

GENÉTICA FORENSE Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA: EN GUARDIA ANTE LO INESPERADO

FORENSIC GENETICS AND ASSISTED REPRODUCTION TECHNIQUES: CAUTION TO THE UNEXPECTED

Pascual E
Castelló A
Universitat de València.
España

Correspondencia: Ana.Castello@uv.es

Resumen: Desde que Alec Jeffreys dio a conocer la huella genética, el ADN se ha convertido en una herramienta imprescindible para los investigadores del crimen. Su poder para la identificación se fundamenta en la seguridad de que el ADN de cada persona procede indudablemente de sus progenitores, siendo único e irrepetible. Sin embargo la naturaleza puede generar alteraciones que parecen contradecir esos preceptos, conduciendo a error a los expertos forenses. El quimerismo es un buen ejemplo. Asimismo las transfusiones, trasplantes de órganos así como las técnicas aplicadas en reproducción humana asistida, son capaces de generar unos resultados genéticos difíciles de interpretar por un forense. En el presente trabajo se dedica a revisar cómo estos procedimientos se han convertido involuntariamente en una posible fuente de error para investigadores del crimen.

Palabras clave: Ciencia Forense, Genética Forense, Quimerismo, Trasplantes, Técnicas de Reproducción Humana Asistida.

Abstract: Since Alec Jeffreys discovered the genetic fingerprint, DNA has become an indispensable tool for crime investigators. His power for identification is based on the certainty that the DNA of each person comes undoubtedly from their parents, being unique. But nature can generate disturbances that seem to contradict those precepts, leading to mislead the forensic experts. Chimerism cases are a good example. Also transfusions, organ transplants and the techniques used in assisted human reproduction, are able to generate genetic results difficult to interpret by forensics. The present work is devoted to review how these procedures have become involuntarily, a possible source of error for crime investigators.

Key words: Forensic Science, Forensic Genetics, Chimerism, Transplantation, Assisted Human Reproduction.

LOS PRIMEROS PASOS DE LA HUELLA GENÉTICA

"That's my boy". Este es el titular que eligió un conocido periódico inglés para encabezar la noticia sobre la resolución del caso Sarbah versus Home Office, a favor del demandante. Fue el diecisiete de mayo de 1985.

Esta historia con final feliz comenzó dos años antes cuando Andrew, el hijo de trece años de Christiana Sarbah regresaba a su casa en Londres, tras pasar una larga temporada en la India junto a su padre. Sin embargo no pudo conseguir su objetivo porque ante su sorpresa, fue detenido en el aeropuerto de Heathrow. Se le acusaba de un grave delito: no era quien decía ser.

Según se le hizo saber había fundadas sospechas de que el verdadero Andrew había cedido su pasaporte a un familiar, para facilitar su entrada a Inglaterra de forma ilegal. De nada sirvieron las declaraciones de la madre y hermanos del detenido. Tampoco las comparaciones hechas mediante fotografía porque según se argumentó, si el suplantador era, como se suponía, hijo de una hermana de Christiana, cabía esperar un cierto parecido familiar.

Así estaban las cosas hasta que los trabajadores del Hammersmith Law Centre, una institución dedicada a proporcionar ayuda legal a los menos favorecidos, encargada de la defensa, fueron informados de un nuevo e interesante descubrimiento que les llenó de esperanza: la huella genética^{1,2}. De forma que se pusieron en contacto con su descubridor, un investigador de la Universidad de Leicester, Alec Jeffreys, para pedir su colaboración.

Aceptada la solicitud de auxilio, el profesor utilizó muestras de sangre de Christina Sarbah y tres de sus hijos – indiscutidos- David, Joyce y Diana, para obtener las respectivas huellas genéticas. Seguidamente las comparó con la que correspondía a quien afirmaba ser Andrew, para llegar a la conclusión de que no había intento de engaño³. Su

informe fue tan contundente que el mismo Home Office después de reconocer su error, incluyó esta nueva prueba genética como una nueva herramienta para el control de inmigración^I.

