

La variabilidad genética de los micro y minisatélites y su aplicación en medicina legal

Ángel Carracedo
Instituto de Medicina Legal
Universidad de Santiago de Compostela.

1. Introducción

La Medicina Legal ha sido una de las muchas disciplinas biomédicas en las que el espectacular avance de la Biología molecular ha tenido un profundo impacto. Concretamente una de sus especialidades la Genética forense ha experimentado en los últimos años una revolución total.

La Genética forense consiste en la aplicación del análisis genético de la diversidad humana para la resolución de ciertos problemas judiciales.

Son dos los tipos de pericias más comunes en los laboratorios de Genética forense: las investigaciones biológicas de la paternidad (tratadas en el capítulo anterior) y la criminalística biológica, es decir, el análisis de vestigios biológicos de interés criminal, como manchas de sangre, de esperma, saliva o pelos.

Particularmente en criminalística, las limitaciones de los marcadores genéticos utilizados hasta hace unos años eran notorias y la aplicación de la llamada “huella genética de ADN”, es decir, de polimorfismos de ADN “hipervariables”, ha supuesto un cambio radical a esta situación.

Existen otras pericias médico-legales menos frecuentes que también se han beneficiado con el uso de los polimorfismos de ADN, como la identificación de restos cadavéricos o la identificación de individuos o fragmentos corporales en catástrofes.

El hecho de que el recurso a la “prueba de ADN” tenga en muchas ocasiones un gran valor en términos de identificación pero otras veces no tanto (por ejemplo en muchas muestras minúsculas o muy envejecidas) hace que una correcta interpretación del valor probabilístico que otorga el perito sea de enorme importancia.

Todos estos aspectos serán contemplados en este artículo, en el que también trataremos, de forma breve, los esfuerzos de coordinación que se han realizado en este campo.

2. La huella genética: los polimorfismos del ADN

2.1. Minisatélites y microsatélites

El ADN expresivo o codificante, aunque es el más interesante desde el punto de vista médico, posee en general poca variabilidad, con la excepción de la región HLA. Desde el punto de vista del análisis del polimorfismo es mucho más interesante el ADN no codificante, que no es transcrito a ARN, y que representa, además, cuantitativamente, la mayor parte del genoma humano.

Aproximadamente la mitad del ADN no codificante es ADN repetitivo y aunque gran parte del mismo es extremadamente polimórfico, por diversos motivos, el ADN más utilizado con fines forenses es el ADN repetido en tándem y, dentro de él, los minisatélites y microsatélites de ADN. Estos consisten en repeticiones de fragmentos de ADN de número variable, por lo que genéricamente se denominan VNTR (“variable number of tandem repeats”) (1). Las repeticiones en el ADN microsatélite son de tamaño pequeño (de 2 a 5 pares de bases) por lo que se suelen denominar STRs (“short tandem repeats”). Las repeticiones en un *locus* minisatélite tienen un tamaño medio de alrededor de 30 pares de bases. Poniendo un ejemplo, un *locus* STR puede tener una estructura en su zona repetitiva y variable, como ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT ACTT... hasta un número n de repeticiones. Los individuos nos diferenciamos por el número de repeticiones de esa secuencia. Un individuo 8-12 para ese STR significa que tiene 8 veces la unidad de repetición (ACTT) en un lugar específico de un cromosoma (*locus* génico) y 12 veces en el mismo lugar de su otro cromosoma.

Los minisatélites y microsatélites además de ser extraordinariamente polimórficos (esto es, variables entre los individuos), poseen una herencia

mendeliana simple. Esto significa que el individuo 8-12, que antes pusimos de ejemplo, ha heredado uno de los alelos de su madre y otro de su padre biológico. Existen también secuencias repetitivas en ADN codificante, que son de gran importancia en Medicina, pues la inestabilidad de algunos trinucleótidos (CCG y CAG), conocidas como mutaciones dinámicas son la causa de enfermedades genéticas como el síndrome del X frágil, la distrofia miotónica, la atrofia muscular espinal y bulbar o la enfermedad de Huntington entre otras.

