

Pruebas de paternidad mediante ADN

DNA paternity test

Sandra P. Moreno-Valencia Bact¹, Cielo R. Pineda-Monsalve MSc²

Resumen: La investigación científica de la paternidad biológica es un caso especial de la determinación de la relación genética entre dos o más individuos, con base en los principios de la herencia mendeliana simple de los marcadores genéticos, en los que se establecen que los alelos se segregan en la meiosis de forma independiente y discreta. En la evaluación de las relaciones biológicas forenses la prueba de paternidad es el análisis más común, en el cual los perfiles genéticos de dos individuos (o tres si la madre está disponible) son utilizados para comparar la probabilidad relativa de que uno de ellos sea el padre contra la probabilidad de no estar relacionado con la ascendencia del otro individuo analizado. En este caso las repeticiones cortas en tándem (STR) son los marcadores genéticos no ligados más utilizados para la evaluación del parentesco debido a su alto polimorfismo, y a que los resultados obtenidos, usualmente con la aplicación de estadísticas robustas, favorecen la determinación de la relación. Las repeticiones cortas en tándem son típicamente examinadas por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante plataformas comerciales de múltiples loci de repeticiones cortas en tándem, eficientes y con gran poder de discriminación. Esta revisión describe el estado actual de las pruebas de paternidad mediante ADN, la metodología, el informe de los resultados y su interpretación, para facilitar su comprensión a los profesionales relacionados de una o de otra manera con estos análisis.

Palabras clave: Secuencias repetidas en tándem, reacción en cadena de la polimerasa, paternidad, perfilación de la expresión génica, pruebas genéticas.

Abstract: Scientific study of biological paternity is a special case of genetic relationship determination between individuals, based on simple mendelian inheritance principles of genetic markers, which establish that the alleles are segregate independently and discreetly during meiosis. The most common analysis of forensic biological relationships evaluation is the paternity test, which the genetic profiles of two individuals (or three if the mother is available) are uses to compare the relative probability of that one of them being the father against the probability of not is ancestrally related to the other analyzed individual. The short tandem repeats (STR) are the commonly used unlinked genetic markers for relationship evaluation due to their high polymorphism. Besides, the results usually favor the determination of the relationship when a robust statistical analysis is applied. The short tandem repeats analysis is typically by the polymerase chain reaction (PCR), using multiple short tandem repeats loci on commercial platforms, which are efficient and with high discriminating power. This review describes the current state of DNA paternity test, the methodology, the results report, and the interpretation, to facilitate their understanding to related professionals with these types of analysis.

Key words: Tandem Repeat Sequences, polymerase chain reaction, paternity, gene expression profiling, genetic testing.

Moreno-Valencia SP, Pineda-Monsalve CR. Pruebas de paternidad mediante ADN. *Medicina & Laboratorio* 2014; 20: 411-432.

¹Bacterióloga, Especialista en Investigación Criminal, Laboratorio de Identificación Humana, Universidad Manuela Beltrán. Bogotá D.C., Colombia. e-mail: sandra.moreno@umb.edu.co

²Bacterióloga, MSc en Biología, Directora Laboratorio de Identificación Humana, Universidad Manuela Beltrán. Bogotá D.C., Colombia.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tienen conflicto de intereses
Medicina & Laboratorio 2014; 20: 411-432

Módulo 1 (La clínica y el Laboratorio), número 106. Editora Médica Colombiana S.A. 2014[©]

Recibido el 10 de septiembre de 2014; aceptado el 19 de octubre de 2014

El acelerado desarrollo de las técnicas de biología molecular ha tenido un alto impacto en la genética humana, especialmente en la identificación humana y, por supuesto, en la investigación de la paternidad biológica. De los métodos manuales se pasó a métodos altamente tecnificados y controlados que aumentaron la calidad y la velocidad de los análisis de los marcadores genéticos, conocidos como repeticiones cortas en tándem (STR, del inglés *short tandem repeat*), los cuales han sido empleados hace más de dos décadas por la comunidad científica genético-forense. El aumento de la demanda en los laboratorios para procesar una alta cantidad de muestras ha impulsado a las empresas manufactureras a desarrollar, además de equipos automatizados y de última generación, diferentes estuches de amplificación (multiplicación de copias de ADN) utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) que involucran la tipificación simultánea de hasta 21 marcadores de repeticiones cortas en tándem.

América Latina, y en especial Colombia, no es ajena a este avance tecnológico ni tampoco a la relevancia que ha adquirido el derecho a la identidad y el uso de la genética para la resolución de los casos civiles de filiación. Por tal razón, se han implementado en los laboratorios particulares y del Estado los métodos utilizados y recomendados por la comunidad científica internacional para la determinación de la paternidad. Este artículo, además de describir algunos de los aspectos más importantes en el análisis genético de la paternidad, los tipos de casos (simples o complejos) y los posibles estudios complementarios, expone paso a paso el proceso de la realización de una prueba de filiación mediante ADN, desde la toma de la muestra, pasando por el análisis técnico y terminando con el informe e interpretación de los resultados, para divulgar esta aplicación de la genética forense en la resolución de los casos de filiación y facilitar su comprensión a los profesionales relacionados con este proceso.

Legislación de las pruebas de paternidad en Colombia

El código de la Infancia y la Adolescencia de Colombia (Ley 1098 de noviembre del 2006) en el Artículo 25 establece: «Los niños, las niñas y los adolescentes tienen derecho a tener una identidad y a conservar los elementos que la constituyen como: el nombre, la nacionalidad y la filiación conformes a la ley (...)» [1]. Como parte de la identidad, la filiación se define como «el vínculo jurídico que une a un hijo con su madre y con su padre y consiste en la relación de parentesco establecida por la ley entre un ascendiente y su descendiente de primer grado (...)» [2]; sin embargo, en nuestro país continúa siendo problemático el reconocimiento del derecho a la identidad en su componente filiación. Entre mayo y noviembre de 2013 el Laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses, como parte del cumplimiento de los requerimientos de las autoridades judiciales, reportaron un promedio de 620 casos mensuales de filiación [3]; además de los casos analizados por los laboratorios particulares acreditados en Colombia por orden de las autoridades judiciales en el mismo período de tiempo.

La Ley 45 de 1939 establece que los hijos naturales son aquellos nacidos en condiciones de incesto, concubinato o adulterio, y en su artículo cuarto permite la investigación de la paternidad con base en los principios biológicos. Por su parte, la Ley 75 de 1968 dicta las normas

sobre filiación y avala la creación del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar; además, determina que el reconocimiento de los hijos naturales es irrevocable y que en todos los casos de investigación de la paternidad se deben realizar pruebas científicas del hijo y sus ascendientes, o de terceros indispensables, que permitan reconocer las características hereditarias semejantes entre el hijo y su presunto padre como elemento probatorio. Así mismo, esta Ley fortalece el recurso de la demanda para obtener el reconocimiento [4]. La Ley 721 de 2001, que modifica la Ley 75 de 1968, respalda la implementación de la prueba de ADN, con el uso de los marcadores genéticos, para establecer la paternidad y, por lo tanto, la identidad biológica del hijo natural; además, indica que la realización de estas pruebas está a cargo del Estado y que éste puede realizarlas directamente o a través de laboratorios públicos o privados que estén debidamente acreditados y certificados [5].

Conceptos básicos sobre el ADN para el estudio de la paternidad

A partir del descubrimiento de la estructura tridimensional (doble hélice) del ácido desoxirribonucleico (ADN) en 1953, su análisis ha evolucionado hasta convertirse en una herramienta indispensable y de rutina en muchas disciplinas, incluyendo las ciencias forenses. El ADN es la molécula que contiene toda la información hereditaria necesaria para formar las células y los tejidos, y cuya duplicación exacta de generación en generación asegura la continuidad genética y el desarrollo normal de un organismo [6,7]. Estructuralmente el ADN corresponde a dos cadenas de un polímero lineal que giran una alrededor de la otra para formar una doble hélice. La unidad repetida en la doble cadena corresponde al nucleótido, el cual está formado por tres unidades básicas: una molécula de azúcar, la desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada, que puede ser una purina, como la adenina (A) y la guanina (G), o una pirimidina, como la timina (T) y la citosina (C). La unión del azúcar a la base nitrogenada por un enlace glucosídico constituye el nucleósido y la unión mediante un enlace fosfodiéster entre el azúcar del nucleósido y el ácido fosfórico da lugar al nucleótido.

