condicionada per una evidència (E), on aquesta no és calculable de forma immediata, però si ho és la probabilitat de l'evidència condicionada per la hipòtesi. Així que tenim:

$$P(H|E) = \frac{P(H \cap E)}{P(E)} = \frac{P(E|H) \cdot P(H)}{P(E)}$$

Per obtenir finalment la fórmula d'aquest teorema, s'ha de descompondre el denominador aplicant el teorema de la probabilitat total que permet calcular la probabilitat d'un succés que depèn d'altres, sempre que es coneguin les probabilitats condicionades per cada un d'aquests.

La **probabilitat a priori** (p) és aquella de la qual es parteix abans d'efectuar un experiment que pugui donar nova informació sobre aquesta probabilitat, per després obtenir una probabilitat a posteriori. En canvi, la **probabilitat a posteriori** (w) seria aquella que s'obté en funció de la informació deduïda de les noves proves practicades. És a dir, és aquella probabilitat condicionada que s'assigna després que l'evidència és presa en compte.

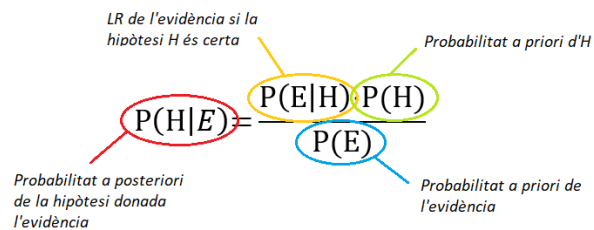


Figura 16 Teorema de Bayes desenvolupat

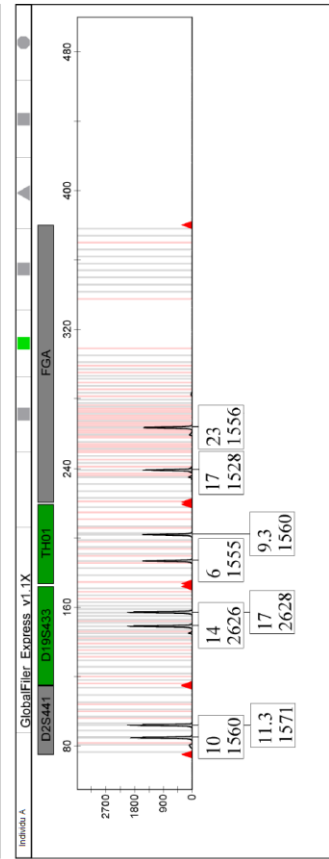
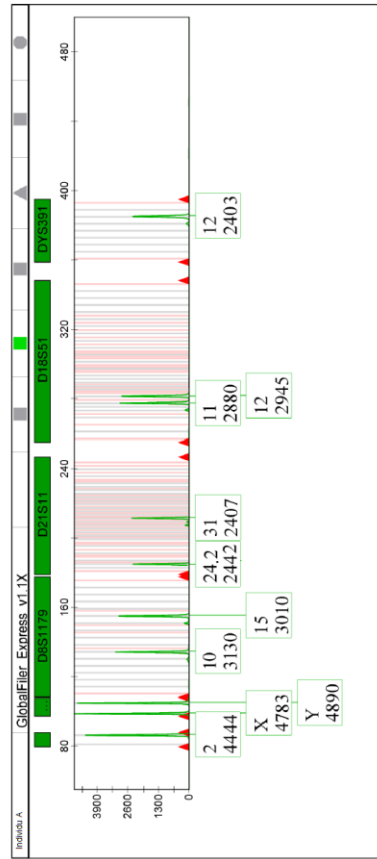
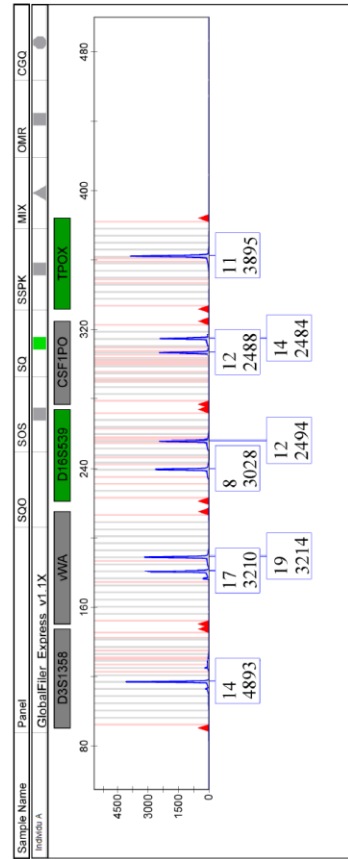
PERFILS GENÈTICS DEL CAS 1

Taula 3 Genotip dels STRs autosòmics del cas de paternitat

Marcador	Individu A		Individu B		Individu C		Individu D	
	Presumpte pare 1		Presumpte pare 2		Mare		Fill	
D3S1358	14	14	15	18	17	18	14	17
vWA	17	19	17	17	16	17	17	17
D16S539	8	12	9	10	9	11	9	12
CSF1PO	12	14	12	12	11	13	11	12
TPOX	11	11	11	12	8	11	11	11
Yindel	2		2				2	
AMEL	X	Y	X	Y	X	X	X	Y
D8S1179	10	15	12	14	13	14	13	15
D21S11	24.2	31	30	31.2	26	31.2	31	31.2
D18S51	11	12	18	18	14	17	12	14
DYS391	12		9				12	
D2S441	10	11.3	14	14	10	10	10	10
D19S433	14	17	13	15	13	14	14	14
TH10	6	9.3	6	7	6	7	6	9.3
FGA	17	23	27	27	20	25	23	25
D22S1045	16	16	15	15	11	16	16	16
D5S818	9	11	7	11	9	11	9	11
D13S317	8	13	9	11	9	11	9	13
D7S820	7	11	10	11	11	12	11	11
SE33	30.2	34	18	28.2	18	18	18	30.2
D10S1248	14	14	14	16	16	16	14	16
D1S1656	9	13	14	18.3	17.3	18.3	13	17.3
D12S391	16	19	16	19	16	20	16	20
D2S1338	25	25	22	24	17	25	25	25

A continuació s'adjunten els electroferogrames dels perfils obtinguts

Project: cas 1 - estudi de paternitat



Project: cas 1 - estudi de paternitat

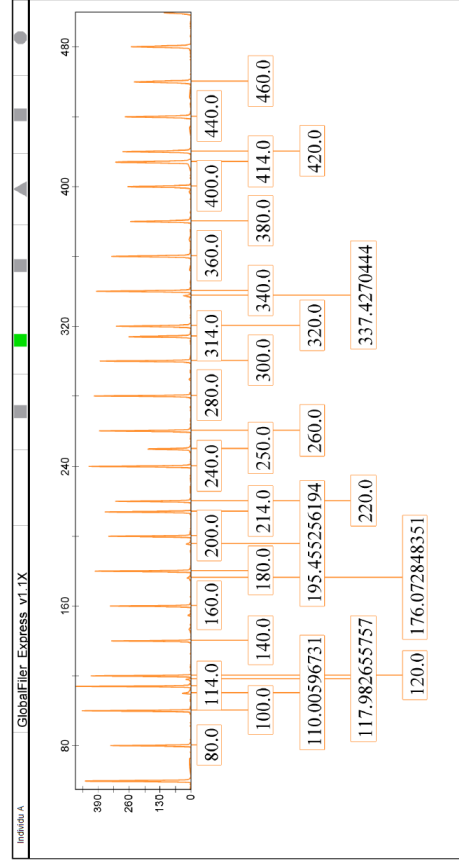
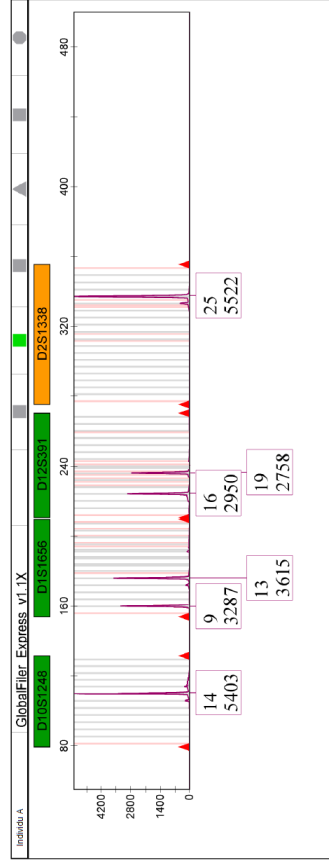
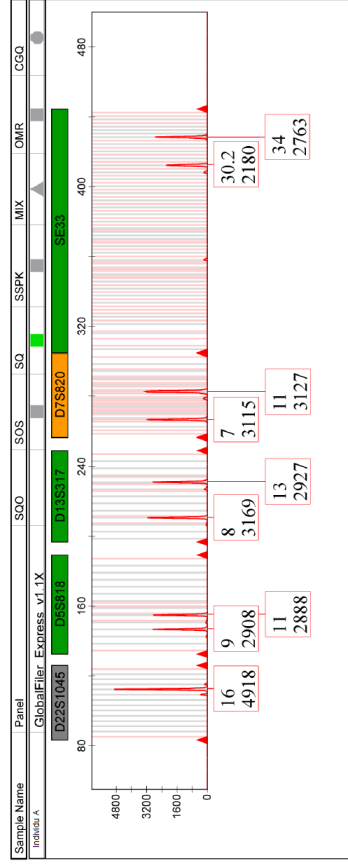


Figura 17 Electroferograma individu A

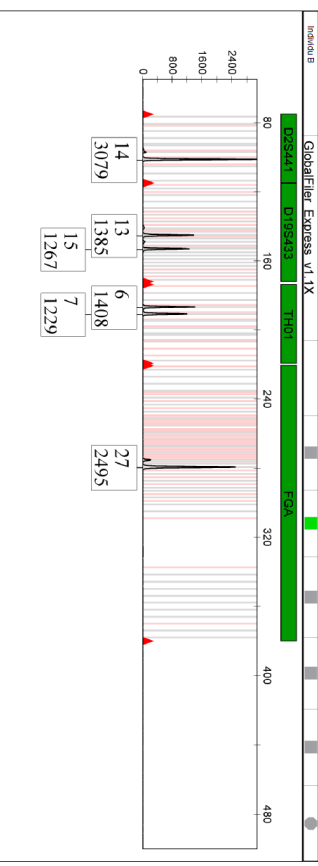
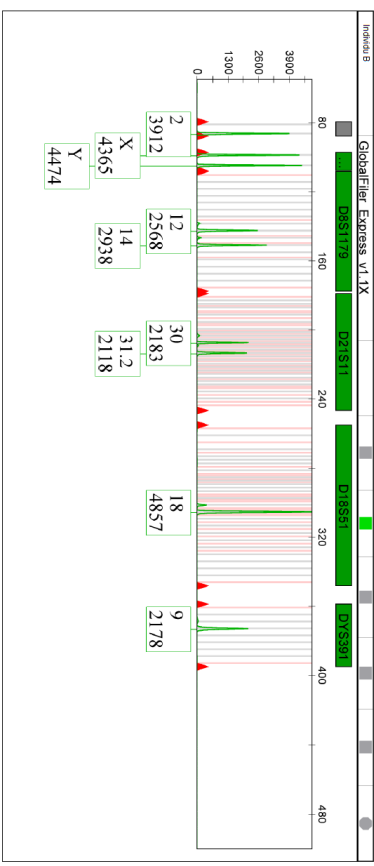
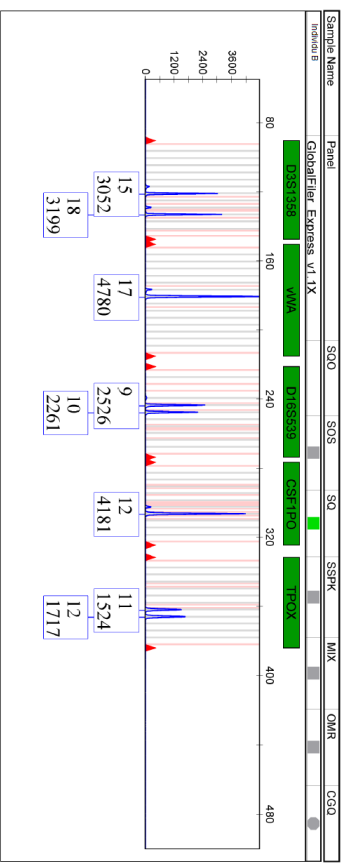
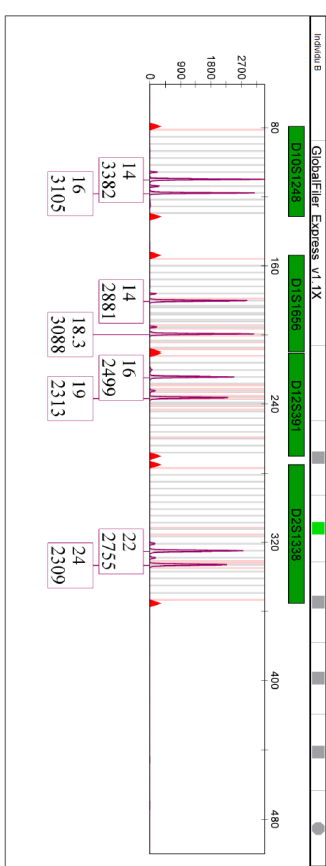
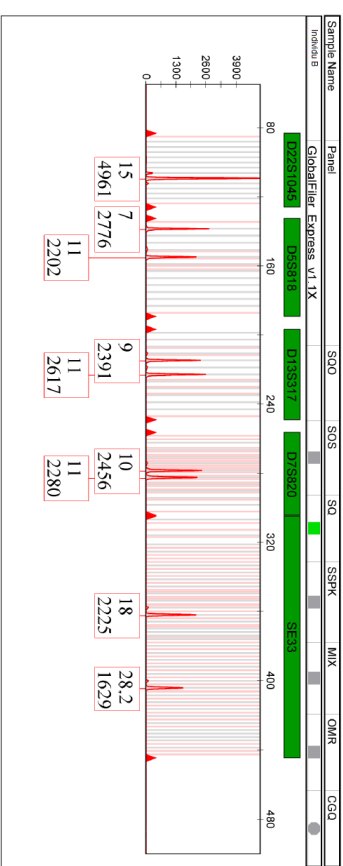