La inestabilidad de ADN microsatélite y minisatélite (de zonas no codificantes) en cánceres humanos, reflejo muchas veces de mutaciones en genes reparadores del mismatch (hMLH1, hMSH2, hPMS1, hPMS2) son también muy importantes como factor pronóstico de tumores y para conocer su génesis, especialmente en cáncer colorrectal.

En general, como veremos, los polimorfismos de ADN minisatélite van siendo substituidos en Medicina forense por STRs (en general de 4 bp en la unidad de repetición).

Al contrario que los minisatélites que aparecen sobretudo en regiones teloméricas, los STR son muy abundantes por todo el genoma y aparecen por media cada 6-8 kb. Esta frecuencia, junto con su polimorfismo, es el motivo por el que son marcadores esenciales para el análisis de ligamiento. Son imprescindibles pues para la ubicación de genes y muchas enfermedades se diagnostican todavía mediante análisis de ligamiento con STRs (la poliquistosis renal, por ejemplo).

Actualmente conocemos muchos datos de secuencia y de variación en poblaciones humanas de todos los polimorfismos minisatélite y microsatélite que se utilizan en Medicina Forense. Los minisatélites en general son relativamente complejos con ciertas variaciones en la unidad de repetición. Algunos poseen, además elevadas tasas de mutación (como el reconocido por la sonda MS1). Cuando esta tasa de mutación es elevada se desaconseja su uso con fines forenses.

Los microsatélites pueden ser tres tipos: simples, compuestos y complejos. Simples son aquellos que poseen una única unidad de repetición en algunos casos con algún alelo que posee alguna inserción o delección (“non-consensus alleles”). Estos raros alelos son en general el más pesado o el más ligero para cada sistema, lo que ha sido indicado (2) como un posible mecanismo para prevenir la expansión a un número elevado de repeticiones o la extrema contracción a un número bajo (no polimórfico) de repeticiones. Entre estas clases de STRs se encuentran las repeticiones de tetranucleótidos HUMFES/FPS, HUMTH01, HUMF13A01 o el STR de 5 bp en la unidad de

repetición HUMCD4. Por ejemplo HUMFES/FPS posee una estructura (ATTT) 8-14. HUMTH01 posee una estructura (TCAT) 5-11 con un alelo de 173 bp (TCAT) 4CAT (TCAT) 5. Estos STRs simples poseen en general bajas tasas de mutación y notables diferencias entre poblaciones. Los STRs compuestos son aquellos en que los que dos unidades de repetición distintas poseen variabilidad dentro del mismo STR. Ejemplos son el HUMVWFA31A o el recientemente secuenciado (3) STR en el *locus* D12S391. Este último posee una estructura (CAGA) 6-8 (TAGA) 9-20.

En general estos sistemas poseen una tasa de mutación baja-media y más uniformidad entre distintos grupos poblacionales.

Los STRs complejos son sistemas de elevado polimorfismo y gran complejidad con numerosas unidades de repetición distintas y muchas inserciones y deleciones de tamaño diverso. Ejemplos son los STR denominados HUMACTBP2, HUMFIBRA o el STR situado en el *locus* D21S11. Todos ellos poseen tasas de mutación bastante elevadas (pero todavía aceptables a efectos forenses ya que son inferiores al 1%) y una notable uniformidad entre poblaciones.

3. Métodos de análisis de polimorfismos de ADN hipervariable

3.1. Análisis de polimorfismos de ADN minisatélite con sondas

Los primeros polimorfismos de ADN utilizados con fines forenses fueron polimorfismos en ADN minisatélite, que se identificaban como RFLPs (polimorfismos basados en la longitud de los fragmentos de restricción). En 1985, Jeffreys y col.(4), basándose en que la región hipervariable de la mioglobina estaba flanqueada por una repetición directa de 9 bp característica de la duplicación de secuencias blanco generada por elementos transponibles, sugirieron que algunas regiones hipervariables podían estar relacionadas por transposición. Posteriores experimentos no confirmaron esta hipótesis, pero se pudo observar que la homología parcial existente entre las secuencias de varias regiones hipervariables daba lugar, hibridando en condiciones poco rigurosas la secuencia de 33 bp con ADN genómico, a la aparición de un complejo patrón de bandas para cada individuo. Jeffreys y col.(4) consideraron que estos patrones serían prácticamente específicos para cada individuo, y los denominaron "DNA fingerprints" (huellas genéticas). Las bandas que aparecen en un patrón de "DNA fingerprint" corresponden a distintos *loci*, hipervariables o no, con secuencias relacionadas entre

