

EJERCICIO COLABORATIVO GHEP 2010: resultados ADN mitocondrial

Manuel López Soto¹ y Lourdes Prieto²

¹ Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses. Delegación de Sevilla. España.

² Comisaría General de Policía Científica. Madrid. España

En la reunión de Granada se ha seguido el mismo formato de discusión de resultados del ejercicio colaborativo anual del GHEP que se instauró en la reunión de Buenos Aires, es decir, una breve presentación de los aspectos más relevantes de los resultados de cada parte del ejercicio por parte de los coordinadores y posterior discusión de los mismos por parte de todos los asistentes. Por tanto, sólo se resaltan aquí los aspectos más importantes de los resultados del análisis de ADN mitocondrial, sin entrar a valorar de manera pormenorizada cada muestra y cada resultado no consensuado, pues ya se han discutido suficientemente en años anteriores y son repetitivos.

1.- Muestras M1, M2, M3, M4, M5 y M6

Los resultados obtenidos en estas muestras han sido muy satisfactorios, con un elevado nivel de consenso. Sólo cabe destacar el hecho de que algunos laboratorios no indicaron el rango de lectura, por lo que es difícil valorar si el resultado es correcto o no en algunos casos. En aquellos laboratorios que sí informaron de su rango de lectura, se han dado fundamentalmente dos situaciones de error (Ver tabla 1):

- Laboratorios que dieron polimorfismos fuera de su rango de lectura pero son correctos (se pueden considerar errores menos graves).
- Laboratorios que omitieron polimorfismos que sí están dentro de su rango de lectura.

Muestra	Edición	Haplotipo
Menos grave		
M1	16024-16365 / 73-340	72C 195C 263G 309.1C 315.1C 16298C
M2-M3	16024-16480 / 16520-568	239C 263G 309.1C 315.1C 16362C 16482G 16519C
M4	16000-16366 / 81-370	73G 146C 152C 263G 279C 309.1C 315.1C 16126C 16292T 16294T 16311C
M5	15970-16380 / 57-380	73G 152C 263G 309.1C 315.1C 16256T 16270T 16399G
Más grave		
M1	16024-16400 / 51-440	195C 263G 309.1C 315.1C 16298C (y 72C?)
M2	16024-00008 / 0039-00552	16362C 16482G 16519C (y 39-552?)
M5	16030-16400 / 60-480	73G 152C 263G 309.1C 315.1C 16256T 16270T (y 16399G?)

Tabla1

La indicación del rango de lectura es tan importante como el hecho de definir el haplotipo y debe ser siempre indicado. Obviamente, dicho rango deberá estar siempre acorde con los polimorfismos del haplotipo para evitar situaciones de confusión. Para este control se decidió no tener en cuenta estas discrepancias a la hora de emitir los certificados. En este sentido, se ha propuesto un nuevo formato de formulario para el ejercicio colaborativo del próximo año, en el que habrá un espacio para indicar el rango de edición en cada muestra (Ver

tabla 2). Esto permitirá realizar una valoración real de los resultados obtenidos por los laboratorios.

Muestra	Edición	Haplotipo
M1	16024-16365 / 72-340	72C 195C 263G 309.1C 315.1C 16298C

Tabla2

2.- Muestra M7 = M4 (sangre) + M5 (sangre) + semen de desconocido

Las mezclas son siempre difíciles de analizar mediante ADN mitocondrial. Como ya pudimos comprobar en el ejercicio de mezclas de ADNmt publicado en 2007 por el GHEP [1], los tipos de fluidos que forman la mezcla tienen una influencia muy acentuada en la detección o no detección del haplotipo en la mezcla, debido a la variabilidad que existe en la cantidad de copias de ADNmt entre los diferentes tejidos.