Figura 18 Electroferograma individu B



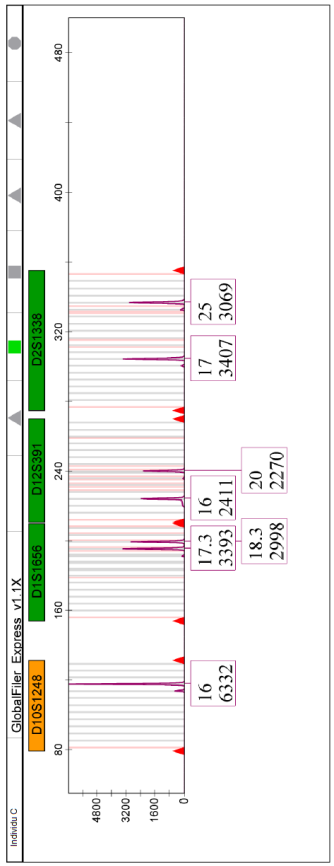
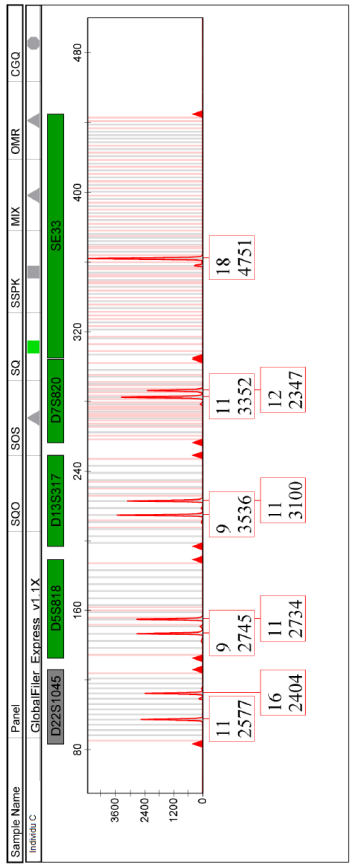
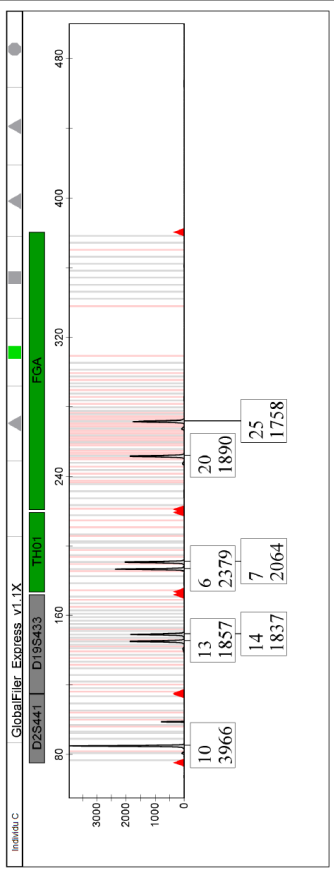
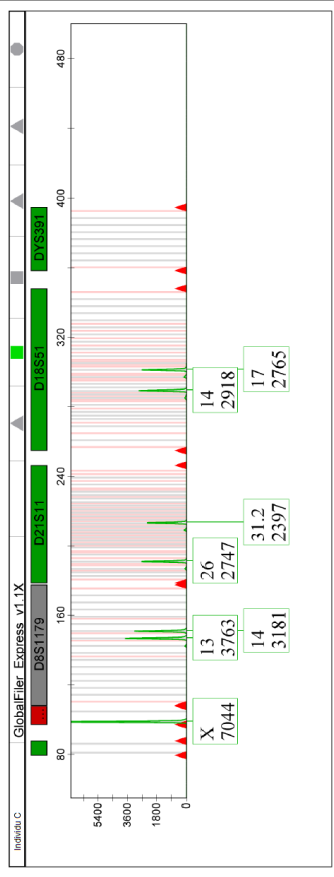
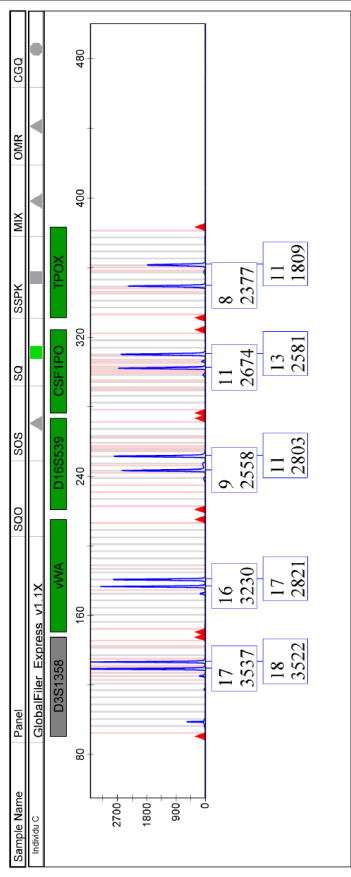


Figura 19 Electroferograma individu C

V

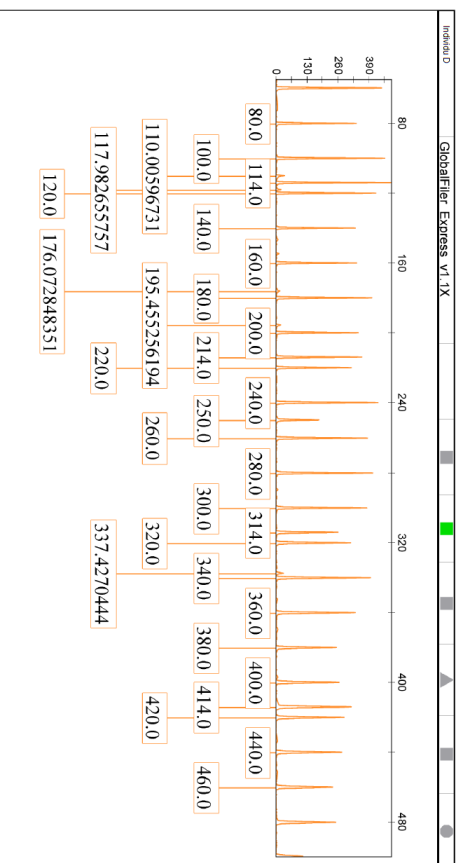
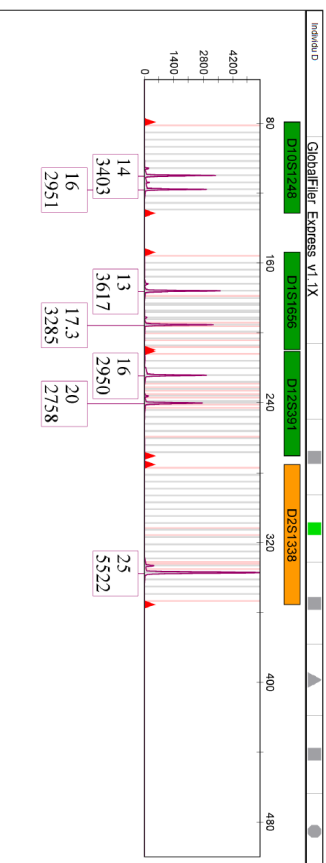
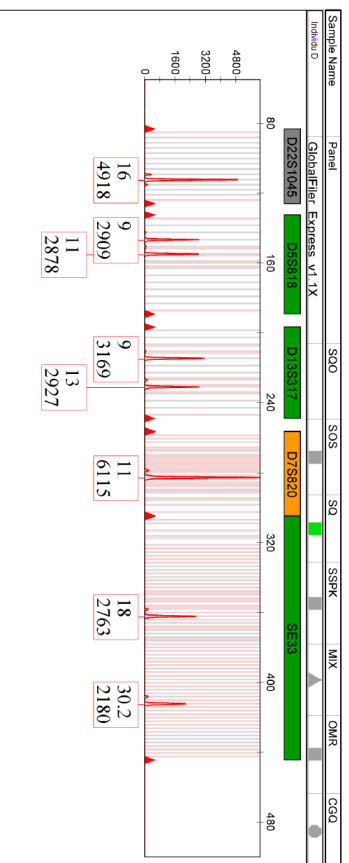
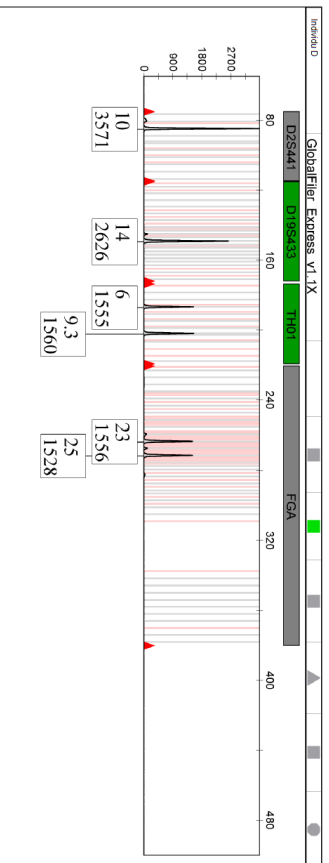
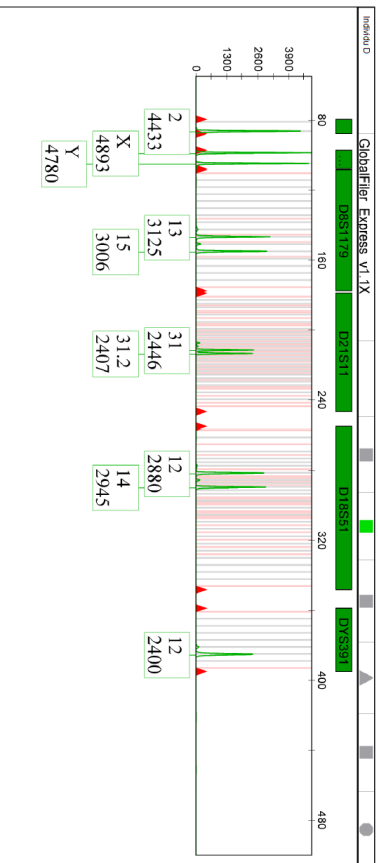
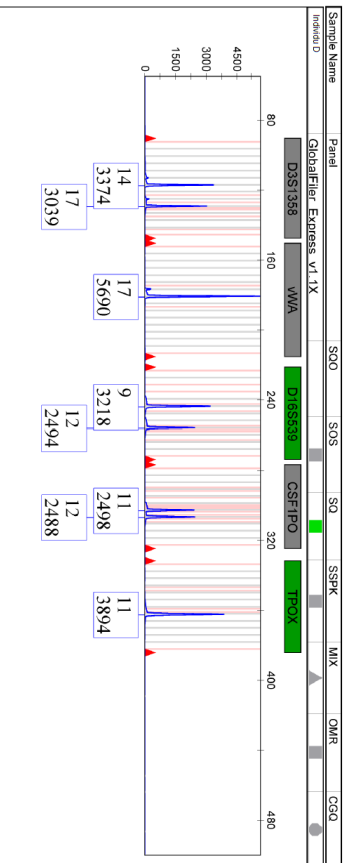