En las células eucariotas el ADN es empaquetado alrededor de las proteínas llamadas histonas para formar los nucleosomas, que se compactan aún más hasta formar las fibras de cromatina, las cuales se envuelven hasta formar los cromosomas que se encuentran en el núcleo de las células [7,8]. Este ADN nuclear constituye la dotación genética del individuo organizada en genes. En términos moleculares, un gen se define como la secuencia del ADN específica para la síntesis de un transcrito de ARN, que codifica para la secuencia de aminoácidos de una proteína particular. Las secuencias codificantes de los genes se denominan exones y se encuentran separados por secuencias que no son codificantes, denominadas intrones, que son eliminados del ARN mensajero después de la transcripción, para permitir que los exones se unan y puedan servir de molde para la síntesis de las proteínas en el proceso de traducción [6,8].

Más del 60% del genoma humano está compuesto por regiones intergénicas, no codificantes que se encuentran localizadas entre los genes y cuya función aún es desconocida [7,8]. La mayoría de estas regiones están compuestas por elementos de ADN repetidos, que pueden encontrarse entre otros como secuencias de ADN repetidas en tándem. El ADN repetido en tándem está formado por unidades de repetición colocadas unas junto a las otras en una misma secuencia

o región de repetición del ADN, y pueden ser de tipo: *i*) satélites, con repeticiones en tándem de tramos largos, *ii*) minisatélites, también conocidos como número variable de repeticiones en tándem (VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*), con una longitud de unidades repetidas de 15 a 50 pares de bases, y *iii*) microsatélites, conocidos como repeticiones cortas en tándem (STR) o repeticiones de secuencia simple (SSR, del inglés *simple sequence repeat*), con unidades repetidas de dos a seis pares de bases (ver figura 1) [8].

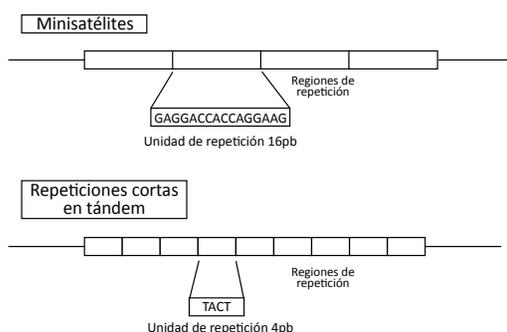


Figura 1. Esquema de los marcadores de ADN A. Minisatélite y B. Microsatélite. El número de unidades de repeticiones en tándem en las regiones repetidas varía entre los individuos, por lo que son usados en ciencias forenses para la identificación humana.

Las variaciones en el genoma entre los individuos de una población son denominados polimorfismos del ADN, que pueden ser de secuencia, cuando en un locus (posición) del cromosoma existe un cambio en la secuencia de nucleótidos, o de longitud, cuando difieren en el número de repeticiones en tándem. Entre los polimorfismo de secuencia se encuentran los polimorfismo de un nucleótido simple (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*), que involucran un cambio en un único par de bases o una mutación puntual, los minisatélites (repeticiones cortas en tándem) y los microsatélites. Para la detección de estos polimorfismos se han utilizado las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación del ADN. Por su parte, los polimorfismos de longitud incluyen los minisatélites y los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *restriction fragment length polymorphism*); estos últimos detectados utilizando enzimas de restricción [6,8].

Los polimorfismos del ADN son utilizados para los estudios de mapeo genético, en los que se denominan marcadores de ADN o marcadores genéticos. Las formas alternativas de los polimorfismos del ADN en un cromosoma se denominan alelos [8], los cuales son heredados uno de la madre y otro del padre, según los principios de la herencia mendeliana, y pueden ser homocigotos cuando las variaciones son las mismas o heterocigotos cuando son diferentes. La combinación de los alelos que hereda un individuo constituye el genotipo y el análisis de esta combinación en un loci determinado del ADN se denomina perfil genético, el cual es ampliamente utilizado en las pruebas de identificación humana [8]. Los loci seleccionados para la tipificación del ADN son los selectivamente neutros, es decir, que son heredados sin conferir ningún beneficio ni daño a la capacidad del individuo de reproducirse con éxito [9]. Las repeticiones cortas en tándem más utilizadas en los estudios de identificación humana son las que revelan un mayor polimorfismo poblacional, un elevado índice de heterocigocidad y una baja frecuencia de mutaciones [10].

La evolución del estudio de la paternidad en las ciencias forenses

Los primeros marcadores usados fueron los polimorfismos del grupo ABO, descubiertos en 1900 [11]. Para los años ochenta, empezaron a usarse de manera rutinaria en el análisis de

paternidad otros grupos sanguíneos (p. ej. Lewis, Kell, Rhesus) y algunas proteínas séricas pleomórficas (p. ej. la haptoglobina); sin embargo, mostraban poca variabilidad entre los individuos [12]. En 1985 se identificaron unas regiones de loci hipervariables denominadas minisatélites o repeticiones en tándem de número variable (VNTR) mediante la obtención de fragmentos de diferentes longitudes (entre 1 y 20 kb) de ADN genómico que fue digerido con enzimas de restricción [13], los cuales fueron separados por tamaño en gel de electroforesis y visualizados por Southern blot utilizando sondas multilocus que permitieron hibridizar diferentes minisatélites independientes de forma simultánea, dando como resultado patrones multibandas hipervariables conocidos como huellas de ADN, que son específicos para cada individuo. Estos patrones demostraron una probabilidad de coincidencia entre los individuos muy baja (menor a 3×10^{-11} usando una sola sonda y menor a 5×10^{-19} con dos sondas) [14], por lo que se implementaron en las ciencias forenses para hacer identificación humana.

A principios de la década de los noventa, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, se caracterizaron las primeras secuencias de repeticiones cortas en tándem (STR) humanas [15], las cuales corresponden a fragmentos cortos de ADN repetidos dentro de una secuencia, cuyo polimorfismo se debe al distinto número de copias del elemento repetido que puede aparecer en los individuos de una misma población [16]. Debido a las ventajas encontradas respecto al número variable de repeticiones en tándem (minisatélites), como el gran polimorfismo, la mayor sensibilidad, el mayor poder de discriminación, el análisis simultáneo de varios loci, el procesamiento más rápido y automatizado, la menor cantidad de muestra requerida, unos costos razonables y la posibilidad de obtener mejores resultados con ADN degradado, se introdujeron las repeticiones cortas en tándem en el ámbito forense [17-19]. Así mismo, gracias a la capacidad de los termocicladores (equipos para el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa) y de los equipos de análisis (analizadores genéticos automatizados) se logró analizar de forma simultánea muestras de diferentes personas para la identificación individual [18,20].

En 1993 fueron descritos los primeros sistemas automatizados multiplex que utilizaban tecnología basada en la fluorescencia, para detectar y medir las secuencias de repeticiones cortas en tándem amplificadas en la reacción en cadena de la polimerasa; sin embargo, la probabilidad de coincidencia entre individuos no relacionados era muy alta (menor que 1×10^{-14}) [21]. Posteriormente, se desarrollaron los sistemas multiplex que incluían el marcador del gen de la amelogenina XY [22] para determinar el sexo de los individuos, lo que dio paso a las pruebas multiplex de segunda generación. Actualmente, los casos en ciencias forenses, entre ellos las pruebas de paternidad, se realizan con diferentes estuches comerciales de secuencias de repeticiones cortas en tándem multiplex que son implementados en diferentes partes del mundo (ver [tabla 1](#)) [23] y que están basados en estudios poblacionales, con una probabilidad de coincidencia muy baja. Así mismo, otras fuentes de variación genética especializadas como los marcadores del cromosoma Y y el ADN mitocondrial son utilizados en las ciencias forenses [18].

Entre los principales sistemas de identificación humana en el mundo se encuentran el sistema de índice combinado de ADN (CODIS, del inglés *combined DNA index system*) del FBI (del inglés *Federal Bureau of Investigation*) de los Estados Unidos, en el que se incluyen 13 repeticiones cortas en tándem y el gen de la amelogenina [24]; el conjunto de normas europeas de loci (ESS, del inglés *European standard set of loci*) que incluye 12 marcadores [25], siete de ellos

en común con el CODIS; el sistema de unidades de loci de Inglaterra, que utiliza multiplex de segunda generación conocida como SGM [26], que incluye 10 marcadores genéticos, ocho de ellos compartidos con el CODIS, y el gen de la amelogenina; y el conjunto normalizado de loci de la Organización Internacional de Policía Criminal (Interpol), que se recomienda para la identificación humana el uso de siete de los 13 loci incluidos en el CODIS y el gen de la amelogenina (ver [tabla 1](#)) [27].