En la práctica esta metodología tuvo una escasa utilización pues era difícil la estandarización y creación de bases de datos y el uso de estas sondas originaba serios problemas de interpretación bioestadística de los resultados.

Trabajando sobre el fenómeno de la homología parcial, Nakamura et al. (1) en 1987, realizaron un estudio sistemático utilizando oligonucleótidos con las secuencias conocidas de varios *loci* hipervariables como sondas para analizar una librería genómica humana. Una vez hubieron seleccionado los clones positivos (que hibridaban con alguno de los oligonucleótidos), usaron estos clones como sondas en un análisis por RFLP en individuos elegidos al azar. De esta manera, el grupo de Nakamura fue capaz de caracterizar unos 200 *loci* hipervariables, que denominaron VNTRs. El uso de sondas multi-*locus* fue pues pronto sustituido mediante la determinación de *loci* VNTR individuales mediante sondas de *locus* único (SLPs, “single *locus* probes”) que, con condiciones de hibridación rigurosas, permiten la detección de *locus* minisatélites únicos. Este tipo de sondas aún se utiliza con frecuencia, fundamentalmente en investigaciones de la paternidad pues detectan *loci* minisatélites enormemente informativos. El uso de las SLPs para detectar polimorfismos minisatélites presentó, como más adelante comentaremos, algunos problemas iniciales, que llevaron a la necesidad lógica de una estandarización obligada de la prueba. Para empezar son cientos los polimorfismos de ADN minisatélite descritos que pueden ser detectados con decenas de enzimas de restricción diferentes. Si cada laboratorio utilizase sus propias sondas y enzimas sería enormemente difícil poder comprobar un resultado en otro laboratorio y se imposibilitaría una necesidad legal básica: la realización de contra-pericias o segundas opiniones.

En Europa, gracias a la iniciativa EDNAP (“European DNA Profiling Group”) se estandarizó el uso de HinfI como enzima de restricción y se validaron varias sondas SLPs de las que las más utilizadas son las denominadas YNH24, MS43a y MS31. Reconocen estas sondas *loci* minisatélite de extraordinaria variabilidad que se puede medir por el número de heterocigotos que es superior al 90% en todos los minisatélites que se usan. Un problema del uso de SLPs es que los individuos no pueden ser caracterizados exactamente por el número de repeticiones en el *locus* minisatélite y solamente lo pueden ser por el tamaño de los fragmentos de restricción, tamaño que puede variar según la metodología utilizada. Ello obligó a una estandarización muy rigurosa de la misma. Por otra parte los alelos de los polimorfismos detectados por SLPs no pueden ser separados en clases discretas y la estima de frecuencias se hace más compleja.

Existen distintos métodos de estimas de frecuencias como las denominadas de clases fijas (“fixed bins”) (5) o ventanas deslizantes (“sliding windows”) (6) pero cada vez va siendo más común la utilización de métodos puramente bayesianos (estimas kernel de funciones de densidad) (7-9). Esas estimas de frecuencias son fundamentales, como veremos, para calcular la

probabilidad de paternidad o la probabilidad de que una mancha provenga de un individuo.