Figura 20 Electroferograma individu D

PERFILS GENÈTICS DELS CASOS DE MEMÒRIA HISTÒRICA

Taula 4 Genotip dels STRs autosòmics de les restes de Memòria Històrica de la fosa de Urtasun

Marcador	Mostres dubitades (restes òssies i peces dentals)								Mostres indubitades					
	Individu M		Individu N		Individu O		Individu P		Individu I		Individu J		Individu K	
D3S1358	15	16	15	16	18	18	16	16	16	16	14	18	16	18
vWA	16	16	16	17	14	17	16	17	15	16	14	17	15	16
D16S539	13	13	11	13	9	13	11	12	9	11	11	11	11	11
CSF1PO	10	10	10	11	7.2	7.2	11	11	11	11	11	12	10	10
TPOX	9	9	8	11	8	8	8	8	8	11	8	10	8	11
Yindel	2		2		2		2				2		2	
AMEL	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	X	X	Y	X	Y
D8S1179	9	12	10	13	12	14	8	14	8	12	9	14	13	14
D21S11	29	30	29	33.2	28	28	30	30	30	30	29	30	30	34
D18S51	13	13	13	21			15	15	14	18	10	10	11	15
DYS391			11		11						10		11	
D2S441	10	14	10	14	13	14	11.3	14	11	14	11	14	11	14
D19S433	14	16	12	15			12	14.2	12	15	13	14	14	15.2
TH10	6	6	9	9	8	9	6	6	6	9.3	6	9	9	9.3
FGA	21	21	24	26	22	22	20	24	20	21	24	26	20	22
D22S1045	15	17	15	16	17	17	15	16	16	16	16	16	15	16
D5S818	12	13	10	12	11	12	11	13	11	13	11	12	13	13
D13S317	12	12	11	14	13	14	8	11	11	11	11	12	8	11
D7S820	10	11	9	9	10	11	11	11	8	11	10	11	9	12
SE33			17	19	17	27.2	21	30.2	17	21	21	22	14	17
D10S1248	13	14	14	14	14	14	14	14	14	16	15	15	14	16
D1S1656	12	12	12	17	16	16.3	17.3	17.3	14	17.3	11	15.3	15.3	16
D12S391	18	21	18	22	17	24	20	20	22	22	20	22	18	22
D2S1338			17	17			20	20	20	20	16	25	17	22

A continuació s'adjunten els electroferogrames dels perfils obtinguts

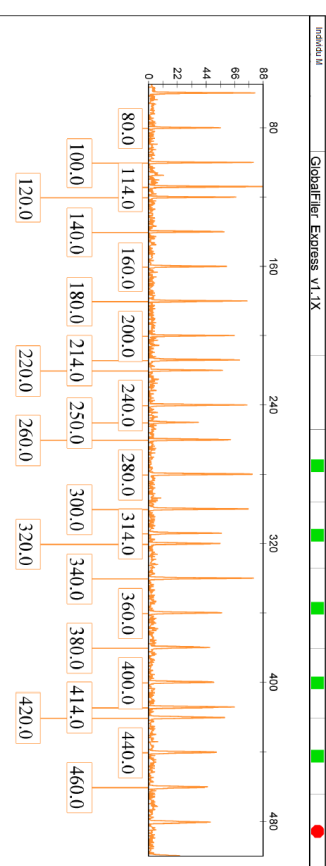
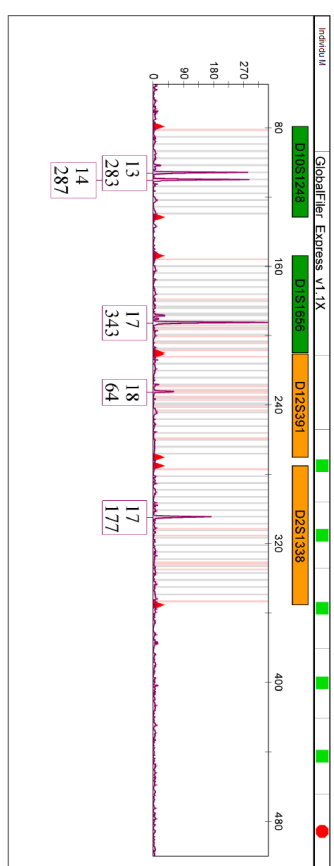
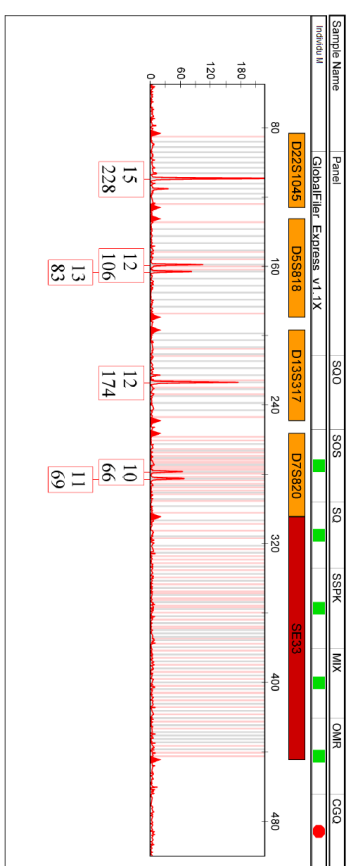
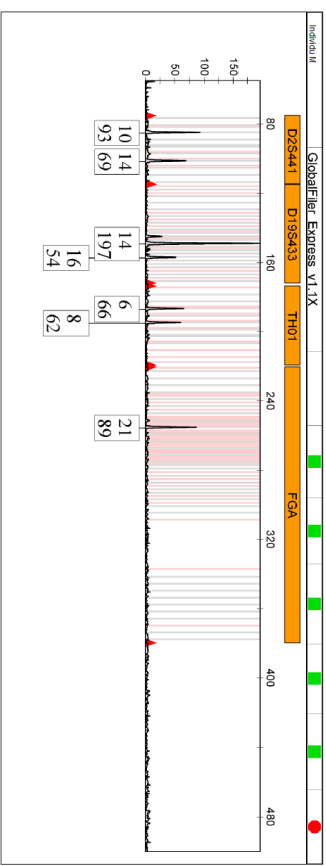
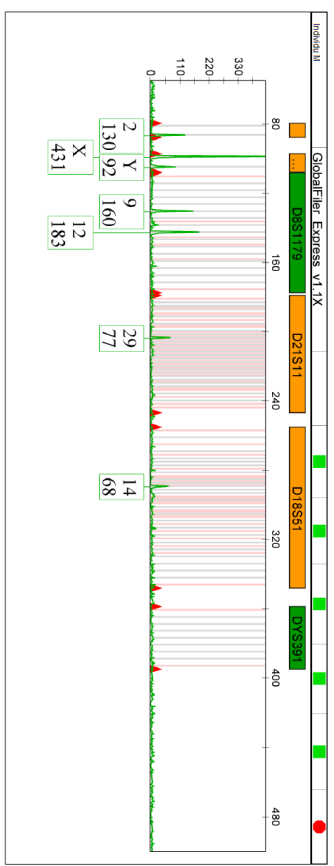
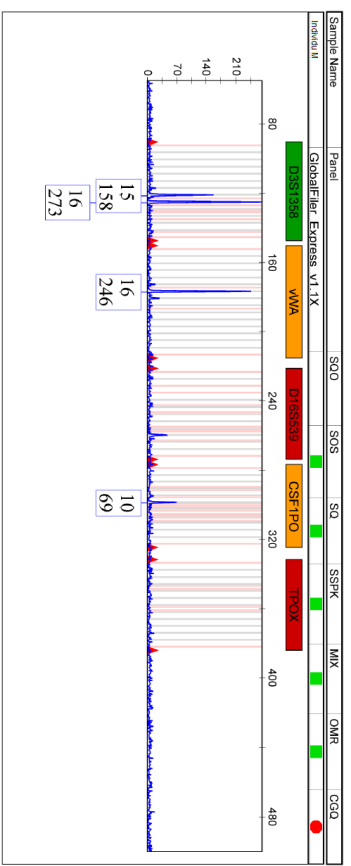