Tabla 1. Ejemplos de repeticiones cortas en tándem usadas en las pruebas de identidad humana en el mundo

| Locus | Secuencia repetida principal | Cromosoma | FBI-CODIS Estados Unidos | Conjunto de normas europeas de loci | Unidades de loci de Inglaterra | Conjunto normalizado de loci de la Interpol |
|----------|------------------------------|-----------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---|
| TPOX | AATG | 2 | X | | | |
| D3S1358 | AGAT | 3 | X | X | X | X |
| FGA | CTTT | 4 | X | X | X | X |
| D5S818 | AGAT | 5 | X | | | |
| CSF1PO | AGAT | 5 | X | | | |
| D7S820 | GATA | 7 | X | | | |
| D8S1179 | TATC | 8 | X | X | X | X |
| TH01 | TCAT | 11 | X | X | X | X |
| VWA | TCTA | 12 | X | X | X | X |
| D13S317 | TATC | 13 | X | | | |
| D16S539 | GATA | 16 | X | | X | |
| D18S51 | GAAA | 18 | X | X | X | X |
| D21S11 | TCTA | 21 | X | X | X | X |
| Amel | - | X, Y | X | | X | X |
| D1S1656 | TAGA | 1 | | X | | |
| D2S441 | TCTA | 2 | | X | | |
| D10S1248 | GGAA | 10 | | X | | |
| D12S391 | AGAT | 12 | | X | | |
| D22S1045 | ATT | 22 | | X | | |
| D19S433 | AAGG | 19 | | | X | |
| SE33 | AAAG | 6 | | | | |
| D2S1338 | TGCC | 2 | | | | |
| Penta D | AAAGA | 21 | | | | |
| Penta E | AAAGA | 15 | | | | |

Tomado y modificado de [9,17,25,28]

Para designar el nombre de un marcador genético se utiliza la nomenclatura estándar dependiendo de la localización en el genoma (ver [tabla 1](#)). Cuando el marcador se encuentra dentro del gen se utiliza el nombre del gen para designarlo, por ejemplo, el marcador VWA recibe su

nombre por el factor de von Willebrand, el gen donde se encuentra; cuando el marcador está por fuera del gen su nombre corresponde al cromosoma y el locus donde se encuentra, por ejemplo, el marcador D3S1358 es nombrado D: por ADN, 3: por el número del cromosoma donde se encuentra, S: por ser una secuencia de copia única, y 1358: por el orden en el que fue encontrado, es decir, en el 1.358^{avo} locus [9].

La comisión de ADN de la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG, del inglés *International Society for Forensic Genetics*) define la nomenclatura de los alelos de los marcadores genéticos con base en el número de unidades de repetición presentes en cada uno de ellos. De esta manera, en un individuo que el marcador TPOX es 12/11, uno de sus alelos tiene 12 unidades repetitivas de la secuencia AATG, mientras que el otro tiene 11 [9]. La amelogenina no es un locus de repeticiones cortas en tándem, pero tiene dos tipos de alelos, el X y el Y, que permiten identificar el sexo de un individuo. La normalización de la nomenclatura utilizada garantiza la reproducibilidad de los resultados [29,30].

Prueba de paternidad / maternidad basada en ADN

La paternidad o la maternidad pueden establecerse mediante la comparación de los perfiles genéticos del padre, la madre y el hijo, y en algunas ocasiones de otros familiares. En el proceso de investigación o impugnación de la paternidad o la maternidad se pueden presentar diferentes tipos de casos, que se clasifican técnicamente en simples y complejos según la dificultad del proceso técnico del laboratorio o del cálculo probabilístico que involucra su resolución [3].

Casos simples

Los casos simples están compuestos por el trío presunto padre, hijo(a) y madre biológica. Estos casos son los más frecuentes en las pruebas de filiación (ver figura 2).

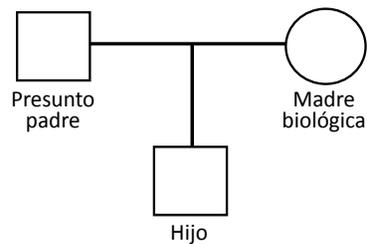


Figura 2. Árbol genealógico de un caso simple de paternidad.

Casos complejos

Los casos complejos normalmente se asocian a investigaciones de paternidad o maternidad en ausencia de uno de los progenitores. Éstos pueden resolverse de manera directa o indirecta mediante el estudio de los familiares del presunto padre o de la madre ausente [3]. Entre los casos complejos se encuentran:

- Presunto padre e hijo(a): corresponde a los casos en los que no se cuenta con la madre biológica del hijo(a) y existe la duda respecto a la paternidad.
- Presunta madre e hijo(a): estos casos son similares a los anteriores, pero la duda existe sobre la maternidad frente a un hijo(a).
- Restos óseos del presunto padre, hijo(a) y madre biológica: la exhumación se considera el procedimiento ideal para determinar la paternidad cuando el presunto padre ha fallecido.

En estos casos se estudian los restos óseos (huesos largos o piezas dentales) del presunto padre fallecido y las muestras de sangre de la madre biológica y el hijo(a).

- Análisis para determinar si dos individuos son hermanos biológicos: en este caso se puede determinar si dos individuos, un hijo biológico y otro dubitado (con duda), son descendientes biológicos del mismo padre y la misma madre (ver figura 3).

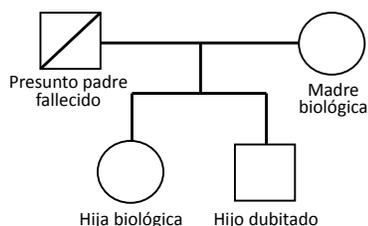


Figura 3. Árbol genealógico de un caso complejo: prueba de hermanos biológicos con el presunto padre fallecido.

- Reconstrucción del perfil genético: cuando no es posible obtener de manera directa el perfil genético del presunto padre es posible determinar la paternidad mediante el estudio de sus familiares. La conformación de los grupos familiares a estudiar, en orden de prelación, es:

- Presuntos abuelos paternos, hijo(a) y madre biológica: en este caso se realiza la prueba de abuelidad, donde la investigación determina si uno de los hijos de una pareja de abuelos puede ser el padre biológico del hijo(a) dubitado (ver figura 4).

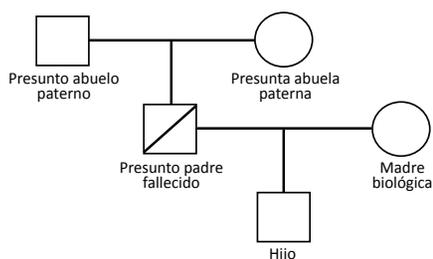


Figura 4. Árbol genealógico de un caso complejo: prueba de abuelidad con el presunto padre fallecido.

- Hijos biológicos (preferiblemente mínimo tres) del presunto padre fallecido o desaparecido, la(s) madre(s) biológica(s) de esos hijos reconocidos, el hijo(a) no reconocido y su madre biológica: estos análisis permiten deducir el perfil genético del presunto padre a partir de los perfiles de sus hijos biológicos reconocidos, para luego establecer si dicho perfil es o no compatible genéticamente con el del hijo no reconocido (ver figura 5).

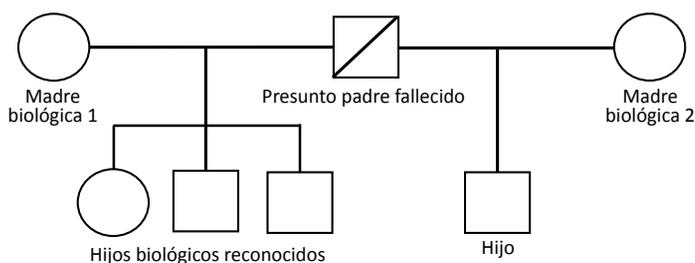


Figura 5. Árbol genealógico de un caso complejo: reconstrucción de perfil genético a partir de los hijos biológicos reconocidos del presunto padre fallecido.

- Hermanos biológicos (mínimo tres) del presunto padre fallecido o desaparecido, uno de los presuntos abuelos paternos, el hijo(a) no reconocido y su madre biológica: en este caso se trata de deducir el perfil genético del padre o de la madre biológica del presunto padre fallecido o desaparecido, es decir, del abuelo o la abuela, a partir de los hermanos biológicos de éste, para posteriormente determinar si uno de los hijos de la pareja de abuelos es compatible con la paternidad biológica del hijo(a) no reconocido (ver figura 6).

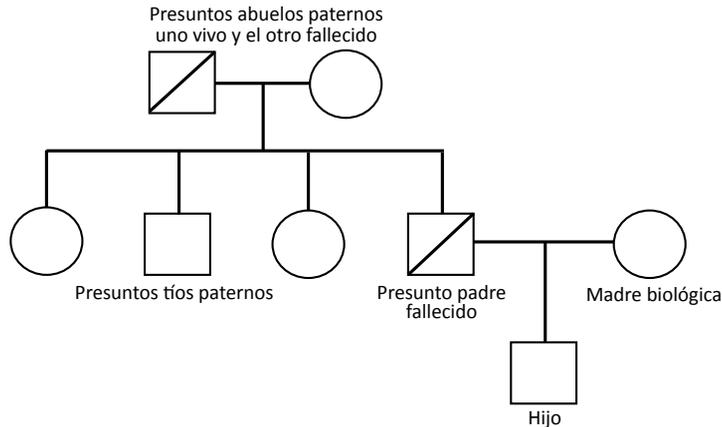


Figura 6. Árbol genealógico de caso complejo: reconstrucción de perfil genético a partir de familiares directos del presunto padre fallecido.