3.2. Análisis de polimorfismos de ADN mediante PCR

Aunque en investigación de la paternidad el uso de SLPs ha supuesto una mejora metodológica importante y todavía son muy utilizadas, su uso en criminalística posee importantes limitaciones. La primera es la imposibilidad de análisis de muestras minúsculas (por insuficiencia de la cantidad de ADN que se puede extraer) como pequeñas manchas de sangre, de esperma o pelos, que suponen, además, la mayor parte del trabajo forense. Otro problema es el análisis de muestras degradadas, tan frecuentes en casos médico-legales, con las que puede ser imposible obtener resultados con SLPs, ya que las sondas usadas detectan frecuentemente RFLPs de más de 5 kb. Un problema menor es la laboriosidad del método y el tiempo de análisis, que implica que un problema médico-legal (una mancha o una paternidad) no pueda ser solucionado en menos de dos días con SLPs. El análisis de polimorfismos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) solucionó muchos de estos problemas y actualmente la mayoría de los vestigios biológicos de interés criminal se analizan utilizando esta técnica.

El primer sistema analizado por PCR con fines forenses fue un polimorfismo de ADN codificante de la región HLA: el *locus* HLA DQA1 (10), que se detectaba mediante sondas que reconocen cada alelo del sistema previamente fijadas a una membrana. Esta metodología se denomina dot-blot con sondas ASO (“allele specific oligonucleotides”). Hoy existen métodos más sencillos para analizar este sistema (11), pero el uso de “dot-blot” es popular en los laboratorios forenses por su comodidad, principalmente utilizando el “Polymarker” (Amplitype PM, Perkin-Elmer), un kit comercial que por “dot-blot” permite el análisis, a partir de una muestra única (un pelo por ejemplo), de cinco polimorfismos de ADN simultáneamente, con un poder de discriminación superior al 99%. Pero los polimorfismos de más interés analizables por PCR son, sin embargo, los minisatélites y los microsatélites (STRs), especialmente estos últimos que son los más utilizados. Entre los STRs se usan especialmente las repeticiones de tetranucleótidos ya que los STRs de dos nucleótidos, aunque son muy frecuentes y fáciles de amplificar, poseen problemas como la presencia de bandas “tartamudas” (por “slippage” en la amplificación) que hace que uso con fines forenses no sea considerado apropiado. Las grandes ventajas de los STRs son su estabilidad y la posibilidad de PCR multiplex con las que se pueden amplificar varios *loci* mini o microsatélite simultáneamente a partir de una muestra minúscula. El análisis de los

productos amplificadas se ha facilitado en gran medida gracias al uso de fluorocromos y sistemas automatizados (secuenciadores automáticos de ADN) que permiten la visualización de varios mini o microsátélites simultáneamente. Actualmente se consiguen analizar hasta siete STRs a partir de la misma muestra biológica utilizando estos sistemas automáticos y PCR multiplex, con un poder de discriminación enorme (12). El análisis de polimorfismos de ADN por PCR tiene una ventaja adicional al empleo de sondas, ya que los polimorfismos en ADN repetitivo pueden ser separados en clases discretas de alelos y, éstos, pueden ser fácilmente clasificados por el número de repeticiones, lo que facilita enormemente la estima de frecuencias. Los polimorfismos analizables por PCR antes de ser aceptados para la práctica forense deben cumplir una serie de requisitos y pasar sucesivos controles de validación.

Entre los polimorfismos de ADN minisatélite amplificables por PCR (denominados AMP-FLPs) el más usado es el localizado en el *locus* D1S80 (pMCT118).

Entre los STRs los más usados son el HUMTH01, HUMvWA31, HUMFES/FPS y HUMF13A, todos ellos repeticiones de tetranucleótidos fáciles de amplificar simultáneamente y con un poder de discriminación conjunto del 99.9%.

3.3. PCR-MVR

Este tipo de polimorfismo de secuencia ha sido descrito recientemente por Jeffreys y col.(13), basándose en el estudio de las variaciones entre las secuencias de diferentes unidades de repetición dentro del *locus* D1S8, reconocido por la sonda MS32.