Tras el éxito de esta primera intervención de la huella genética en el ámbito forense, no es de extrañar que pronto se viera implicada en la resolución de otros problemas de filiación. Tampoco que pronto se reclamara su auxilio en la investigación de casos criminales.

Curiosamente el primero de ellos en el que se le hizo participar tuvo una doble contribución: identificar al culpable y exonerar a quien se había sido acusado de serlo^{II}.

Así fue como la Genética pasó a ser –treinta años después de que fuera descrita la estructura del ADN⁴- una herramienta imprescindible en investigación criminal.

Sin embargo pronto se puso de manifiesto que la huella genética podía ser cuestionada ante los tribunales. El motivo principal se debía a su complejidad. En efecto, el procedimiento descrito por el profesor Jeffreys exigía trabajar con un ADN bien conservado –lo que no es habitual en los casos forenses- y además los resultados eran difíciles de interpretar. Esto último se debía principalmente a que en la necesaria electroforesis final, la superposición de bandas era inevitable, provocando que en la mayoría de los casos no fuera posible afirmar si había coincidencia entre las muestras que se comparaban o no.

De forma que se hizo necesario mejorar la técnica de análisis y esto se consiguió cuando el doctor Kary Banks Mullis, dio a conocer a la comunidad científica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR en adelante)⁵. Esta *fotocopiadora de ADN* hizo posible trabajar con los pequeños fragmentos –Short Tandem Repeats o STR- que son los encargados de conformar la huella genética moderna.

El nuevo sistema presenta indudables ventajas frente al propuesto por el profesor Jeffreys. La principal es que utiliza para la identificación STRs, lo que supone que podrá funcionar en un ADN parcialmente degradado si hay suerte. También que permite el análisis de cantidades de muestra mínimas porque es extremadamente sensible. Sin embargo este incuestionable *pro*, es a su vez un *contra* puesto que lo convierte en especialmente vulnerable a la contaminación. No obstante y manteniendo las debidas precauciones en todas las etapas de la investigación, incluyendo entre ellas la interpretación de los resultados, su potencial no puede ponerse en duda.

Con el tiempo, a los marcadores tradicionales se ha unido el estudio de STR exclusivos del cromosoma Y. Son los que facilitan el estudio de la línea paterna, el análisis en casos de agresión sexual por uno o más individuos, en los que cabe esperar una contribución femenina predominante en la muestra y también cuando se debe trabajar con restos degradados, en los que falla la primera opción.

Asimismo el ADN mitocondrial ha reclamado su propio espacio y se dedica al análisis de la línea materna. Pero además gracias a su pequeño tamaño y las numerosas copias que se repiten en cada célula, es el recurso al que se opta cuando por el estado de las muestras no cabe otra posibilidad de éxito.

Más reciente es el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido (en adelante SNPs) con los que se consigue resultados en muestras degradadas y son los protagonistas de los más recientes estudios destinados a la determinación de características físicas, como es el color de los ojos, el pelo o la piel^{6,7}

^I Se puede leer más sobre este primer caso de filiación en:

<http://dnafingerprinting19.tripod.com/id14.html> (última vista en julio 2014)

^{II} Se trata del caso Dawn Ashworth, una niña de quince años, cuyo cadáver fue hallado en las afueras de Elderby, en 1986. Los restos de semen sirvieron para obtener la huella genética del donante que se comparó con la del principal sospechoso, Richard Buckland, quien curiosamente se había acusado a sí mismo, comprobándose que no había correspondencia.

Comenzó entonces la búsqueda del autor de los hechos y con ese fin se tomó muestras a todos los varones entre 17 y 34 años que vivían en la zona (fueron cerca de cuatro mil muestras) pero no hubo coincidencias. Unos meses después una vecina del pueblo informó a la policía de que había oído comentar a un tal Ian Kelly que en la toma de muestras había ido en lugar de un amigo, Colin Pitchford.

Tras los necesarios análisis se comprobó que Colin Pitchford era la persona buscada. Se le acusó además de otra acción similar –el asesinato de otra joven, Lynda Mann- que había quedado sin resolver.