Es importante precisar que cada caso es único y que la posibilidad de obtener el perfil genético del presunto padre fallecido o desaparecido está determinada por la constitución genética, el número de individuos estudiados y el número de marcadores disponibles para ser utilizados. Esta es una de las razones por la cual algunas veces no es posible llegar a resultados concluyentes con las pruebas de ADN [3].

Estudios complementarios para determinar relaciones de parentesco

Para el establecimiento del parentesco es posible utilizar otras herramientas de la genética como los marcadores sobre cromosomas sexuales y el estudio del ADN mitocondrial, las cuales apoyan el fallo en los procesos de investigación e impugnación de paternidad o maternidad, especialmente cuando debido a aspectos de carácter técnico-científico no es posible con los familiares disponibles realizar la prueba con marcadores de ADN en autosomas o alcanzar el porcentaje de probabilidad establecido por la Ley; sin embargo, es necesario tener en cuenta que estos análisis únicamente permiten determinar si las personas estudiadas comparten el linaje paterno o el linaje materno [3].

■ Marcadores del cromosoma Y

El cromosoma Y representa específicamente la contribución paterna al genoma del hijo varón [31]. En condiciones normales está presente en el hombre y no en la mujer, y determina la masculinidad, especificando el desarrollo de los testículos durante la embriogénesis temprana; lo que significa que su herencia es patrilineal [32]. La mayoría del material genético en el cromosoma Y no sufre recombinación durante la meiosis y se transmite de los padres a los hijos sin ningún cambio [30,32]. Este cromosoma posee secuencias de repetición cortas en tándem dispersas por toda su extensión, que son igual de polimórficas que sus homólogos autosómicos [33,34]; lo que permite que sean marcadores del ADN de gran utilidad.

Las reglas para la nomenclatura de los alelos del cromosoma Y siguen los mismos principios que las repeticiones cortas en tándem autosómicas [35]. Los principales marcadores del

cromosoma Y son DYS19, DYS385, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438 y DYS439, los cuales están incluidos en las bases de datos internacionales y en los estuches comerciales utilizados en el ámbito forense [36].

La comparación de los marcadores genéticos del cromosoma Y permite establecer la filiación entre los individuos del sexo masculino relacionados por línea paterna (ver figura 7) y constituyen una herramienta complementaria cuando no se cuenta con el presunto padre, pero se cuenta con sus familiares paternos varones y el supuesto hijo es varón; además, es de gran utilidad para la exclusión aún en ausencia de la madre del hijo cuya paternidad se disputa [31]. Cuando la comparación entre los marcadores de repeticiones cortas en tándem del cromosoma Y del presunto padre y del hijo muestra exclusiones en tres o más marcadores, se excluye la paternidad con mayor probabilidad que con las repeticiones cortas en tándem autosómicas e independientemente del resultado de estos [37].

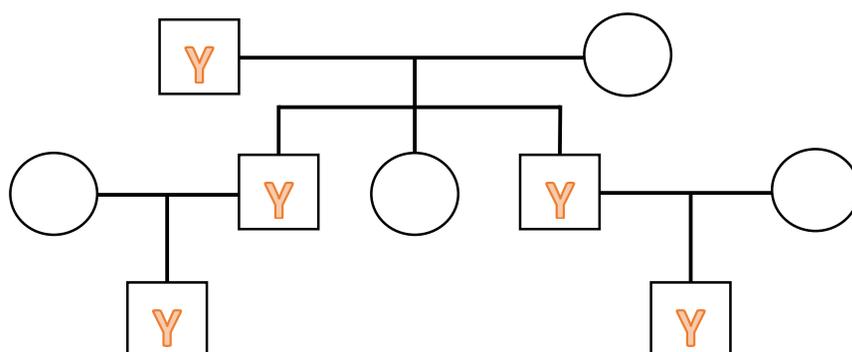


Figura 7. Árbol genealógico de la herencia patrilineal del cromosoma Y. Los cuadros representan los hombres y los círculos las mujeres. Y= cromosoma Y.

En todas las no exclusiones de la paternidad, se haya o no tipificado a la madre, los marcadores del cromosoma Y son un excelente complemento de las pruebas con repeticiones cortas en tándem autosómicas [31]; sin embargo, a diferencia del análisis del ADN autosómico, en el que únicamente se encuentra un individuo con el mismo perfil genético de otro en el caso de los gemelos idénticos; en el análisis del cromosoma Y se encuentran los mismos marcadores del ADN en todos los familiares masculinos (hermanos, hijos, padre, tíos paternos y abuelo paterno, entre otros) del individuo considerado como el presunto padre [32].

Recientemente se han incorporado en el mercado nuevos estuches para la identificación de marcadores del cromosoma Y, como el PowerPlex® Y23 System (Promega Corporation, Wisconsin, Estados Unidos) y Yfiler® Plus (Applied Biosystems, California, Estados Unidos), que incluyen loci de repeticiones cortas en tándem del cromosoma Y de rápida mutación (RM Y-STR, del inglés *rapidly mutating Y-STR*), los cuales poseen una tasa de mutación superior, y por tanto, permiten obtener una mayor discriminación entre los individuos de sexo masculino estrechamente emparentados y establecer relaciones paternales desconocidas [38-41].

▪ ADN mitocondrial

Si bien la gran mayoría del ADN se encuentra en el núcleo, una parte está en las mitocondrias, el cual se denomina ADN mitocondrial (ADNmt) y se encuentra localizado al interior de la mitocondria en la región conocida como matriz en el citoplasma celular. Este ADN es una molécula circular de doble cadena, con 16.569 pares de bases en circunferencia que codifican para 13 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa, dos ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia. El ADN mitocondrial se hereda por vía materna, es decir, son las madres quienes lo transmiten a sus descendientes, sin que exista ninguna recombinación con el ADN mitocondrial del padre. La transmisión por vía materna favorece y complementa la realización de estudios de identificación y de relación familiar, pero no es útil para establecer la paternidad, ya que al heredarse sólo de la madre, permite establecer únicamente la relación matrilineal [30,42]. El ADN mitocondrial no posee repeticiones cortas en tándem, pero posee una región no codificante de aproximadamente 1.100 pares de bases de longitud denominada región de control o región del bucle-D, donde la mayor variabilidad de secuencia entre los individuos se encuentra en dos segmentos específicos: la región hipervariable-1 (HV1) y la región hipervariable-2 (HV2), y corresponden a mutaciones puntuales que no alteran la longitud del ADN [9,42,43].

La secuencia obtenida de la muestra de un individuo particular es comparada con las secuencia de un ADN mitocondrial de referencia, denominada secuencia de referencia de Cambridge revisada (rCRS, del inglés *revised Cambridge reference sequence*), para determinar el sitio y el nucleótido en el que difieren [42]. De esta manera, si en el sitio 73 de la región hipervariable-2, la secuencia de referencia tiene una adenina y el individuo en estudio una guanina, esta secuencia de ADN mitocondrial se denomina 73 G [42]. Cuando no se puede determinar cuál de los cuatro nucleótidos se encuentra en un sitio particular, se nombra dicha posición seguida de la letra «N» (p. ej. 16125N) [44]. Las inserciones se describen por el sitio de la inserción seguido de un punto decimal y un «1» (para la primera inserción), un «2» (si existe una segunda inserción) y así sucesivamente, y luego por el nucleótido insertado (p. ej. la inserción de una citosina en el sitio 315 se denomina 315.1 C) [42]. Las deleciones se registran especificando el sitio faltante seguido de «DEL», «del» o «-(por ejemplo 220del). Las mezclas heteroplásmicas, es decir, cuando existe más de un tipo de ADN mitocondrial en un mismo individuo, que difieren en una única base, se representan por una «R» si la mezcla es de una adenina y una guanina o por una «Y» si la mezcla es de una citosina y una timina [44].

La comparación de las secuencias de las regiones hipervariables entre hermanos y todos los parientes maternos, masculinos y femeninos, permite establecer su filiación (ver [figura 8](#)). Si las secuencias son las mismas no se excluyen y las muestras son procedentes del mismo linaje materno, pero si difieren en un único nucleótido y no hay evidencia de heteroplasmia los resultados no son concluyentes. Por su parte, si existe diferencia en dos o más nucleótidos las muestras son excluidas [45]. El ADN mitocondrial es ideal para el análisis de los pelos sin bulbo, los restos óseos en gran estado de descomposición o muy antiguos y los vestigios en los que no sea posible encontrar el ADN nuclear, debido a la degradación producida por las condiciones ambientales [30,42,43].