El análisis de la secuencia de algunos minisátélites ha demostrado que las unidades de repetición dentro de cada minisatélite rara vez son todas iguales, sino que muestran cierto grado de divergencia entre ellas. Hay evidencias de que los *loci* que poseen un mayor grado de variabilidad en su número de copias muestran un nivel bajo de variabilidad entre las secuencias de sus unidades, presumiblemente como consecuencia de una homogeneización de la secuencia de las unidades provocada por fenómenos como la recombinación desigual. Sin embargo, el análisis de la secuencia de alelos clonados ha revelado el mantenimiento de cierto grado de variabilidad entre las secuencias de las unidades de repetición, aún en el caso de los minisátélites más variables en su número de copias. En estos *loci* hipervariables, unidades de repetición diferenciadas por la substitución de una base por otra están presentes en un número variable a lo largo del bloque de repeticiones, y esto

permite considerar a estas unidades como intermediarias en un proceso de fijación por entrecruzamiento. El mencionado estudio de Jeffreys y col.(13) demostró la existencia de dos clases de unidades de repetición, que diferían una de otra en la presencia o ausencia de un sitio de restricción para el enzima HaeIII (unidades HaeIII+ y HaeIII-). Los patrones de disposición de estas unidades dentro de los alelos del *locus* MS32 pueden ser analizados por PCR, mediante la amplificación por separado de los fragmentos terminados en cada uno de los tipos de unidades. La comparación de ambas amplificaciones permite el establecimiento de un código inequívoco que identifica la pareja de alelos presentes en el ADN genómico de un individuo. Las ventajas que esta técnica presenta sobre el análisis de los polimorfismos de longitud son:

a) La identificación de una muestra viene dada por ella misma, y no hay necesidad de analizar estándares para la identificación de los alelos (por ejemplo, marcadores de peso molecular).

b) El análisis no está sujeto a errores de medición en la migración de los fragmentos, y es inmune a la distorsión de los geles y a los desplazamientos de bandas en aquellos.

c) La comparación de dos muestras se hace mediante el código generado por cada una de ellas, y no hace falta el compararlas directamente.

Sin embargo, la aplicación de los MVRs al diagnóstico biológico de la paternidad está limitada por la altísima tasa de mutación de novo que presenta el *locus* MS32.

Recientemente han sido descubiertos otros minisatélites accesibles a tecnología MVR. Entre los más interesantes destacan los detectados por las sondas MS31 y MS205. Este último posee un gran interés para el análisis de variación en poblaciones humanas y como otros minisatélites posee una elevada tasa de mutación que está polarizada a un extremo del mismo.

4. Aplicaciones médico legales de los polimorfismos de ADN

Como hemos dicho en la introducción, el análisis de los polimorfismos de ADN ha supuesto un cambio radical en las posibilidades del laboratorio de Genética forense.

En la investigación de la paternidad antes del desarrollo de esta nueva metodología, se solucionaban la casi totalidad de los casos con los marcadores clásicos. El análisis del polimorfismo del ADN ha simplificado la prueba, la ha hecho más barata y ha permitido, además, un mejor abordaje de los casos de difícil solución como aquellos en los que el presunto padre ha fallecido y hay que realizar la investigación de la paternidad a través de restos

cadavéricos o de familiares directos del mismo, o en los diagnósticos prenatales de paternidad (en casos de violación, por ejemplo). Todos estos casos eran difícilmente abordables con la metodología anterior al descubrimiento de los polimorfismos de ADN repetitivo.

En criminalística biológica la revolución ha sido total, particularmente en el análisis de manchas de esperma, de pelos y cabellos, saliva, o manchas minúsculas de sangre, dado que, en estos vestigios, se podía dar muy poca información sobre la persona a quien pertenecen utilizando marcadores clásicos. Hoy a partir de un único cabello o de un mínimo número de espermatozoides recogidos en cavidad bucal o una mancha envejecida y minúscula de sangre se puede, en muchas ocasiones, aportar datos de gran valor sobre la individualidad de ese vestigio, lo que era totalmente impensable hace pocos años. Hay que prestar especial detalle al término “en muchas ocasiones” que hemos expresado en el párrafo anterior, para no crear falsas expectativas sobre el alcance de la prueba. Como más adelante veremos, en muchas ocasiones se pueden otorgar valores de coincidencia entre una mancha y un individuo enormemente altas, pero otras veces no tanto. Por ejemplo, en una mancha minúscula y muy deteriorada por el envejecimiento o las condiciones ambientales a las que estuvo sometida, es posible que sólo se pueda analizar un único polimorfismo de ADN que puede no poseer un excesivo valor en términos de identificación. Es posible, también, que no pueda ser analizado ningún polimorfismo de ADN por estar éste totalmente degradado o ausente. Por ejemplo si un pelo no posee bulbo será negativo cualquier intento de amplificación de ADN.