Figura 21 Electroferograma Individu M

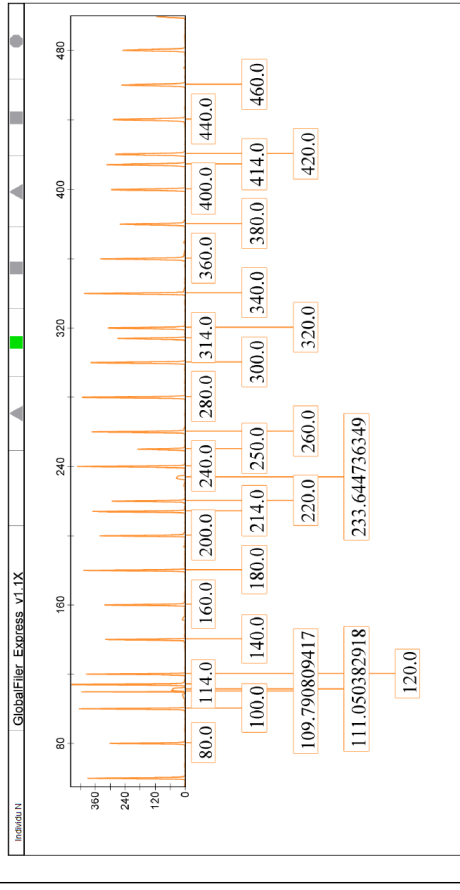
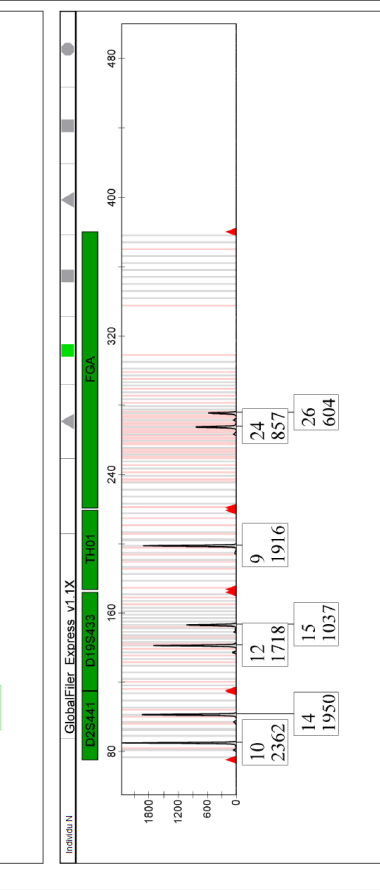
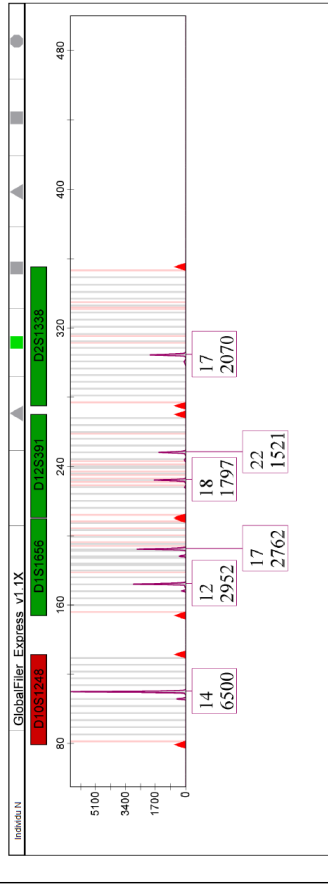
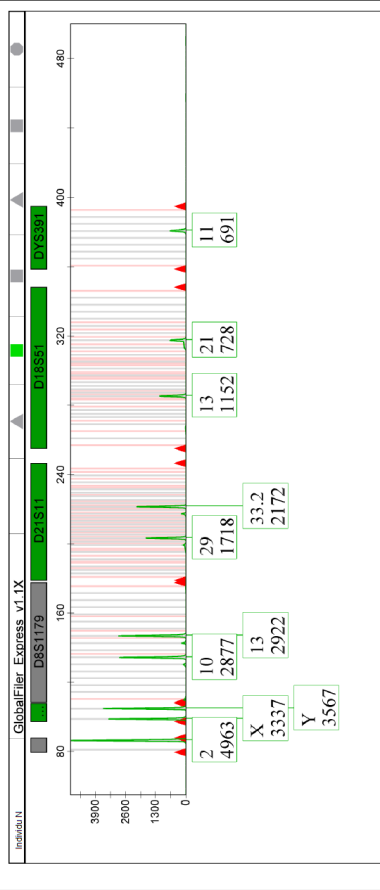
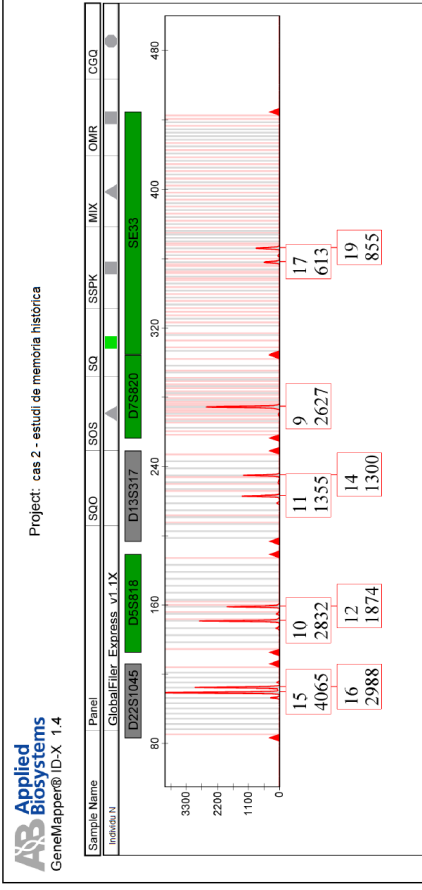
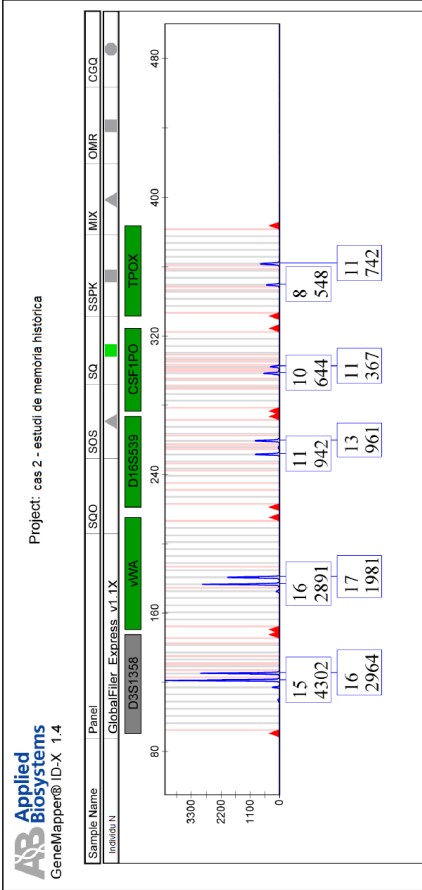


Figura 22 Electroferograma individu N

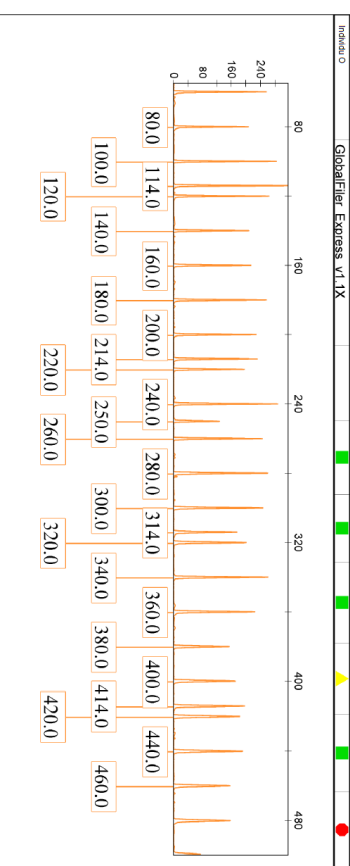
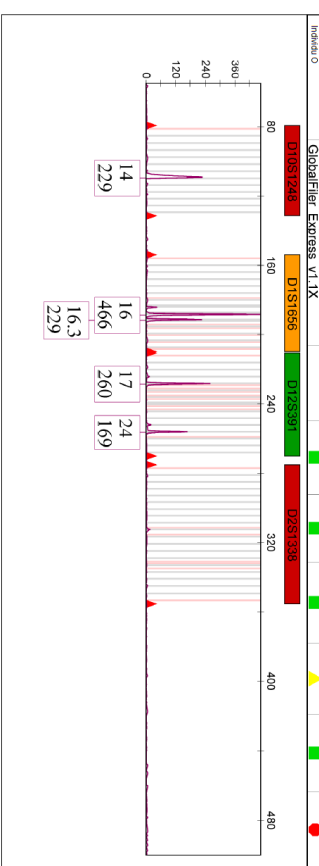
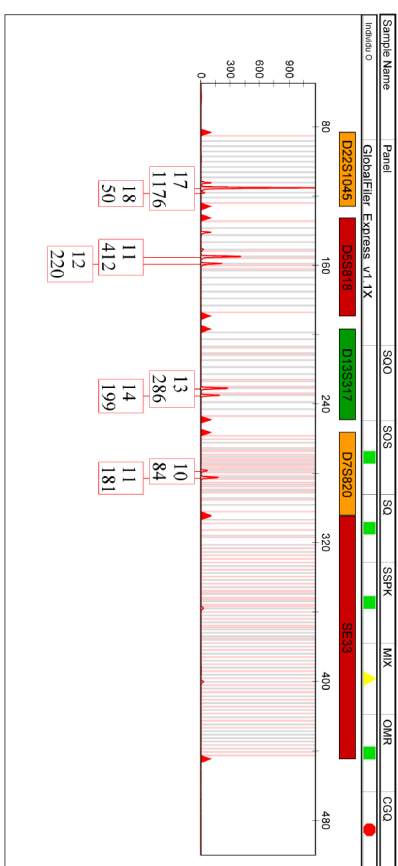
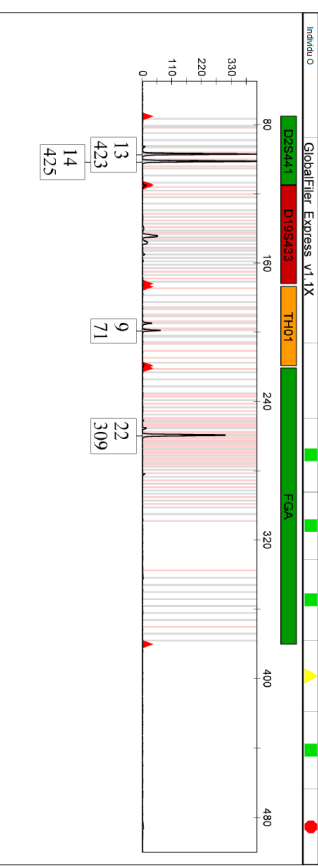
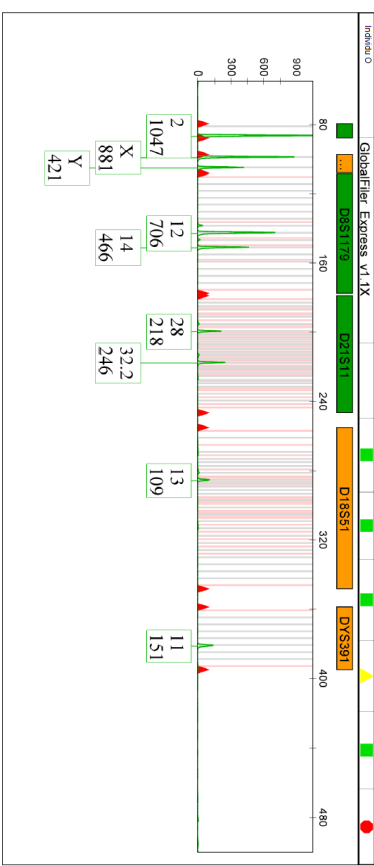
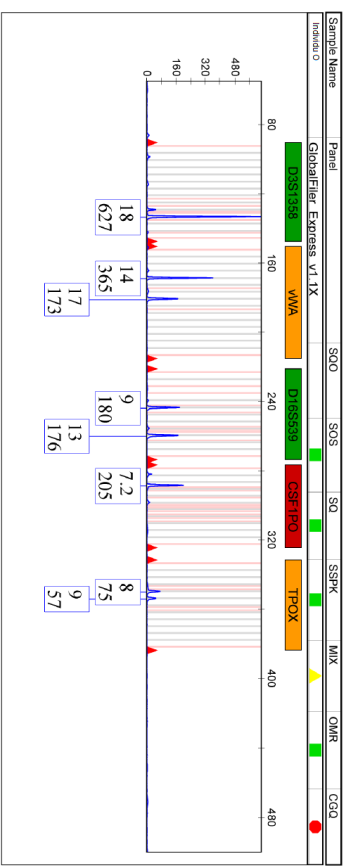