Actualmente se utilizan otros marcadores de variación genética, como los polimorfismos de inserción - deleción (indels) y las repeticiones cortas en tándem del cromosoma X, los cuales

disponen de una amplia base de datos poblacional para la identificación humana. Los indels son polimorfismos de longitud creados por inserciones o deleciones de uno o más nucleótidos, que se encuentran tanto en el cromosoma X como en los autosomas y el cromosoma Y, y para los cuales se han desarrollado ensayos de reacción en cadena de la polimerasa múltiple que permiten su identificación con alta heterocigosidad entre los distintos grupos poblacionales y gran poder de discriminación (mayor o igual a 99,99%) [46,47]. Por otro lado, se han descrito hasta 36 marcadores diferentes de repeticiones cortas en tándem del cromosoma X, que presentan una tasa de mutación comparable a la de los marcadores autosómicos y del cromosoma Y, y que permiten establecer la paternidad o la maternidad con una probabilidad mayor o igual al 99,99% [48].

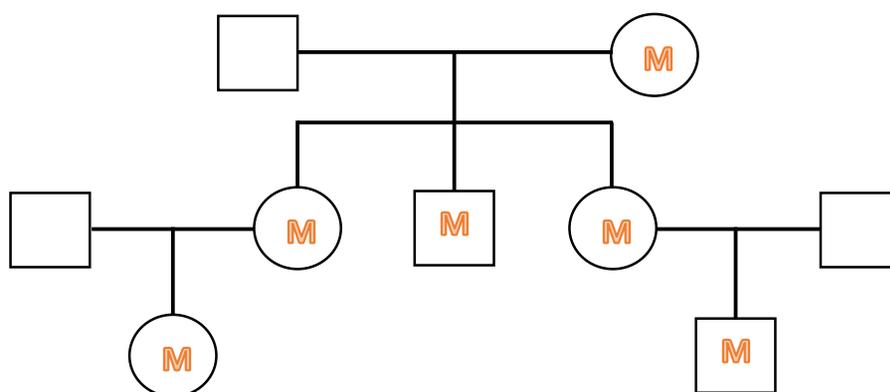


Figura 8. Árbol genealógico de la herencia matrilineal de ADN mitocondrial. Los cuadros representan los hombres y los círculos las mujeres. M= ADN mitocondrial.

Proceso para la realización de una prueba de ADN

Toma de muestra

En esta etapa del proceso los usuarios deben presentar el documento de identificación original y copia. Se explica a la persona el procedimiento para la toma de la muestra y la realización de la prueba del ADN, se diligencia el consentimiento informado y se firma por el usuario. Se toman las huellas dactilares del índice y pulgar derecho y una fotografía del grupo de personas presentes para el análisis. Posteriormente, se marca la tarjeta FTA™ (del inglés *Flinders Technology Associates*) con el nombre del individuo al que se le va a tomar la muestra, la fecha del procedimiento, el código de identificación de la muestra y las iniciales de quien va a tomar la muestra. Luego, se realiza una punción en uno de los dedos de la persona, se depositan algunas gotas de sangre en la tarjeta FTA™ y se deja secar. Este procedimiento se lleva a cabo con cada uno de los integrantes del grupo de análisis. Una vez terminado el proceso, las muestras y los registros se almacenan manteniendo siempre la cadena de custodia [49].

La prueba de ADN se puede realizar a partir de cualquier tipo de muestra biológica que contenga células nucleadas (saliva, semen, líquido amniótico, restos óseos, entre otros), pero se

prefiere la muestra de sangre por ser la más fácil de tomar, conservar y procesar, y por su alto contenido de ADN. Las muestras a partir de las cuales no se puede realizar una prueba de paternidad son las cenizas fúnebres, los tejidos conservados en formol y los cabellos cortados [3].

Procesamiento y análisis en el laboratorio

▪ Extracción del ADN

La extracción del ADN corresponde a la separación o aislamiento de la molécula de ADN del núcleo para que esté disponible para los posteriores análisis. El método de elección corresponde a aquel que permita obtener suficiente cantidad, buena calidad y alta pureza del ADN, para obtener un perfil genético completo, y sin interferentes que puedan alterarlo [8]. La tarjeta de FTA™ fue desarrollada a finales de la década de los ochenta como un método útil para la separación del ADN [50]. Esta tarjeta consiste en un papel de celulosa absorbente que contiene un agente tensoactivo, un agente quelante, un tampón y una trampa de radicales libres que protegen al ADN de la degradación y preservan la muestra de la contaminación bacteriana, lo que permite que sea estable a temperatura ambiente por varios meses y años.

Cuando las gotas de sangre son depositadas en la tarjeta, las células son lisadas, las proteínas asociadas al ADN son desnaturalizadas y el ADN celular total proveniente de los leucocitos es capturado en la matriz de celulosa. Luego una pequeña porción de la mancha de sangre es perforada de la tarjeta FTA™ y es colocada en un vial para ser lavada con el reactivo de purificación FTA, el cual elimina el grupo heme y otras proteínas y lípidos asociados al ADN, para purificar el ADN unido a la matriz. Posteriormente, el sobrenadante es eliminado y la porción de la muestra purificada es llevada directamente a la reacción en cadena de la polimerasa (ver figura 9) [51].

▪ Amplificación de los marcadores genéticos

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite obtener millones de copias de una región específica del ADN en poco tiempo. Para esto, se incluye una enzima ADN

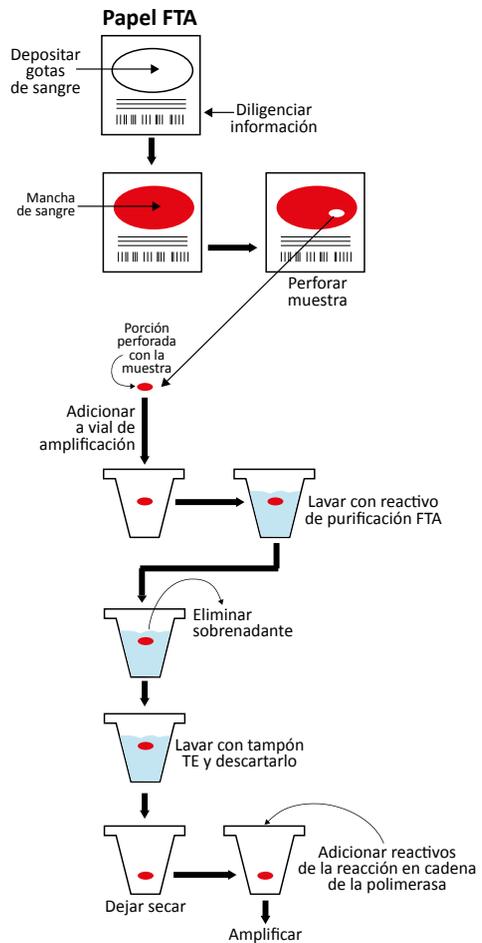


Figura 9. Esquema de la extracción de ADN con las tarjetas FTA™

polimerasa que sintetiza nuevo ADN a partir de dos cebadores o iniciadores (del inglés *primers*), que son secuencias cortas de ADN (entre seis y 40 nucleótidos) complementarias a los extremos del fragmento que se desea amplificar, utilizando como sustratos los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) [51]. Para la amplificación del ADN purificado de la tarjeta FTA™ se adiciona al vial de amplificación que contiene la porción de la muestra el tampón TE (Tris 10 mM, pH 8,0), se descarta y se deja secar. Posteriormente, se adiciona la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa que contiene la Taq polimerasa (enzima ADN polimerasa), los desoxirribonucleótidos trifosfato, los cebadores (un par por cada marcador de ADN), soluciones tampón y sales de magnesio a concentraciones determinadas, y se amplifica durante aproximadamente 25 ciclos [52].

Actualmente existen disponibles estuches comerciales para la amplificación y detección de múltiples marcadores de ADN de forma simultánea a partir de las tarjetas FTA™, los cuales utilizan un cebador marcado con fluorescencia por cada par de cebadores de un marcador genético. De esta manera, la posición del par de cebadores en la secuencia blanco y la distancia que existe entre ellos determinan el tamaño del fragmento de ADN que se va a amplificar y cada producto de ADN amplificado es marcado fluorescentemente con colores diferentes que son detectados cuando se excitan con luz a una determinada longitud de onda. Estas características permiten diferenciar un marcador de ADN de otro por el color de la fluorescencia que emiten, aun cuando poseen el mismo número de repeticiones cortas en tándem [51,53].