La mayoría de los laboratorios que analizaron esta muestra detectaron los haplotipos correspondientes a las muestras M4 y M5. Sólo un laboratorio detectó la mezcla de los tres componentes (Ver tabla 3). Este resultado se explica porque el semen es uno de fluidos que menos cantidad de copias de ADNmt contienen, lo cual hace que sea difícil de detectar el haplotipo de ADNmt que define a éste cuando está mezclado con fluidos que contienen mayor número de copias. Sin embargo, muy pocos laboratorios explicaron que el hecho de detectar sólo dos componentes en la mezcla pudiera deberse a esta razón, por lo que en la reunión resaltamos la importancia de tener en cuenta las publicaciones del GHEP.

MUESTRA	HAPLOTIPO (16024-16365 73-340)	HG
M4	73G 146C 152C 263G 279C 309.1C 315.1C 16126C 16292T 16294T 16311C	T
M5	73G 152C 263G 309.1C 315.1C 16256T 16270T	U5a
M4 + M5	73G 146Y 152C 263G 279Y 309.1C 315.1C 16126Y 16256Y 16270Y 16292Y 16294Y 16311Y	T + U5a
SEMEN	73G 152C 263G 315.1C 16224C 16311C 16319A	K
M4 + M5 + SEMEN	73G 146Y 152C 263G 279Y 309.1Y 315.1C 16126Y 16224Y 16256Y 16270Y 16292Y 16294Y 16311Y 16319R	T + U5a + K

Tabla3

3.- Muestra M8 = fragmento de pelo de mujer desconocida + semen de desconocido diluido 1/2

Posiblemente, esta muestra haya sido de las más problemáticas de los controles de los últimos años. La mayoría de laboratorios sólo informaron el haplotipo del contaminante (semen) si bien muchos de ellos fueron conscientes de que el haplotipo detectado pudiera ser resultado del contaminante y no del propio pelo, a pesar de haber procedido a una limpieza previa (Ver tabla 4). Sólo un laboratorio detectó la mezcla de ambos haplotipos, si bien, otro de los laboratorios en la reunión resaltó que también había detectado la mezcla pero que no la informaron al no estar seguros del resultado obtenido.

Haplotipo consenso no correcto (16024-16365 73-340)	Haplogrupo
73G 152C 263G 315.1C 16224C 16311C 16319A	K
Haplotipo correcto pelo + contaminante (16024-16365 73-340)	
73G 152T/C 263G 309.1C 315.1C 16188C/T 16224C/T 16256C/T 16270C>T 16311C/T 16319A	K + U5a

Tabla4

Con el fin de comprobar los resultados, la Coordinadora del Ejercicio Colaborativo se puso en contacto con tres laboratorios para que analizaran muestras indubitadas de la mucosa bucal de los donantes, tanto de pelo como de semen (Ver Tabla 5).

Muestra	INTCF Madrid y Barcelona	C.G. Policía Científica
	16024-16365 y 73-340	16024-576
Donante de semen (mucosa bucal)	73G 152C 263G 315.1C 16224C 16311C 16319A	73G 152C 263G 315.1C 524T 524.1A 524.2C 16224C 16311C 16319A 16463G 16519C (K)
Donante pelo (mucosa bucal)	73G 263G 309.1C 315.1C 16188T 16256T 16270T	73G 263G 309.1C 315.1C 573.1C 573.2C 16188T 16256T 16270T 16399G (U5a)

Tabla5

Dos de estos laboratorios analizaron una muestra de pelo sin contaminar de la donante con el fin de chequear la eficacia de la amplificación en el pelo, por si fuera éste el problema de no detectar el haplotipo en la muestra M8. Los resultados efectivamente apuntan a que el problema puede deberse a un número escaso de mitocondrias en el pelo de esta donante pues se necesitan varios centímetros de pelo para obtener resultados concluyentes (Ver tablas 6 y 7).