Figura 23 Electroferograma individu O

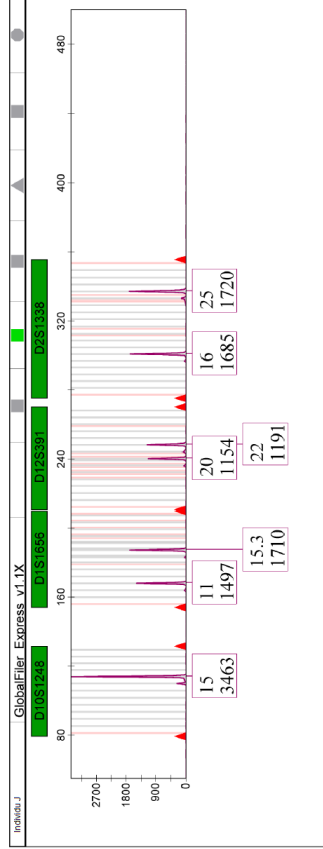
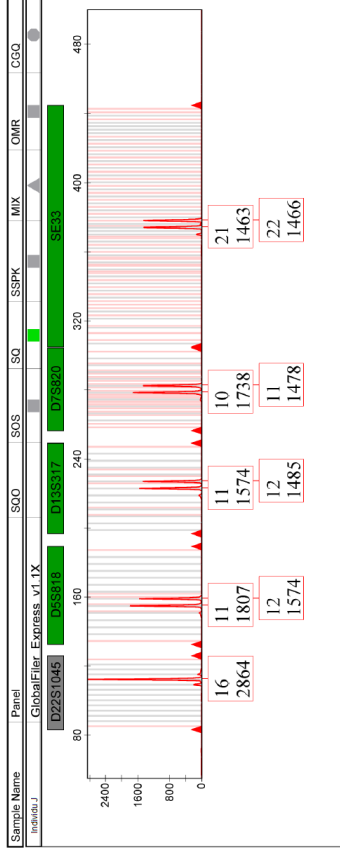
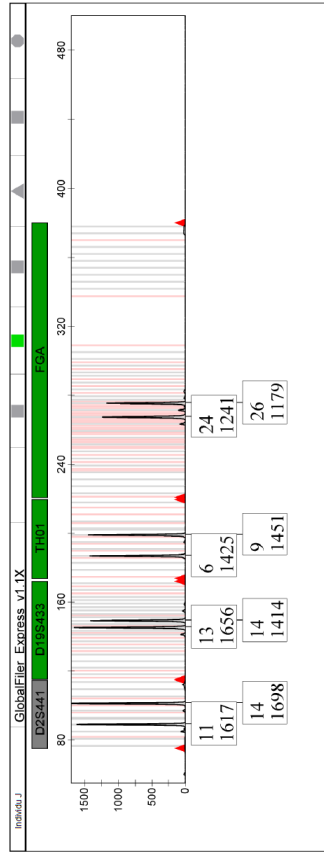
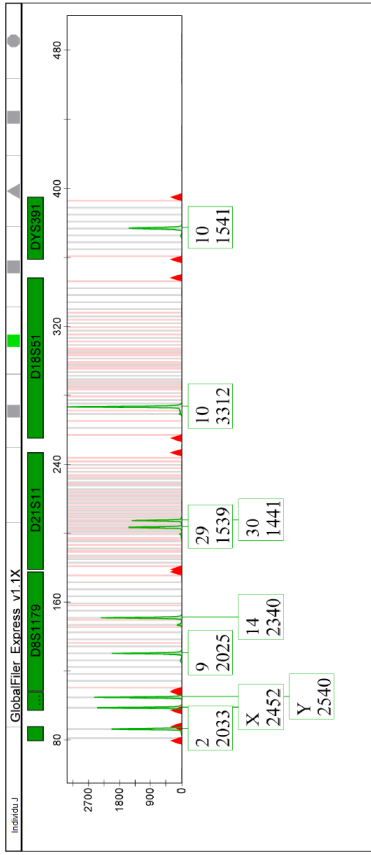
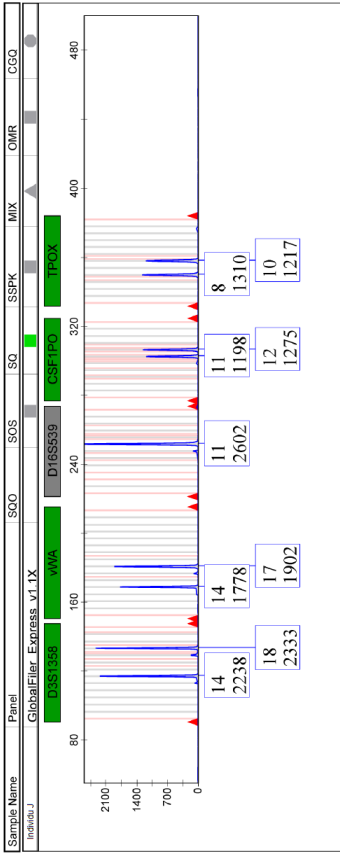


Figura 26 Electroferograma individu indubitat J

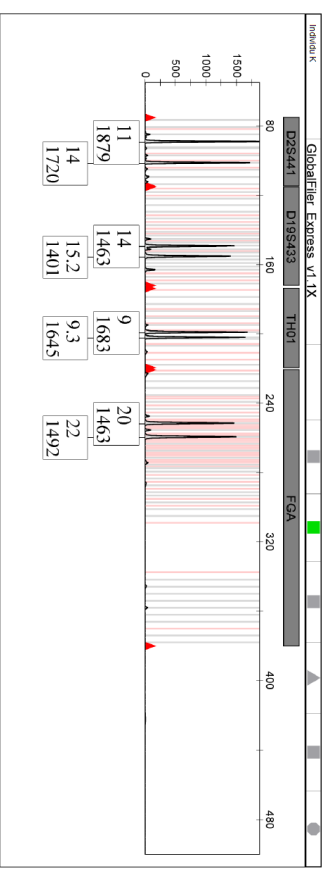
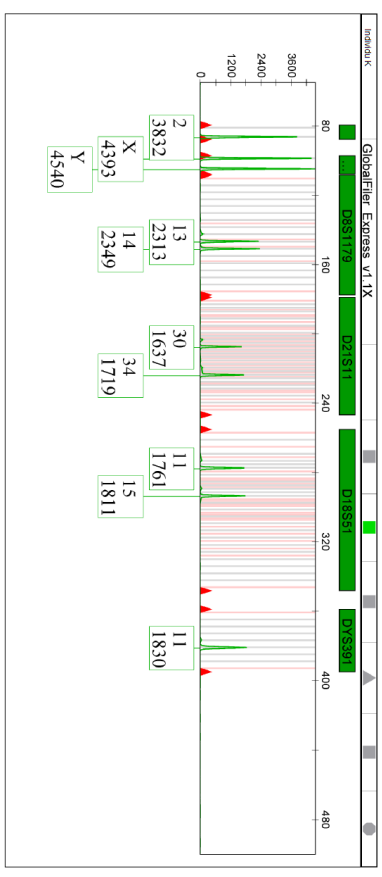
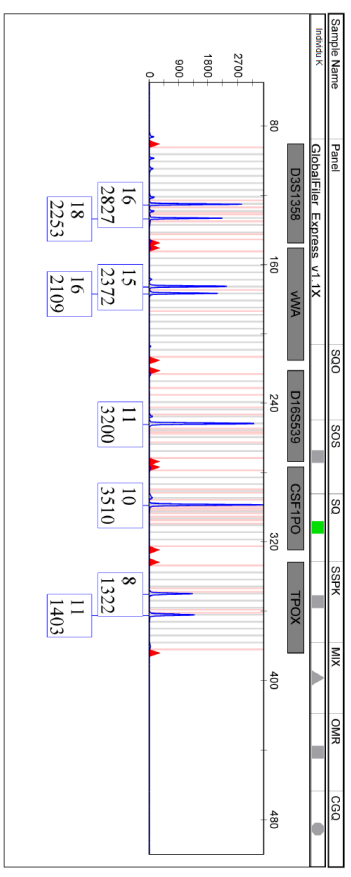
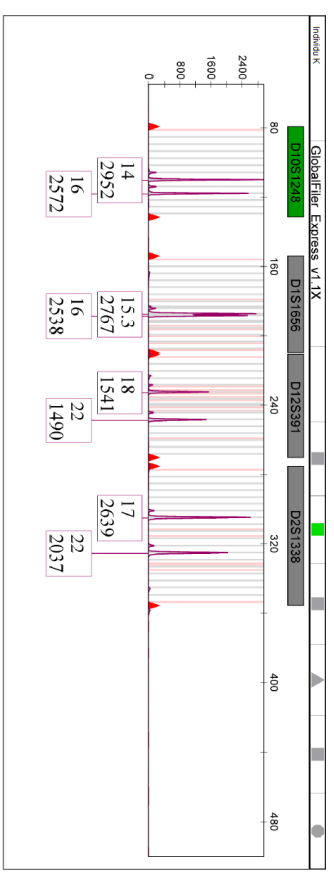
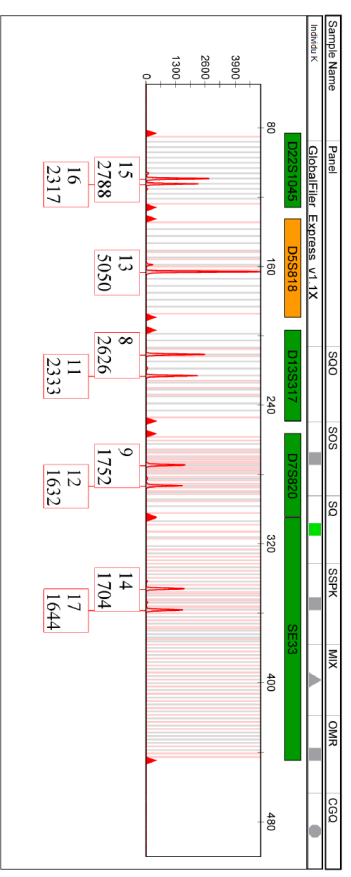


Figura 27 Electroferograma individu indubitat K



Taula 5 Haplotip dels STRs del cromosoma Y de les restes de memòria històrica de la fosa de Urtasun

Marcador	Mostres dubitades (restes òssies i peces dentals)						Mostres indubidades			
	Individu M		Individu N		Individu O		Individu J		Individu K	
DYS576	19		17		20		18		17	
DYS389I	13		13		14		13		13	
DYS635			24		23		23		23	
DYS389II	29		30				29		29	
DYS627			23				22		23	
DYS460	11		11		11		11		10	
DYS458	17		16		17		16		16	
DYS19	14		14		15		14		14	
YGATA H4			12		11		11		10	
DYS448	19		19		17		18		19	
DYS391			11		11		10		11	
DYS456	14		15		16		17		14	
DYS390	24		24		24		24		24	
DYS438			10				13		12	
DYS392			13				13		13	
DYS518			37				38		37	
DYS570	17		17		17		18		17	
DYS437			15		14		14		15	
DYS385	15		11	14	12	16	11	14	10	15
DYS449			31		29		31		30	
DYS393	13		13		13		13		13	
DYS439	11		12		14		12		12	
DYS481	23		22		22		22		22	
DYF387S1			35		36		35	36	35	36
DYS533			12		12		13		12	