Está siendo especialmente importante la aplicación del polimorfismo del ADN en los delitos contra la libertad sexual, delitos en los que ante la negativa del presunto culpable no suelen existir más pruebas indiciarias que las proporcionadas por posibles restos de esperma en prendas y en cavidad vaginas o anal. El esperma es un vestigio idóneo para el análisis de ADN y los marcadores clásicos apenas aportaban datos de utilidad salvo en casos excepcionales.

Además, existe la posibilidad de realizar bancos de datos de ADN de delincuentes convictos de delitos contra la libertad sexual, delitos que, como es sabido tienen elevadas cifras de reincidencia. Otra aplicación importante del polimorfismo del ADN es la identificación de restos óseos o de cadáveres, para los que hasta ahora sólo cabía la utilización de procedimientos de antropología física y odontología forense. Hoy día, aún en restos antiguos, y a partir, por ejemplo, de piezas dentarias o fragmentos óseos se puede analizar el ADNmt o STRs con lo que la existencia de algún ascendiente o des-

endiente indubitado suele ser suficiente para establecer una relación de parentesco.

En ocasiones en los que se prevé la dificultad de identificación de cadáveres o restos cadavéricos puede ser útil el recurso a poseer fichas genéticas previas de los individuos, como se han realizado en personal militar en situación de guerra.

También en la asignación de restos cadavéricos a individuos e identificación de estos en el caso de grandes catástrofes, el recurso a los polimorfismos de ADN ha demostrado ser de gran utilidad.

5. El valor de la prueba de ADN

La prueba de ADN aplicada a criminalística tiene, como hemos visto hasta ahora, cuatro etapas básicas:

5.1. Análisis laboratorial de la muestra, lo que incluye analizar el mayor número de polimorfismos de ADN posible, obteniendo así un perfil genético de la muestra objeto de análisis. (por ejemplo podemos concluir que la muestra posee los grupos HLA DQA1 4-3, HUMTH01 8-10, FES/FPS 6-12 y vWA31 10-11).

Comparación de los resultados con los obtenidos en el inculgado o en la víctima.

Ello implica que si aparece un vestigio biológico en la víctima la comparamos con el análisis genético del agresor, o bien, si, por ejemplo, aparece una mancha de sangre en el agresor la comparamos con la sangre de la víctima. Puede entonces ocurrir que los patrones sean diferentes en uno o más grupos con lo que concluiremos que ese vestigio biológico no corresponde con el individuo con el que lo comparamos.

Puede suceder que los polimorfismos de ADN analizados en el vestigio se correspondan con el individuo con el que se compararan. Entonces hay que valorar la probabilidad de que ese vestigio provenga de ese individuo lo que depende de la frecuencia de esos grupos en la población. La tercera etapa del análisis es pues la valoración probabilística de la prueba en el caso de coincidencia de patrones.

Por último la emisión del correspondiente informe médico-legal y, en su caso, la comunicación de los resultados en el juicio oral.

Estas etapas de análisis laboratorial que concluyen en el informe médi-

co-legal tienen un precedente básico que es la correcta recogida y envío del vestigio al laboratorio médico-legal. Estos aspectos han cobrado una importancia considerablemente mayor porque el valor de la prueba es, en ocasiones trascendente. Así aspectos frecuentemente descuidados, como la denominada "cadena de custodia" del vestigio, han pasado a tener una enorme trascendencia. Del mismo modo, con la importancia que la prueba posee en los delitos contra la libertad sexual, el que se analice el esperma en un porcentaje mínimo de los delitos denunciados y que no llegue muchas veces en buenas condiciones a los laboratorios forenses debería ser inmediatamente corregido.