Se puede leer la historia completa en los enlaces siguientes:

<http://www.exploreforensics.co.uk/forensic-cases-colin-pitchfork-first-exoneration-through-dna.html> (última vista en julio 2014)

<https://spydersden.wordpress.com/2011/09/29/first-person-convicted-of-murder-based-on-dna-evidence/> (última vista en julio 2014)

Todos estos avances que se han puesto al servicio de la Justicia se sustentan en dos principios indiscutibles:

El ADN de cada persona procede de sus progenitores.

El ADN de cada persona es único e irrepetible.

Es por esto que cuando se obtienen los marcadores de ADN a partir de por ejemplo, unos restos óseos, se podrán comparar con los procedentes de personas desaparecidas buscando la coincidencia que conseguiría su identificación. O en el caso de que no se disponga de estos datos, siempre se podrá recurrir a los progenitores en base a la primera máxima anteriormente citada y problema resuelto.

Sin embargo lamentablemente la realidad no siempre se ajusta a la teoría. Porque el mismo ADN que con tanta eficacia trabaja mano a mano con los expertos forenses, puede convertirse como se verá seguidamente en la causa de su error.

POSIBLES CAUSAS DE ERROR EN LA INTERPRETACIÓN DEL ANÁLISIS FORENSE

En algunas ocasiones esto sucede porque la naturaleza tiende una trampa difícil de detectar. Recuérdese como ejemplo los casos de quimerismo, en los que se podrá encontrar en un mismo individuo, dos ADN nucleares diferentes.

Es conveniente recordar en este momento que el quimerismo puede tener un origen natural –y en consecuencia no controlado por no ser conocido- o artificial.

La literatura especializada reconoce dos posibles orígenes para la primera variedad. Por una parte se describe el denominado quimerismo transplacentario (o microquimerismo) que se produce como consecuencia del tráfico de células entre la madre y el feto. Este intercambio celular fue demostrado en su momento tras analizar el ADN en la muestra de sangre de una mujer embarazada, comprobándose la presencia de STR correspondientes al cromosoma Y⁸. Estos además, tal como se puso de manifiesto en posteriores investigaciones, permanecían tras el embarazo⁹, de forma que podrían ser localizados mucho tiempo después¹⁰. De hecho se ha estado ensayando la mejor forma de evitar esta interferencia cuando se trabaja con muestras forenses, comprobándose que se produce con mayor frecuencia al aumentar en número de ciclos de PCR y también cuando la cantidad de ADN es alta¹¹.

El microquimerismo se produce también en gemelos no idénticos, como consecuencia del intercambio de sangre entre ellos durante la gestación. Incluso puede deberse a un *gemelo fantasma*. Por este efecto se explica la presencia de marcadores masculinos, en mujeres que no han tenido hijos^{12,13,14,15}.

La otra variante es conocida como quimerismo tetragamético y se produce cuando dos óvulos fecundados se unen para formar un único individuo. En esta situación el nuevo organismo estará constituido por dos dotaciones genéticas diferentes, como si se tratara de dos personas en una. Lo que evidentemente puede llevar a confusión al encargado de interpretar el análisis genético, tal como se muestra en algunos casos curiosos que describe la bibliografía. Se trata de historias en las que se ha cuestionado la paternidad o maternidad en base a discrepancias genéticas que al final, han sido explicadas satisfactoriamente^{16,17}.

Por último y para cerrar este grupo de quimeras naturales, se debe mencionar aquellas que tienen origen en diferentes variedades de cáncer^{18,19,20,21}, capaces de proporcionar resultados que en principio parecen inexplicables para los investigadores forenses. Sirva como muestra el descrito en el artículo que consta en la referencia²². Trata sobre el análisis genético realizado sobre las muestras procedentes del cadáver de un hombre, hallado en su casa. Resultó que durante el examen médico forense se detectó una emasculación parcial como única lesión. Tras la necesaria investigación –y apoyándose en la ausencia de más daños- se llegó a la conclusión de que el responsable de esa emasculación debió ser el perro del finado. En consecuencia se sometió al animal a un tratamiento con eméticos para conseguir recuperar la pieza en cuestión.