A continuació s'adjunten els electroferogrames dels perfils obtinguts

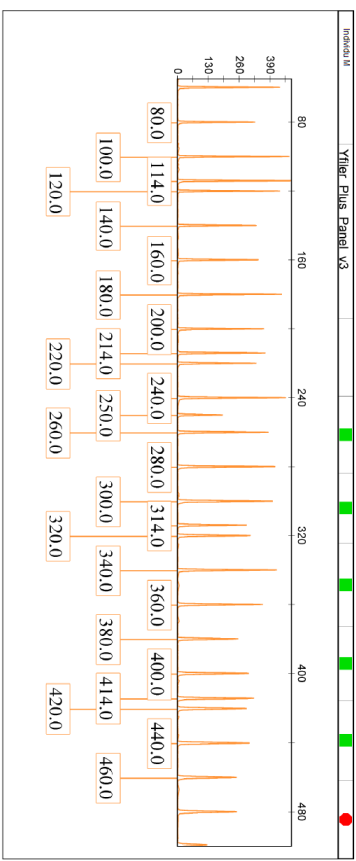
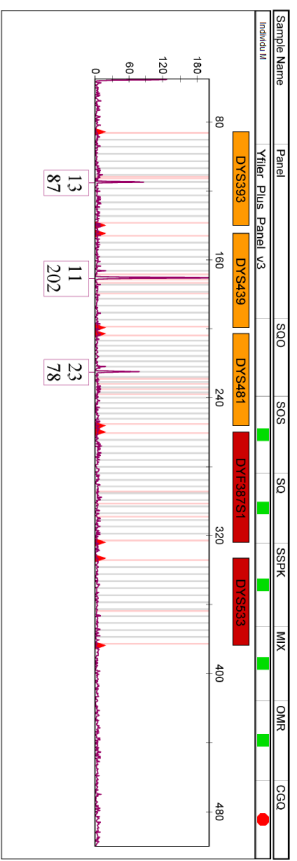
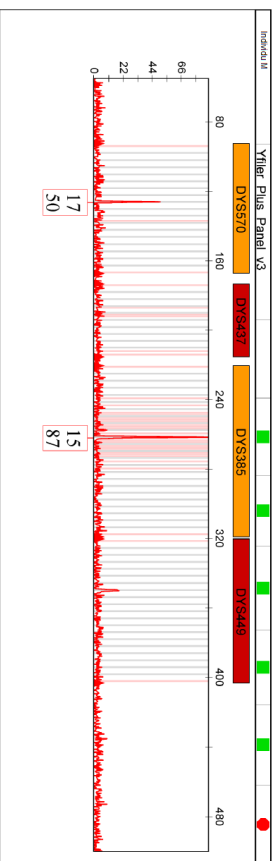
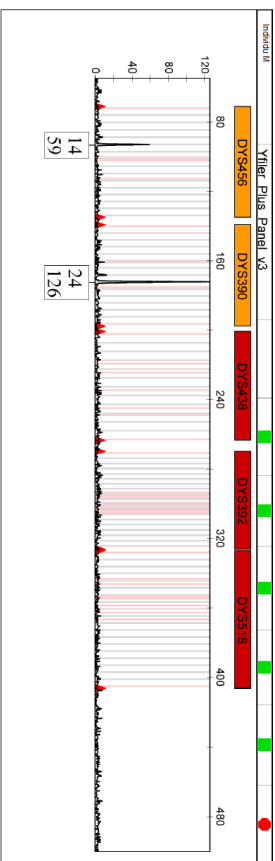
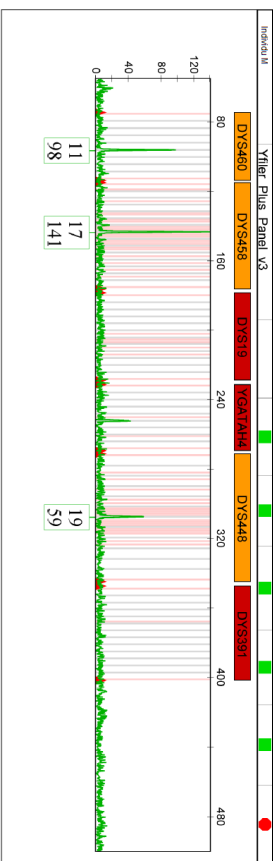
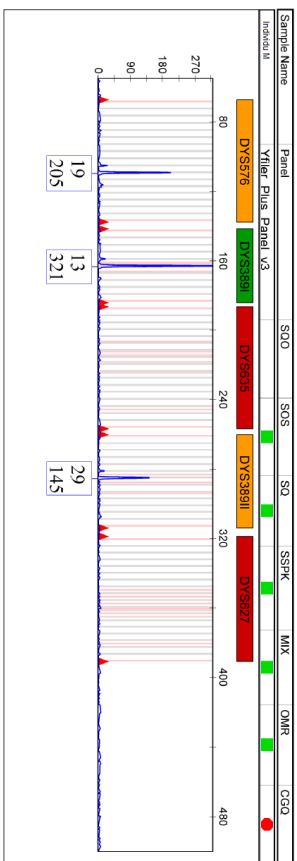


Figura 28 Electroferograma Y-STR individuo M

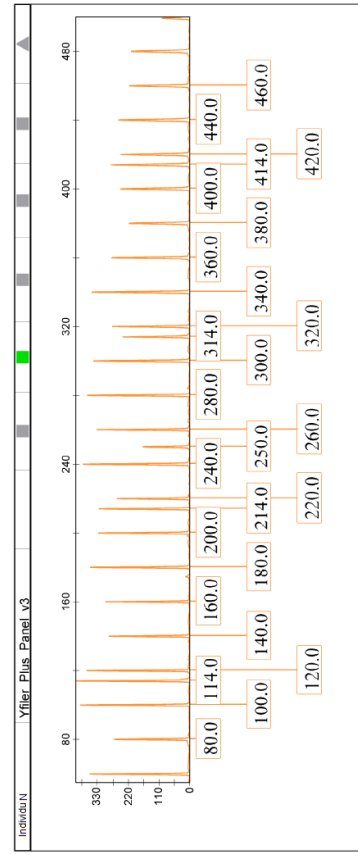
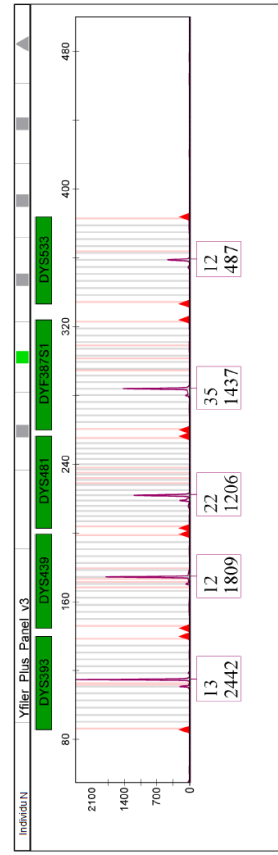
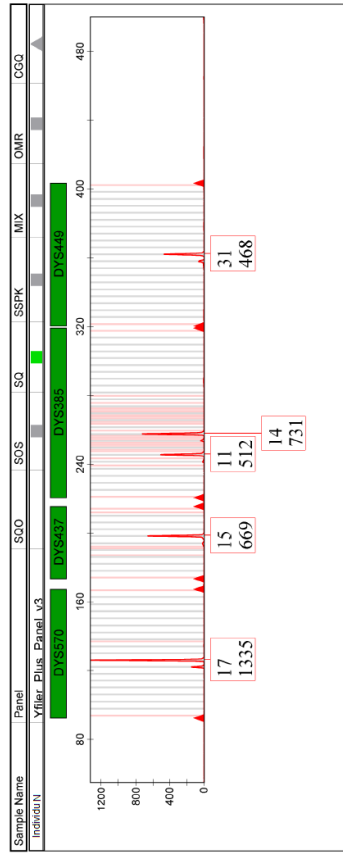
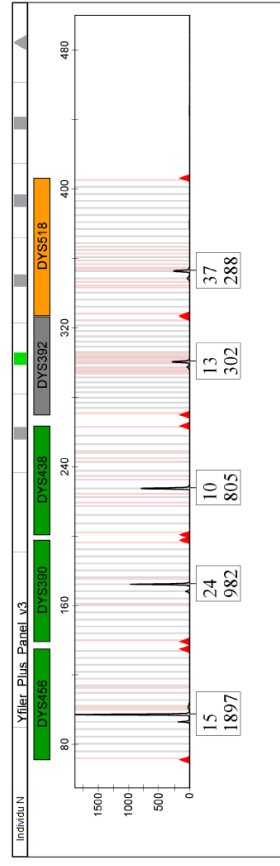
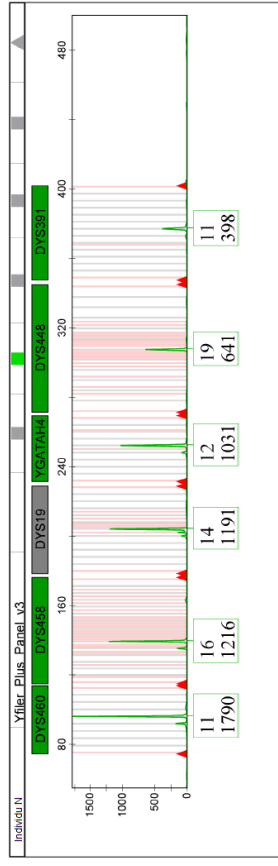
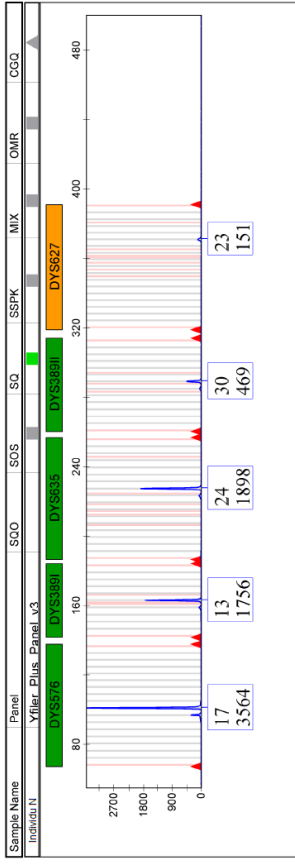


Figura 29 Electroferograma Y-STR individu N

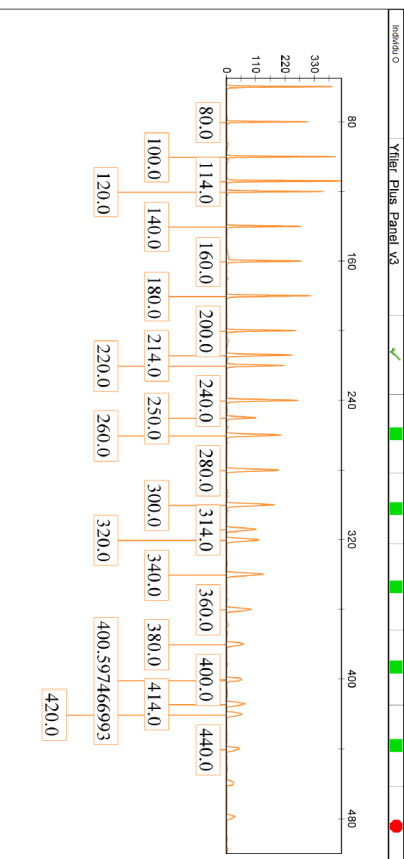
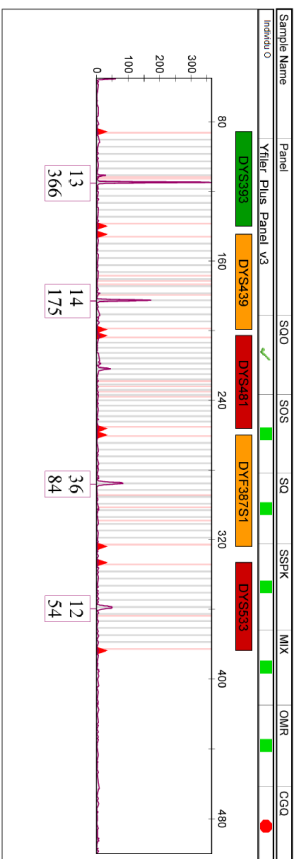
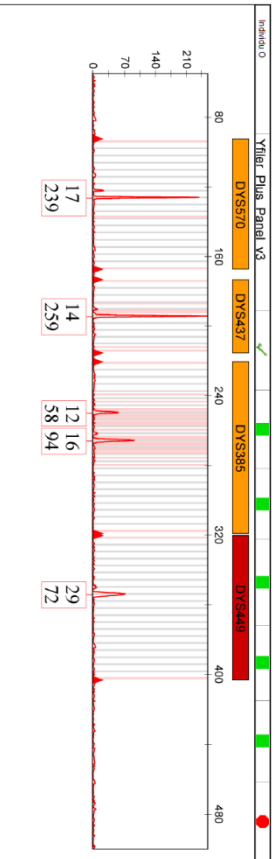
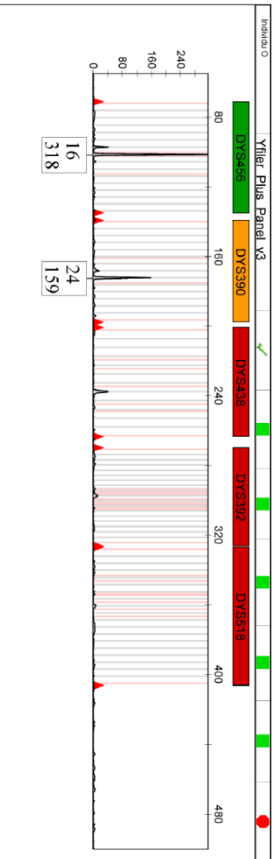
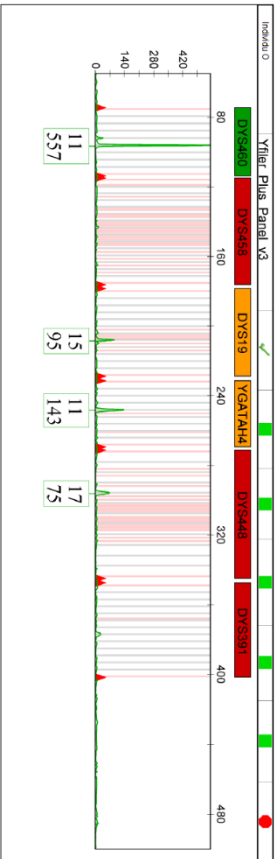
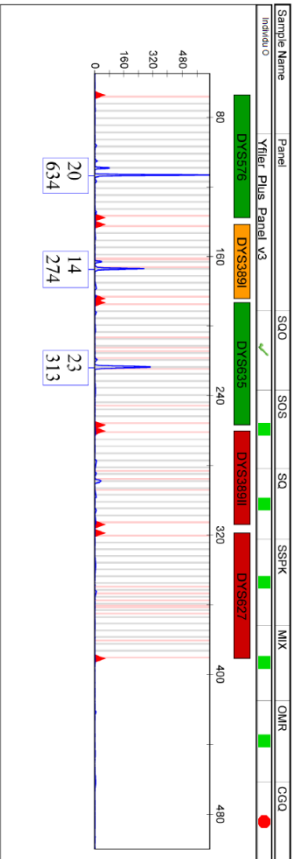