Muestra	INTCF Madrid	
	Amplificación HV1 (L15997/H16395)	Amplificación HV2 (L48/H408)
2 pelos (8 cm en total)	19 ng/μL	11ng/μL
Muestra	CG Policía Científica	
	Amplificación HV1 (L15997/H16395), HV2 no realizada	
1 pelo (5 cm)	0,81 ng/μL y 0,17 ng/μL	
1 pelo (10 cm)	14,02 ng/μL	
1 pelo (15 cm)	12,82 ng/μL	
1 pelo (20 cm)	13,55 ng/μL	

Tabla6: cuantificación orientativa de los amplicones (datos obtenidos mediante electroforesis en microchip)

Muestra	INTCF Madrid (16024-16365 y 73-340)
Dos pelos (8 cm en total)	73G 152C 263G 315.1C 16188T 16256T 16270T
Muestra	CG Policía Científica (16024-16365)
5 cm pelo	No realizada por no obtenerse producto amplificado
10 cm pelo	16188T 16256T 16270T
15 cm pelo	16188T 16256T 16270T
20 cm pelo	16188T 16256T 16270T

Tabla7

Además, la Comisaría General de Policía Científica realizó experimentos adicionales con otros donantes de pelo y semen para comprobar si los resultados se reproducían con otros donantes diferentes (ver Tabla 8) o se trataba de un caso aislado en el que el donante de M8 pudiera presentar un número limitado de copias de ADNmt, bien en toda la longitud de su pelo, bien sólo en algunas zonas (por ejemplo, extremo distal de pelos largos).

Donantes de pelo (Haplogrupo)	Donantes de semen (Haplogrupo)
H11a2	J1c1
T2b	U6a
Mezclas realizadas	
3 cm de pelo H11a2 + semen J1c1 diluido ½	
3 cm de pelo H11a2 + semen U6a diluido ½	
3 cm de pelo T2b + semen J1c1 diluido ½	
3 cm de pelo T2b + semen U6a diluido ½	

Tabla8

Los resultados indicaron que en general se obtiene el resultado esperado en las mezclas pelo/semen (Ver tabla 9). Se detectaron los dos haplotipos por separado tras la descontaminación del pelo tanto con una limpieza física con detergente, agua y etanol como mediante con una limpieza mediante lisis diferencial.

Mezcla	Pelo tras limpieza	Resultados tras lisis diferencial	
		1ª lisis	2ª lisis
pelo H11a2 + semen J1c1	H11a2	J1c1	H11a2 + pequeño componente de J1c1
pelo H11a2 + semen U6a	H11a2	U6a	H11a2
pelo T2b + semen J1c1	T2b	J1c1	T2b
pelo T2b + semen U6a	T2b	U6a	Pendiente de repetición

Tabla9

Finalmente, respecto a la muestra M8, se comentó que la enorme divergencia de los resultados obtenidos podría tener su origen en los métodos de limpieza y/o descontaminación empleados (en la bibliografía sólo aparece un artículo específico del tema [2]). El laboratorio LIDMO de Córdoba (Argentina), ha probado cómo puede afectar el tratamiento con hipoclorito sódico (al 5%) al ADN contenido en fragmentos de pelo. Los resultados obtenidos hasta la fecha muestran que, tras un tratamiento de 30 y 60 segundos de duración, las secuencias obtenidas son las esperadas y de calidad adecuada. Por tanto, este método podría utilizarse para descontaminar la superficie de los pelos ya que no afecta al contenido de ADN del propio pelo. Queda demostrar si es efectivo para retirar los posibles contaminantes adheridos al pelo, lo cual está ya en proyecto. Con los resultados obtenidos hasta ahora y la ampliación de algunos de los experimentos se escribirá una publicación, como se ha venido haciendo en años anteriores.

- [1] Montesino et al. (2007). Analysis of body fluid mixtures by mtDNA sequencing: an interlaboratory study of the GEP-ISFG working group. *FSI* 168:42-56
- [2] Jehaes E. et al., 1998, Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *For. Sci. Int.* 94: 65-71.