Después se realizó el necesario análisis de ADN destinado a determinar si –tal como se esperaba- procedía del cadáver y los resultados ante la sorpresa de los investigadores, fueron excluyentes.

Se procedió entonces al estudio de la historia clínica del fallecido, comprobándose que no incluía tratamiento o intervención alguna que pudiera explicar la discrepancia. Sin embargo se pudo comprobar que padecía un linfoma. En consecuencia, ante la imposibilidad de obtener muestras de los padres del occiso para determinar un posible origen natural de la quimera, y atendiendo a los datos que se conocen sobre este efecto en enfermos de cáncer, se optó por aceptar que efectivamente esta patología fue la responsable de la confusión.

Por su parte el quimerismo artificial tiene un origen iatrogénico. Se debe por ejemplo, a transfusiones sanguíneas²³. También a trasplantes de médula ósea²⁴, en los que la medida del grado de quimerismo es un mecanismo de control que evalúa la eficacia del trasplante. Sin embargo en ocasiones puede ser motivo de confusión cuando se trabaja en casos criminales. En el artículo de la referencia²⁵ se describe un caso en el que se aborda el análisis de ADN de las muestras –hisopo vaginal, ropa interior e hisopo bucal de referencia- procedentes de una mujer que según se sospechaba, había sido violada mientras se encontraba inconsciente. Esta hipótesis pareció confirmarse tras obtener dos perfiles de ADN en las dos primeras muestras y uno único en la de referencia. Sin embargo al realizar análisis complementarios sobre muestras de sangre y pelo de la supuesta víctima, se encontraron perfiles diferentes al procedente de su saliva.

La explicación a esta aparente contradicción se encontró en un trasplante de médula ósea, realizado para tratar una leucemia y en el que el donante fue un niño. De hecho la bibliografía muestra datos suficientes para aceptar que tras un tratamiento de este tipo, es habitual hallar el ADN ajeno incluso en las muestras bucales²⁶.

Otros órganos objeto de trasplante han sido a su vez causa de esta alteración, como se ha demostrado al detectarse ADN del donante en muestras de sangre de los receptores de hígado y riñón^{27,28}. Este hallazgo sería en principio un buen indicador del éxito de la intervención, aunque por otra parte es a su vez una fuente de posibles problemas porque es susceptible de provocar una respuesta inmune del paciente. No cabe duda de que también puede serlo para los forenses.

Asimismo los conocimientos adquiridos sobre células madre podrían introducir otras posibilidades de quimerismo artificial. La hipotética existencia de células madre germinales en la médula ósea, con la capacidad de circular y colonizar diferentes órganos, sería la causa²⁹. Sin embargo de momento el asunto se halla en periodo de investigación.

También el avance de las técnicas de reproducción asistida va a generar involuntariamente complicaciones añadidas en la investigación criminal.

En principio porque tal como muestra la bibliografía, al potenciar los embarazos múltiples favorecen el quimerismo^{30,31 32,33,34}.

Sin embargo no es este el único camino para inducir a error a los expertos en Genética Forense. Se debe recordar que en este ámbito se trabaja habitualmente con el fin de identificar individuos o restos de ellos. También con la intención de asignar una muestra biológica a su donante.

Centrémonos en el primero de los supuestos y ante el problema, por ejemplo, de asignar nombre y apellidos a unos restos humanos. Esto se podrá lograr cotejando el perfil de ADN procedente de los restos problema, con otros que se hayan almacenado en bases de datos. Estas últimas pueden generarse a partir de los perfiles correspondientes a familiares de personas desaparecidas o alternativamente, guardarían aquellos que se obtuvieron de personas que en algún momento han tenido algo que ver con la Justicia.

En ocasiones el estudio conjunto del ADN problema, junto con el de los familiares, dará el resultado buscado. Pero si no es así existen otras posibilidades como son el análisis de STR del cromosoma Y o del ADN mitocondrial. De hecho la mayoría de bases de datos dedicadas a la identificación de personas desaparecidas, trabajan con este último^{III}.