Figura 30 Electroferograma Y-STR individuo O

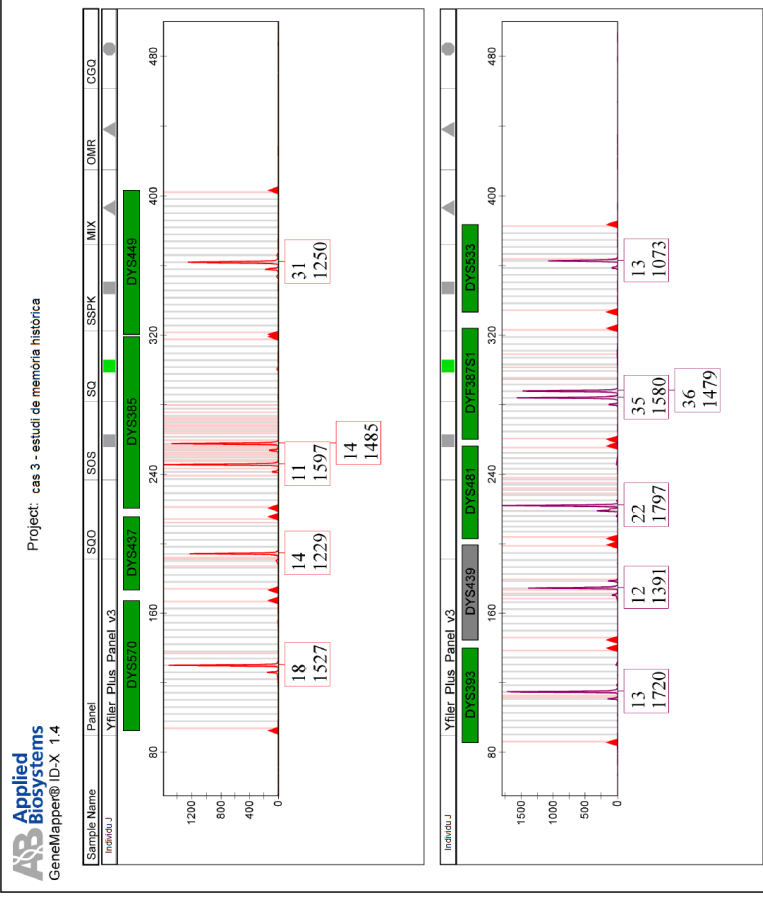
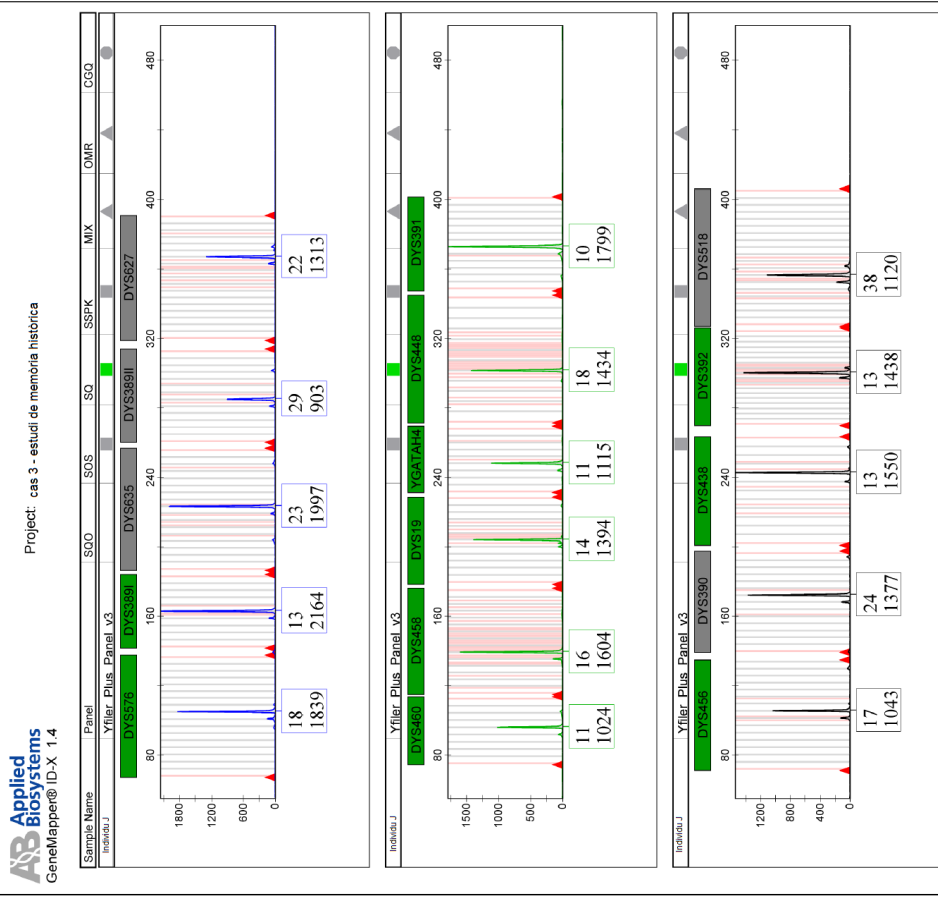


Figura 31 Electroferograma Y-STR individu indubitat J

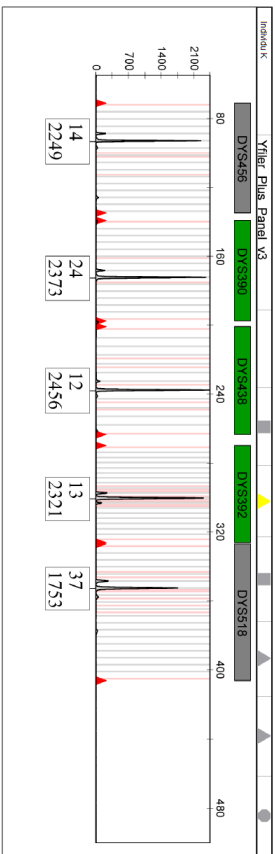
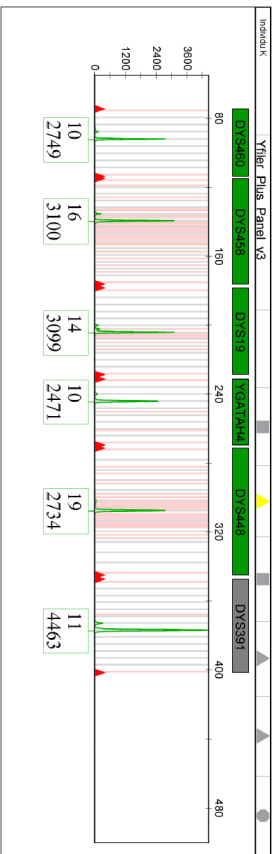
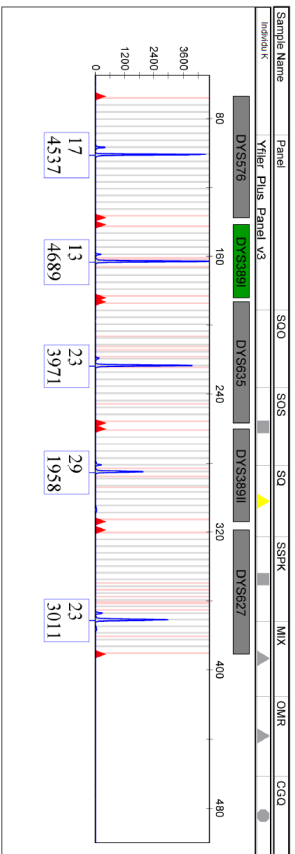
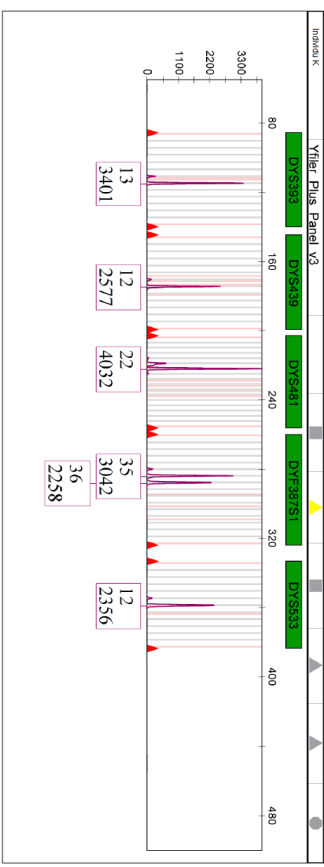
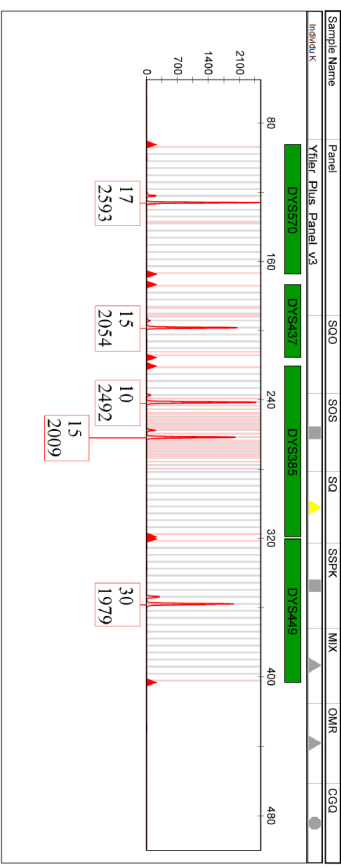


Figura 32 Electroferograma Y-STR individu inductat K



PERFILS GENÈTICS DEL CAS DE GERMANDAT

Taula 6 Genotip dels STRs autosòmics del cas de germanadat

Marcador	Individu R		Individu Q	
	Victima		Possible germana	
D3S1358	14	15	15	18
vWA	17	18	17	18
D16S539	11	15	9	13
CSF1PO	10	13	10	12
TPOX	8	8	8	8
Yindel				
AMEL	X	X	X	X
D8S1179	12	14	10	14
D21S11	30	33.2	30	33.2
D18S51	11	15	13	16
DYS391				
D2S441	11	15	11	15
D19S433	14	15.2	14	15.2
TH10	9	9	6	10
FGA	23	23	23	23
D22S1045	14	16	16	17
D5S818	10	11	11	12
D13S317	8	12	12	12
D7S820	10	10	8	10
SE33	29.2	34.2	22	29.2
D10S1248	14	14	14	16
D1S1656	14	15	15	17.3
D12S391	21	23	19	21
D2S1338	17	23	24	24