▪ Electroforesis capilar

Los productos de ADN de la reacción en cadena de la polimerasa son colocados en un analizador genético, que consiste en un sistema de electroforesis capilar y detección de fluorescencia inducida por láser a diferentes longitudes de onda, el cual permite separar por tamaño y detectar la fluorescencia de cada uno de los fragmentos amplificados. El software almacena y analiza la información de la migración en la electroforesis capilar, que corresponde al tamaño, y de la luz visible emitida por cada producto de ADN marcado, para determinar y diferenciar las secuencias cortas en tándem presentes [54]. La información obtenida es convertida en un electroferograma, es decir, un gráfico que representa la cantidad relativa de fluorescencia para cada marcador fluorescente, contra el tiempo, entendido como el tamaño del fragmento de ADN. El conjunto de gráficos obtenidos forma un mapa de marcadores de ADN [54,55], correspondiente al perfil genético del individuo analizado (ver [figura 10](#)).

Los resultados del perfil genético se expresan en términos del nombre de cada marcador seguido del número de repeticiones encontradas en el primer y el segundo alelo separados por una barra inclinada. De esta manera, si el individuo en el electroferograma presenta dos picos en un marcador específico indica que tiene un genotipo heterocigoto y el número de repeticiones para cada alelo debe ser reportado (p. ej. D3S1358 15/16). Por su parte, si el individuo presenta un solo pico significa que tiene igual número de repeticiones en ambos alelos, es decir, es homocigoto para el marcador analizado, y en este caso el mismo número de repeticiones es reportado en los dos alelos (p. ej. Penta D 13/13).

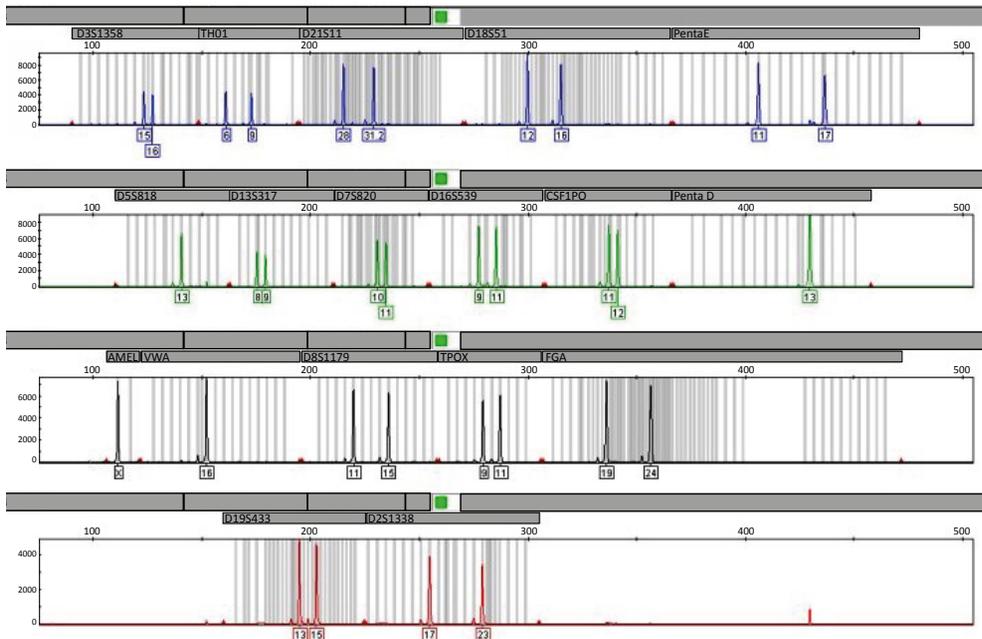


Figura 10. Electroferograma del perfil genético de un individuo del sexo femenino. En la parte superior de cada carril se encuentra el tamaño en nucleótidos (en pares de bases) y el nombre de los marcadores genéticos en los recuadros grises. Para este caso se presentan 17 marcadores de repeticiones cortas en tándem autosómicas (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D6S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, VWA, D8S1179, TPOX, FGA, D19S433, D2S1338) y el marcador de sexo amelogenina (Amel). Los picos corresponden a los alelos del individuo para cada marcador y debajo de cada pico se indica el número de unidades de repetición en el alelo. Para Amel se observa un sólo pico "X" que indica que el individuo es una mujer (XX).

■ Análisis estadístico

Los perfiles genéticos obtenidos en el grupo de individuos analizados son comparados para determinar si existe o no una relación biológica entre ellos. De esta comparación se pueden obtener tres tipos de resultados:

- Exclusión de la paternidad: cuando tres o más alelos analizados en la prueba de paternidad no se comparten entre el hijo(a) y el presunto padre. En la tabla 2 se presenta un ejemplo de exclusión de la paternidad. La primera columna especifica los marcadores de secuencias cortas en tándem analizados durante el estudio. En la segunda, tercera y cuarta columna se describen los resultados obtenidos de cada uno de los marcadores analizados en la madre, el hijo(a) y el presunto padre, respectivamente. En la quinta columna se incluye el alelo paterno obligado (APO), que corresponde a la información genética que debe tener el padre biológico del hijo en cuestión, deducido a partir de la información genética que el hijo heredó de la madre. En la última columna se incluye la información de "No exclusión", definida a partir de la compatibilidad entre el alelo paterno obligado y el presunto padre, y la "Exclusión paterna", correspondiente a la incompatibilidad entre el alelo paterno obligado y el presunto padre.

En el caso presentado en la tabla 2, por ejemplo, para el marcador D16S539 el hijo tiene un genotipo 11/12. Partiendo de que la madre para este mismo marcador posee un genotipo

10/12, se deduce que aportó al hijo el alelo de 12 repeticiones y por lo tanto, el padre el de 11 repeticiones. Al comparar el alelo paterno obligado para este marcador con el genotipo del presunto padre (D16S539 11/13), se encuentra compatibilidad en el alelo 11 y por ende no hay exclusión. Por su parte, para el marcador D18S51 el hijo tiene un genotipo 19/21 y la madre 19/22; de esta manera, se asume que la madre aportó el alelo 19 y por consiguiente, el alelo paterno obligado es el alelo 21. Dado que este alelo no se encuentra presente en el presunto padre (D18S51 13/15) hay exclusión paterna para este marcador.

Tabla 2. Genotipos de una prueba de paternidad trío con exclusión de la paternidad

| Marcador de repeticiones cortas en tándem (STR) | Madre | Hijo(a) | Presunto padre | Alelo paterno obligado (APO) | Paternidad |
|---|---------|-----------|----------------|------------------------------|-------------------|
| D16S539 | 10 / 12 | 11 / 12 | 11 / 13 | 11 | No exclusión |
| D18S51 | 19 / 22 | 19 / 21 | 13 / 15 | 21 | Exclusión paterna |
| D21S11 | 28 / 29 | 29 / 31,2 | 30 / 32,2 | 31,2 | Exclusión paterna |
| D3S1358 | 15 / 15 | 15 / 15 | 15 / 17 | 15 | No exclusión |
| D7S820 | 10 / 11 | 11 / 11 | 10 / 12 | 11 | Exclusión paterna |
| D8S1179 | 13 / 14 | 11 / 13 | 12 / 16 | 11 | Exclusión paterna |
| TPOX | 9 / 9 | 9 / 11 | 8 / 8 | 11 | Exclusión paterna |
| VWA | 13 / 16 | 16 / 17 | 18 / 18 | 17 | Exclusión paterna |
| Penta E | 10 / 12 | 12 / 14 | 7 / 14 | 14 | No exclusión |
| Penta D | 9 / 9 | 2,2 / 9 | 10 / 12 | 2,2 | Exclusión paterna |

La misma lógica se aplica para todos los marcadores genéticos evaluados, para confirmar la exclusión de la paternidad. En este caso el análisis completo de los 10 marcadores demostró más de tres exclusiones (ver [tabla 2](#)) y en consecuencia, no existe la probabilidad de que sea el padre biológico. El resultado de la prueba se reporta indicando el nombre del presunto padre, el número de exclusiones encontradas y el nombre del hijo(a), seguido de la conclusión de la exclusión de la paternidad. El resultado para el caso presentado en la [tabla 2](#) se reporta:

Análisis de la paternidad: El señor XXXXX dado el hallazgo de **siete** exclusiones no es posible que sea el padre biológico de XXXXX.

CONCLUSIÓN: SE EXCLUYE LA PATERNIDAD

Resultado Verificado*

* En los casos de exclusión de la paternidad se debe repetir el procesamiento de las muestras del hijo(a) y el presunto padre desde la extracción, para confirmar las exclusiones [49].