Es obvio que la identificación se complicará si están de por medio las mencionadas técnicas destinadas a esquivar los obstáculos que impone la naturaleza. Será posible que el individuo a identificar sea portador del ADN materno pero no el paterno, o al revés. Otros puede que no mantengan ninguno de los dos y en este caso se puede complicar el asunto si los donantes fueran familiares de los padres.

No es el objetivo de este texto revisar los diferentes procedimientos que se aplican en la reproducción asistida^{35,36}, sino hacer hincapié en su posible interferencia en la investigación forense. Es por esto que en lo que sigue se va a hacer referencia a nuevos ensayos que como se verá enseguida, serían capaces de generar un auténtico puzzle genético difícil de valorar por los expertos.

^{III} Por ejemplo la base de datos Fénix:

<http://www.fundacionbarrie.org/component/content/article/6/40-programa-fenix-investigacion-genetica-personas-desaparecidas>

(última vista en julio 2014)

O la base de datos DNA_prokids:

<http://www.dna-prokids.org/> (última vista en julio 2014)

Como se verá enseguida su origen se encuentra en la necesidad de esquivar enfermedades que la madre trasmite al feto, porque su herencia está asociada al ADN mitocondrial.

En principio la forma más lógica de evitar la patología en la descendencia sería seleccionar embriones masculinos y desechar los femeninos. Se trata entonces de proceder a una selección del sexo del embrión con fines terapéuticos. Conviene recordar que la posibilidad de seleccionar el sexo de la descendencia es un asunto que se viene manejando desde la antigüedad. De hecho tienen su origen en la antigua Grecia, entre el 500 al 428 a.C, y no con el fin de evitar una enfermedad, sino más bien justificados por la mayor relevancia social y cultural adjudicada en esa época a los varones. El procedimiento utilizado tenía su fundamento en una hipótesis, defendida por el filósofo Anaxágoras, según la cual los espermatozoides presentes en el testículo izquierdo originaban mujeres. Por tanto bastaba eliminarlo para conseguir la producción de individuos del sexo masculino únicamente. Después se le unieron otras propuestas igualmente curiosas. Leófanos por ejemplo, introdujo una variación al método original de Anaxágoras, al sugerir que en lugar de extirpar el testículo a anular, se atara. Por su parte Empedocles asociaba el sexo del futuro bebé a la cantidad de calor de la matriz, e incluso Aristóteles dio su opinión al respecto para mostrarse cauteloso sobre la eficacia de estos procedimientos^{IV}.

Afortunadamente estas ideas iniciales han quedado en el olvido y en la actualidad se cuenta con técnicas que aseguran buenos resultados.

Sin embargo recientemente se ha ido algo más allá de la simple selección del sexo y se trabaja en nuevas investigaciones que, aunque en principio se desarrollaron con el objetivo de mejorar la fertilidad, actualmente se están orientando hacia la prevención de enfermedades mitocondriales.

El origen de estas técnicas se encuentra en el conocimiento de que la calidad del citoplasma del oocito (también denominado ooplasma) es determinante para la fertilidad, siendo un factor limitante de las posibilidades de embarazo. En consecuencia para tratar de mejorarla una de las posibilidades es recurrir a lo que se conoce como transferencia citoplasmática (o citotransfer en adelante). Mediante este procedimiento se sustituye el citoplasma del ovocito procedente de una paciente con fracaso de implantación recurrente, por otro que se extrae del procedente de una donante potencialmente fértil^{37,38,39}.

Como consecuencia y puesto que la sustitución no es completa -afecta generalmente a un 10-15% de citoplasma-, el individuo derivado sería poseedor de tres ADN, uno nuclear y dos mitocondriales (lo que se conoce como heteroplasma).

Otra posibilidad de corregir la baja calidad del ooplasma se fundamenta en la transferencia del núcleo del oocito *problema* a otro sano que previamente ha sido enucleado. Este procedimiento evita en principio la presencia de dos poblaciones mitocondriales (puesto que solo se mantendrían las del citoplasma donante). No obstante se debe tener en cuenta que en los núcleos extraídos pueden quedar mitocondrias residuales. Los intentos de eliminarlas mediante tratamientos de incubación en bromuro de etidio o por centrifugación, por ejemplo. No consiguen el éxito en un 100%.