Taula 7 Seqüència de les mostres R i Q

Mostra	Regió editada	Seqüència
Mostra R	HVII-HVIII (126-642) HVI (16033-16196 16239-16578)	A263G -315.1C T16189C C16355T T16356C C16360T
Mostra Q	HVII-HVIII (95-640) HVI (16018-16553)	A263G -315.1C T16189C C16355T T16356C C16360T T16519C

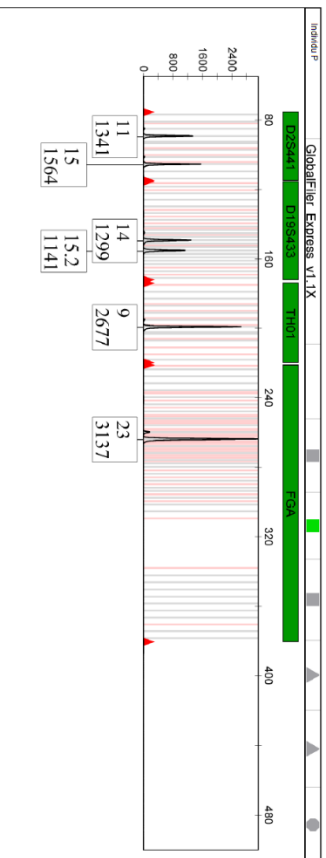
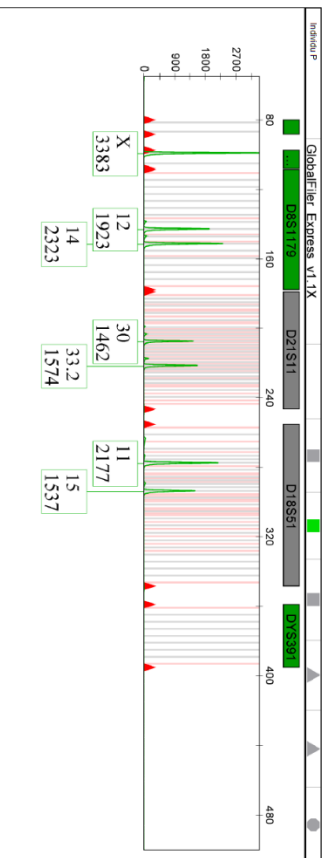
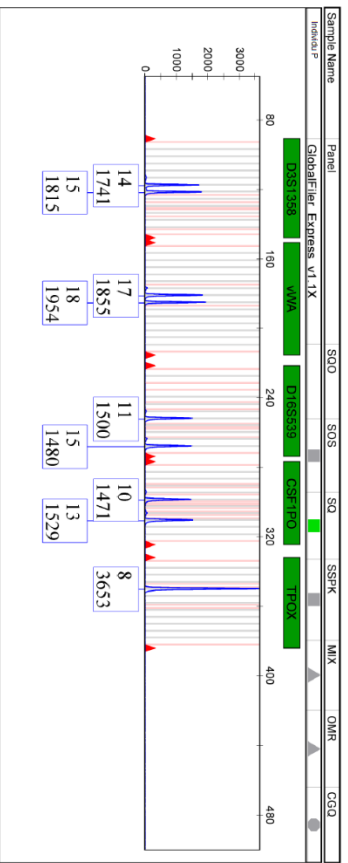
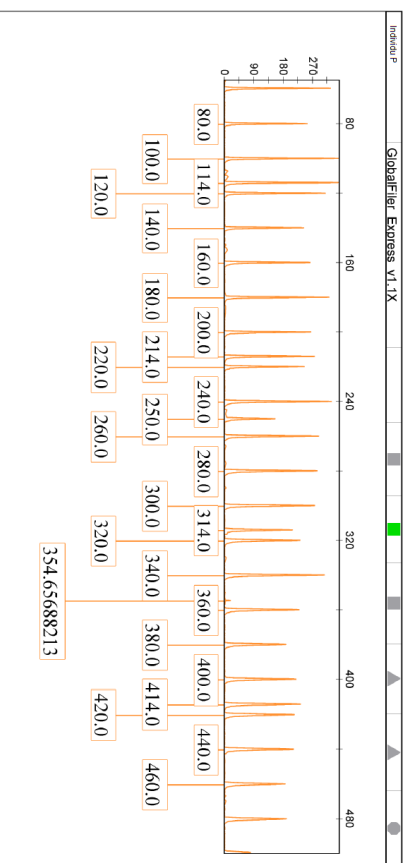
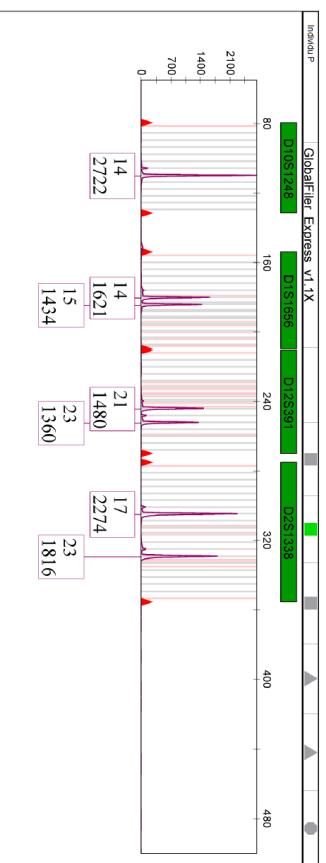
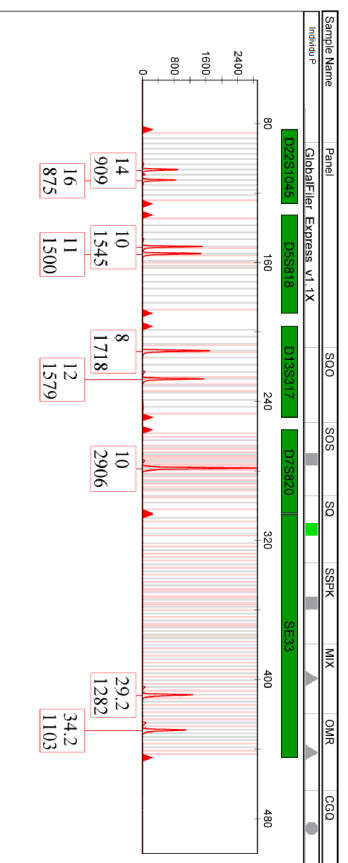


Figura 33 Electroferograma individu R



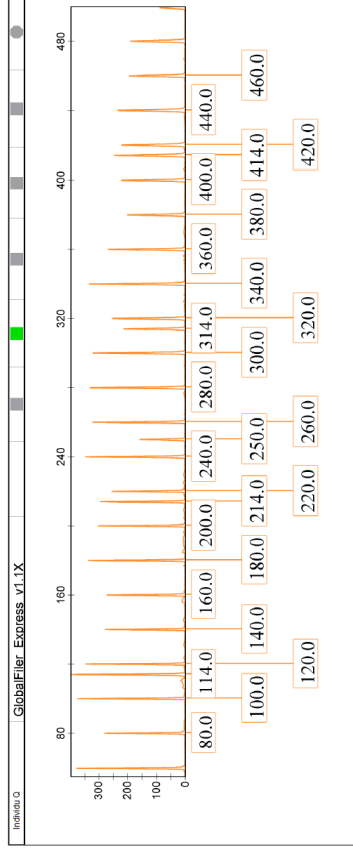
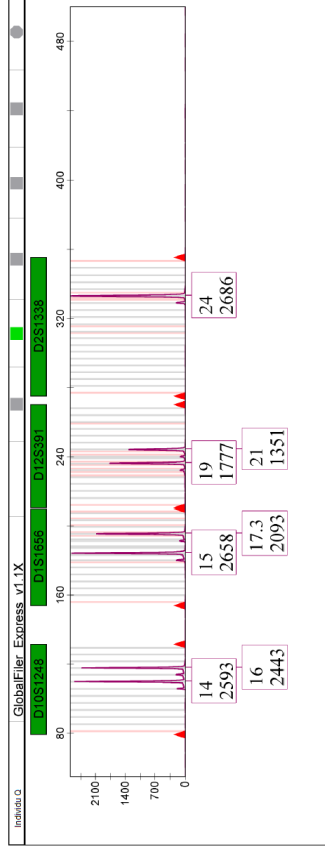
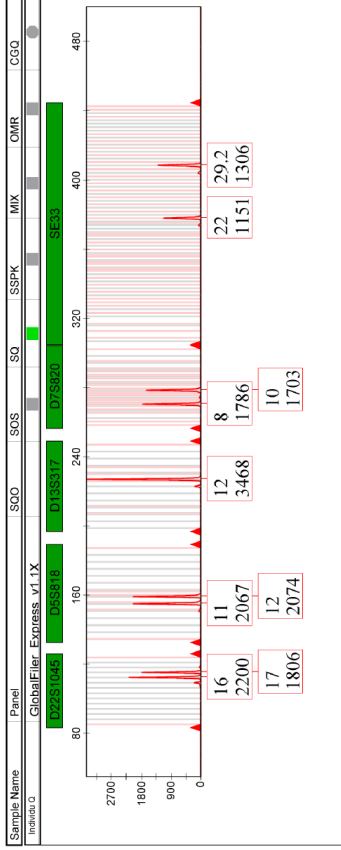
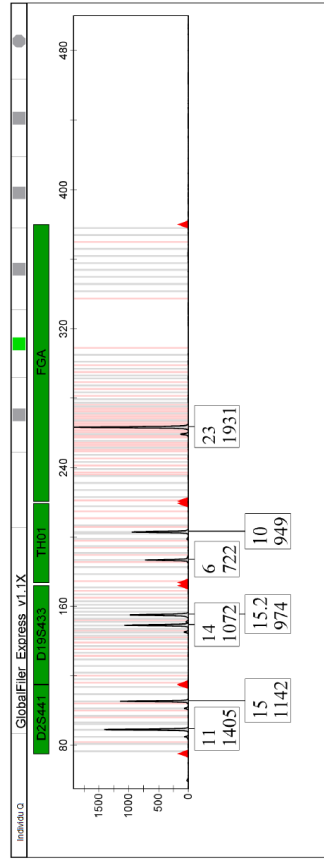
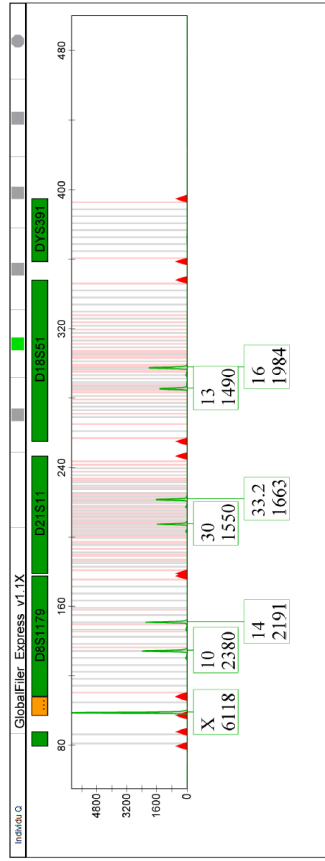
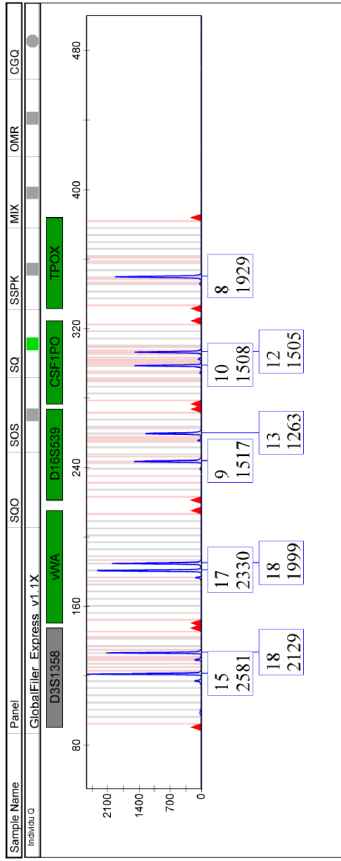


Figura 34 Electroferograma individu Q