- No exclusión de la paternidad: cuando entre el hijo(a) y el presunto padre se comparte la información de los marcadores genéticos analizados. En la [tabla 3](#) se presenta un ejemplo de no exclusión de la paternidad. El análisis de la “exclusión” y la “no exclusión paterna” para el total de marcadores analizados se realiza como se describió para el caso anterior. Además de la información de las columnas ya especificadas, se incluyen los parámetros estadísticos de índice de paternidad (IP) y de probabilidad (W).

Tabla 3. Genotipos de una prueba de paternidad trío con paternidad no excluyente

| Marcador de repeticiones cortas en tándem (STR) | Madre | Hijo(a) | Presunto padre | Alelo paterno obligado (APO) | Paternidad | Índice de paternidad (IP) | Probabilidad (W) |
|---|---------|---------|----------------|------------------------------|--------------|---------------------------|------------------|
| D16S539 | 8 / 9 | 9 / 9 | 9 / 9 | 9 | No exclusión | 5,6497 | 0,8496 |
| D18S51 | 12 / 12 | 12 / 15 | 15 / 15 | 15 | No exclusión | 6,2112 | 0,8613 |
| D21S11 | 28 / 30 | 28 / 31 | 29 / 31 | 31 | No exclusión | 6,5789 | 0,8681 |
| D3S1358 | 15 / 18 | 15 / 16 | 14 / 16 | 16 | No exclusión | 1,8727 | 0,6519 |
| D7S820 | 8 / 11 | 11 / 12 | 12 / 12 | 12 | No exclusión | 5,8480 | 0,8540 |
| D8S1179 | 13 / 14 | 14 / 15 | 14 / 15 | 15 | No exclusión | 3,5714 | 0,7813 |
| TPOX | 9 / 11 | 10 / 11 | 10 / 10 | 10 | No exclusión | 20,0000 | 0,9524 |
| VWA | 14 / 16 | 14 / 17 | 17 / 17 | 17 | No exclusión | 4,3860 | 0,8143 |
| Penta E | 8 / 12 | 8 / 12 | 12 / 13 | 8 / 12 | No exclusión | 2,3170 | 0,6985 |
| Penta D | 10 / 14 | 14 / 14 | 12 / 14 | 14 | No exclusión | 10,5485 | 0,9134 |
| CSF1PO | 10 / 11 | 10 / 11 | 10 / 11 | 10 / 11 | No exclusión | 1,8904 | 0,6540 |
| D13S317 | 9 / 9 | 9 / 9 | 9 / 11 | 9 | No exclusión | 4,5872 | 0,8210 |
| D2S1338 | 18 / 24 | 22 / 24 | 22 / 22 | 22 | No exclusión | 13,4953 | 0,9310 |

El índice de paternidad (*IP*) expresa cuántas veces es más probable que el alelo del hijo(a) apoye la hipótesis de que el individuo en cuestión es el verdadero padre biológico y no otro individuo de la población seleccionado aleatoriamente [9]. Este índice se calcula para cada alelo de cada uno de los marcadores analizados, aplicando la siguiente fórmula:

$$IP=X/Y$$

Donde "X corresponde a la probabilidad de que el presunto padre sea el padre biológico y Y a la probabilidad de que no lo sea

El valor X del índice de paternidad evalúa la hipótesis que señala que los tres genotipos, presunto padre, madre e hijo(a), son un trío verdadero, en otras palabras, que el menor es descendiente del presunto padre y la madre. El valor Y evalúa la hipótesis que señala que los tres genotipos, presunto padre, madre e hijo(a), son un trío falso, es decir, que el hijo(a) es descendiente de otro hombre de la población general y la madre [29]. Mientras menos frecuente en la población sea el alelo compartido mayor será el índice de paternidad y la probabilidad de que sea el padre biológico del menor en cuestión. Las frecuencias poblacionales de los alelos se encuentran disponibles en bases de datos internacionales.

La probabilidad de paternidad (*W*) se calcula a partir del valor del índice de paternidad aplicando la siguiente fórmula:

$$W = \alpha \cdot \text{índice de paternidad} / (\alpha \cdot \text{índice de paternidad} + 1 - \alpha)$$

Donde α corresponde a la probabilidad de paternidad a priori, considerada como el 0,5 (50%)

A partir de las frecuencias de los alelos de la región Costa Caribe de Colombia, publicada por Paredes y colaboradores (2003) [56], para el ejemplo de la [tabla 3](#) el índice de paternidad del marcador TPOX es:

$$IP = \frac{0,5}{(0,5 \times \text{frecuencia del alelo paterno obligado})}$$

$$IP = \frac{0,5}{0,5 \times 0,05}$$

$$IP = 20,0000$$

Esto quiere decir que para el marcador TPOX es 20 veces más probable que el presunto padre sea el padre biológico respecto a que lo sea otro individuo de la población.

Por su parte, el índice de paternidad del marcador CSF1PO es:

$$IP = \frac{0,5}{0,5 \times (\text{frecuencia del primer alelo paterno obligado} + \text{frecuencia del segundo alelo paterno obligado})}$$

$$IP = \frac{0,5}{0,5 \times (0,256 + 0,273)}$$

$$IP = 1,8904$$

Esto que para el marcador CSF1PO es 1,8904 veces más probable que el presunto padre sea el padre biológico a que lo sea otro individuo de la población, lo que sugiere que el alelo heredado del padre es muy frecuente en la población.

Una vez se obtiene el índice de paternidad de cada marcador, se calcula el índice de paternidad total (*IP total*) multiplicando todos los valores individuales de los marcadores analizados [9,51], y a partir de este dato se calcula la probabilidad acumulada de paternidad (*Wa*), aplicando la fórmula de *W*. En todos los procesos para establecer la paternidad o la maternidad la probabilidad acumulada de paternidad deber ser superior al 99,99%, según lo estipulado en la Ley 721 de 2001 [5].

El resultado de la prueba de paternidad se reporta indicando el nombre del presunto padre, la probabilidad acumulada de la paternidad (expresada en porcentaje e incluyendo después del punto decimal cuantos nueve (9) tenga el valor calculado), el índice de paternidad total (con cuantas cifras decimales sea posible incluir), el nombre del hijo(a) y la conclusión de la no exclusión. El resultado para el caso de la [tabla 3](#) se reporta:

Análisis de la paternidad: El señor XXXXX tiene una probabilidad acumulada de paternidad de **99,99999996%** y un índice de paternidad de **2265518153,25694** probabilidades, a favor de la paternidad de XXXXX.

CONCLUSIÓN: NO SE EXCLUYE LA PATERNIDAD

- No concluyente la paternidad: cuando se obtiene exclusión en menos de tres marcadores genéticos analizados o el parámetro estadístico de probabilidad acumulada de parentesco no alcanza el porcentaje de 99,99% estipulado en la Ley 721 de 2001 para establecer la paternidad o la maternidad [5].

Elaboración del informe

En Colombia, el informe de una prueba de filiación debe incluir como mínimo la información establecida en la Ley 721 de 2001 [5]:

- Nombre e identificación completa de quienes fueron objeto de la prueba
- Valores individuales y acumulados del índice y probabilidad de paternidad o maternidad
- Breve descripción de la técnica y el procedimiento utilizado para rendir el dictamen
- Frecuencias poblacionales utilizadas
- Descripción del control de calidad del laboratorio

Igualmente, el informe debe incluir la información especificada en la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025, bajo la cual se dictan los requisitos para la acreditación de los laboratorios públicos o privados que realicen pruebas de filiación con ADN [57]:

- Título del informe (p. ej., “Informe de prueba de paternidad con ADN”)
- Nombre y dirección del laboratorio donde se realizaron los ensayos
- Identificación única del informe
- Identificación del método utilizado
- Fechas de la toma de la muestra y de la ejecución del ensayo
- Nombres, funciones y firmas de quienes autorizan el informe

Conclusiones

Los métodos desarrollados para la investigación en genética forense han sido rápidamente transferidos a países como Colombia, permitiendo su adecuada aplicación en la resolución de casos civiles de filiación, ajustándose a la normatividad y legislación vigente. La investigación biológica de la paternidad se puede resolver a través del análisis de los marcadores genéticos de las repeticiones cortas en tándem, ya sea analizando directamente a las personas involucradas en la investigación (casos simples) o a partir de la información genética de los familiares en primer grado de consanguinidad del presunto padre ausente (casos complejos). Además de los marcadores genéticos autosómicos de repeticiones cortas en tándem, la genética permite la realización de estudios complementarios como los marcadores de repeticiones cortas en tándem del cromosoma Y (linaje paterno) y el análisis del ADN mitocondrial (transmisión genética por la línea materna). El proceso para la realización de una prueba de paternidad se ha convertido en un método eficiente, rápido y confiable gracias a la correcta implementación de la metodología y el análisis estadístico por parte de los laboratorios que realizan este tipo de estudios forenses.

Agradecimientos

A la Universidad Manuela Beltrán por su Laboratorio de Identificación Humana donde se realizan las pruebas de paternidad mediante marcadores de ADN.