5.2. La valoración de la prueba biológica

Uno de los aspectos cruciales es el de la correcta valoración de la prueba por parte del perito y la comunicación al juez del valor obtenido.

Esta valoración y sobretodo su comunicación no está exenta de problemas tanto en la investigación de la paternidad (14) como en criminalística. Especialmente en este caso hay que tener presente que la pericia de ADN, en caso de coincidencia entre la mancha y el acusado, puede tener un enorme valor, pero también este valor puede ser relativo. Para evaluarlo hay que acudir a las probabilidades, contempladas desde la perspectiva de dos hipótesis alternativas y expresadas como una proporción entre ambas (15). Con frecuencia se incurre en las llamadas falacias del fiscal y de la defensa y no se contempla el valor de la prueba desde una perspectiva justa (15). La única solución pasa por un empleo correcto por los peritos de las probabilidades y un entendimiento suficiente por los jueces, abogados y fiscales de conceptos básicos de teoría de la probabilidad.

6. Referencias

1. Nakamura, Y., Leppert, M., O'Connell, P., Wolff, R., Holm, T., Culver, M., Martin, C., Fujimoto, E., Hoff, M., Kumlin, E., White, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622 (1987).
2. Urquhart, A., Kimpton, C., Downes, T., Gill, P. Variation in short tandem repeat sequences. *Int. J. Leg. Med.* 107:13-20 (1994)
3. Lareu, MV., Barros, F., Sala, A., Pestoni, C., Muñoz, I., Rodriguez, MS., Carracedo, A. D12S391: a highly useful STR for forensic purposes. En A. Carracedo (Ed.) *Advances in Forensic Haemogenetics*, Vol. 6. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. 1996.

4. Jeffreys, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73 (1985).
5. Budwole, B., Giusti, A., Wayne, J., Baechtel, F., Fourney, R., Adams, D., Presley, L., Deadman, H., Monson, K. Fixed bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci for use in forensic comparisons. *Am. J. Hum. Genet.* 48:841-855 (1991).
6. Gill, P., Sullivan, K., Werret, D. The analysis of hypervariable DNA profiles: problems associated with the objective determination of a match. *Hum. Genet.* 85: 75-79 (1990).
7. Valverde, E., Análisis del polimorfismo en los loci minisatélite D2S44, D7S21 y D12S11. Aplicaciones médico-legales". Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 1993.
8. Valverde, E., Cabrero, C., Cao, R., Rodríguez-Calvo, MS., Díez, A., Barros, F., Alemany, J., Carracedo, A. Population genetics of three VNTR polymorphisms in two different Spanish populations. *Int. J. Leg. Med.* 105: 251-256 (1993).
9. Valverde, E., Cabrero, C., Díez, A., Borrás, T., Carracedo, A. Allele frequency in the population of Spain using several single locus probes. En: Rittner, Ch., Schneider, F., *Advances in Forensic Haemogenetics* 4. págs. 187-190. Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg (1992).
10. Saiki, R., Bugawan, T., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQalpha DNA with allele specific oligonucleotides probes. *Nature*, 324: 163-166 (1986).
11. Barros, F., Carracedo, A., Lareu, MV., Rodríguez-Calvo, MS. Electrophoretic human leucocyte antigen HLA-DQA1 typing after polymerase chain reaction amplification. *Electrophoresis* 12: 141-145 (1991).
12. Kimpton, C., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E., Adams, M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Applic.* 3:13-22 (1993).
13. Jeffreys, A.J., MacLeod, A., Tamaki, K., Neil, D.L., Monckton, D. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354: 204-209 (1991).
14. Carracedo, A., Barros, F. El cálculo de la probabilidad en la prueba biológica de la paternidad. *Revista de Derecho y Genoma Humano* n°4. (1995) En imprenta.
15. Carracedo, A. La huella genética. En C. Romeo Casabona, Ed. Universidad de Deusto. Cap. 11. Bilbao. 1995.