Bibliografía

1. **República de Colombia.** Ley 1098 de 2006 (noviembre 8) «Por la cual se expide el Código de la Infancia y la Adolescencia». Disponible: http://www.secretariassenado.gov.co/senado/basedoc/ley_1098_2006.html. Consultado: agosto 2014.
2. **Escudero Alzate MC.** Procedimiento de Familia y del Menor (ed 13). Bogotá D.C., Colombia: Editorial Leyer; 2005.
3. **República de Colombia, Departamento para la Prosperidad Social, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, Dirección de Protección, Subdirección de restablecimiento de derechos.** Documento guía pruebas de ADN para investigación de paternidad y/o maternidad. 2014. Disponible: <http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/PortalICBF/Bienestar/Programas/Proteccion/PruebasADN/GUIA%20PATERNIDAD-2014%20-%20Febrero%202014.pdf>. Consultado: agosto 2014.
4. **República de Colombia.** Ley 75 de 1968 (Diciembre 30) «Por la cual se dictan normas sobre filiación y se crea el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar». Disponible: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=4828>. Consultado: agosto 2014.
5. **República de Colombia.** Ley 721 de 2001 (Diciembre 24) «Por medio de la cual se modifica la Ley 75 de 1968». Disponible: <http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=9565>. Consultado: agosto 2014.
6. **Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al.** Molecular Cell Biology (ed 7). Nueva York, Estados Unidos: W. H. Freeman and Company; 2012.
7. **Watson JD.** Molecular Biology of the Gene (ed 5ta). California, Estados Unidos: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
8. **Li R.** Forensic Biology: Identification and DNA Analysis of Biological Evidence. Florida, Estados Unidos: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2011.
9. **Girard JE.** Criminalistics: Forensic Science, Crime and Terrorism (ed 2a). Massachusetts, Estados Unidos: Jones & Bartlett Learning; 2011.
10. **Brinkmann B, Klitschar M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B.** Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 1408-1415.
11. **Landsteiner K.** Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Bluteserums und der Lymphe. *Zentralbl Bakteriol* 1900; 27: 357-362.
12. **Mourant AE, Kopec AC, Domaniewska-Sobczak K.** The distribution of the human blood groups and other polymorphisms (ed 2a). Londres, Inglaterra: Oxford University Press; 1976.
13. **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985; 314: 67-73.
14. **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985; 316: 76-79.
15. **Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT.** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 746-756.
16. **Goldstein DB, Schlotterer C.** Microsatellites evolution and applications. Nueva York, Estados Unidos: Oxford University Press Inc.; 1999.
17. **Triggs CM, Buckleton JS, Walsh SJ.** Forensic DNA Evidence Interpretation. Florida, Estados Unidos: CRC Press; 2005.
18. **Jobling MA, Gill P.** Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 739-751.

19. **Bravo Aguilar MLJ.** Introducción a la genética forense de las pruebas de paternidad. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 1999.
20. **Kayser M, de Knijff P.** Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 179-192.
21. **Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M.** Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl* 1993; 3: 13-22.
22. **Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P.** A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 1993; 15: 636-638, 640-631.
23. **NIST, National Institute of Standards and Technology, STRBase (Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase).** Commercially Available STR Multiplex Kits. 2014. Disponible: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/multiplex.htm>. Consultado: agosto 2014.
24. **Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B.** Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci* 2001; 46: 647-660.
25. **Consejo de la Unión Europea.** Council Resolution of 30 November 2009 on the exchange of DNA analysis results. 2009. Disponible: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32009G1205%2801%29>. Consultado: agosto 2014.
26. **Cotton EA, Allsop RF, Guest JL, Frazier RR, Koumi P, Callow IP, et al.** Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework. *Forensic Sci Int* 2000; 112: 151-161.
27. **Interpol.** Interpol handbook on DNA data exchange and practice (ed 2a). Lyon, Francia: ICPO-INTERPOL, General Secretariat; 2009.
28. **NIST, National Institute of Standards and Technology, STRBase (Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase).** Core STR Loci Used in Human Identity Testing. 2014. Disponible: <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/coreSTRs.htm>. Consultado: agosto 2014.
29. **Yunis EJ.** El ADN en la identificación humana. Bogotá D.C., Colombia: Editorial Temis; 2002.
30. **Peñuela Arroyo LS.** El papel del bioanalista forense frente al sistema acusatorio. Medellín, Colombia: Señal Editora; 2005.
31. **Bravo Aguilar MLJ.** La verdad genética de la paternidad. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2009.
32. **Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C.** The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 1997; 110: 118-124.
33. **Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, et al.** Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1580-1588.
34. **Roewer L, Arnemann J, Spurr NK, Grzeschik KH, Eppelen JT.** Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Genet* 1992; 89: 389-394.
35. **Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA, et al.** DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci Int* 2001; 124: 5-10.
36. **NIST, National Institute of Standards and Technology, STRBase (Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase).** Y-Chromosome STRs. 2014. Disponible: http://www.cstl.nist.gov/strbase/y_strs.htm. Consultado: agosto 2014.
37. **Chakraborty R.** Paternity testing with genetic markers: are Y-linked genes more efficient than autosomal ones? *Am J Med Genet* 1985; 21: 297-305.
38. **Ballantyne KN, Ralf A, Aboukhalid R, Achakzai NM, Anjos MJ, Ayub Q, et al.** Toward male individualization with rapidly mutating y-chromosomal short tandem repeats. *Hum Mutat* 2014; 35: 1021-1032.

39. **Thompson JM, Ewing MM, Frank WE, Pogramiller JJ, Nolde CA, Koehler DJ, et al.** Developmental validation of the PowerPlex(R) Y23 System: a single multiplex Y-STR analysis system for casework and database samples. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 240-250.
40. **Davis C, Ge J, Sprecher C, Chidambaram A, Thompson J, Ewing M, et al.** Prototype PowerPlex(R) Y23 System: A concordance study. *Forensic Sci Int Genet* 2013; 7: 204-208.
41. **Ballantyne KN, Keerl V, Wollstein A, Choi Y, Zuniga SB, Ralf A, et al.** A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages. *Forensic Sci Int Genet* 2012; 6: 208-218.
42. **Carracedo A, Bar W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, et al.** DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* 2000; 110: 79-85.
43. **Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R.** Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003; 4: 119-141.
44. **Parson W, Gusmao L, Hares DR, Irwin JA, Mayr WR, Morling N, et al.** DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet* 2014; 13: 134-142.
45. **Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM).** Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation. *Forensic Sci Commun* 2003; 5.
46. **Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmao L.** A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis* 2009; 30: 3682-3690.
47. **Pereira R, Pereira V, Gomes I, Tomas C, Morling N, Amorim A, et al.** A method for the analysis of 32 X chromosome insertion deletion polymorphisms in a single PCR. *Int J Legal Med* 2012; 126: 97-105.
48. **Diegoli TM, Linacre A, Schanfield MS, Coble MD.** Mutation rates of 15 X chromosomal short tandem repeat markers. *Int J Legal Med* 2014; 128: 579-587.
49. **Giraldo A, Bermúdez A, Jiménez M, Lizarazu R.** Estándares básicos para los laboratorios de pruebas de paternidad en Colombia, 2005. *Rev Salud Pública* 2006; 8: 229-237.
50. **Burgoyne L, Kijas J, Hallsworth P, Turner J.** Safe collection, storage and analysis of DNA from blood. *Proceedings of the 5th Int Symposium on Human Identification.* Wisconsin, Estados Unidos: Promega Corporation; 1994: 163.
51. **Butler JM.** *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology.* Massachusetts, Estados Unidos: Academic Press; 2011.
52. **GE Healthcare UK Limited.** FTA™ Cards. Collect, archive, transport, and purify nucleic acids all at room temperature. 2010. Disponible: <https://promo.gelifesciences.com/g1/RAPID-DNA/misc/Whatman-FTA-cards-data-file.pdf>. Consultado: agosto 2014.
53. **Applied Biosystems.** AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit User Guide. Life Technologies Corporation. 2012. Disponible: https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041201.pdf. Consultado: agosto 2014.
54. **Butler JM.** *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation.* California, Estados Unidos: Academic Press; 2014.
55. **Butler JM.** Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* 2007; 43: ii-v.
56. **Paredes M, Galindo A, Bernal M, Avila S, Andrade D, Vergara C, et al.** Analysis of the CODIS autosomal STR loci in four main Colombian regions. *Forensic Sci Int* 2003; 137: 67-73.
57. **Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC).** Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025: «Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración». 2005. Disponible: <http://www.itp.gob.pe/normatividad/demos/doc/Normas%20Internacionales/Union%20Europea/ISO/ISO17025LaboratorioEnsayo.pdf>. Consultado: agosto 2014.