Por tanto de nuevo se debe aceptar la posibilidad de que se genere heteroplasma.

Estas técnicas no se practican hoy en día con el objetivo para el que se diseñaron debido a los problemas éticos que conllevan, así como por la falta de seguridad de sus resultados. Efectivamente se debe admitir que no es posible asegurar que la transferencia de citoplasma sea una técnica segura, pese a que mejore la calidad de los embriones. La misma valoración sería aplicable a la transferencia de núcleo, que además genera un rechazo añadido por su similitud con la clonación.

Sin embargo como se ha apuntado anteriormente, se están postulando como una opción para evitar la transmisión de enfermedades mitocondriales.

En este sentido e independientemente de los mencionados problemas éticos que estos procedimientos suscitan, junto con los riesgos -aún no evaluados- para la salud futura del individuo generado con su auxilio^{40,41,42,43}, no hay duda que de ser llevadas a la práctica, estas técnicas van a complicar el estudio genético con fines forenses, añadiendo a las posibles causas conocidas de error otras muchas de difícil control. El tiempo dirá si se pueden aceptar como una opción válida.

^{IV} Ver más en: <http://latunicadeneso.wordpress.com/2009/01/18/seleccion-de-sexo-en-la-antigua-grecia/> (última vista en julio 2014)

Mientras tanto y por si acaso, quizá sea necesario más que nunca tener presente el acertado consejo que ofreció el Maestro Holmes cuando dijo *"Una vez que se descarta lo imposible, lo que queda es la verdad por improbable que parezca"*^v.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 1985 Mar 7-13;314(6006):67-73. doi:10.1038/314067a0.
- ² Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*. 1985 Jul 4-10;316(6023):76-79. doi:10.1038/316076a0.
- ³ Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*. 1985 Oct 31-Nov 6;317(6040):818-819. doi:10.1038/317818a0.
- ⁴ Watson JD, Crick FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953;171:737-738.
- ⁵ Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-350.
- ⁶ Dembinski GM, Picard CJ. Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. *Forensic Sci Int Genet*. 2014 Mar;9:111-117. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.12.003.
- ⁷ Gettings KB, Lai R, Johnson JL, Peck MA, Hart JA, Gordish-Dressman H, Schanfield MS, Podini DS. A 50-SNP assay for biogeographic ancestry and phenotype prediction in the U.S. population. *Forensic Sci Int Genet*. 2014 Jan;8(1):101-8. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.07.010. Epub 2013 Aug 17.
- ⁸ Costa JM, Benachi A, Gautier E, Jouannic JM, Ernault P, Dumez Y. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. *Prenat Diagn*. 2001;21(12):1070-1074.
- ⁹ Klintschar M, Schwaiger P, Regauer S, Mannweiler S, Kleiber M. Persisting fetal microchimerism does not interfere with forensic Y-chromosome typing. *J Forensic Sci Int*. 2004;139(2):151-154.
- ¹⁰ Bayes-Genis A, Bellosillo B, de la Calle O, Salido M, S Roura, Ristol FS, et al. Identification of male cardiomyocytes of extracardiac origin in the hearts of women with male progeny. *J Heart Lung Transpl* . 2005; 24 (12):2179-2183.
- ¹¹ Klintschar M1, Schwaiger P, Regauer S, Mannweiler S, Kleiber M. Persisting fetal microchimerism does not interfere with forensic Y-chromosome typing. *Forensic Sci Int*. 2004 Jan 28;139(2-3):151-154.
- ¹² Yan Z1, Lambert NC, Guthrie KA, Porter AJ, Loubiere LS, Madeleine MM, Stevens AM, Hermes HM, Nelson JL. Male microchimerism in women without sons: quantitative assessment and correlation with pregnancy history. *Am J Med*. 2005 Aug;118(8):899-906.
- ¹³ Waszak M, Ciešlik K, Wielgus K, Słomski R3, Szalata M, Skrzypczak-Zielińska M, Kempiak J, Bręborowicz G. Microchimerism in twins. *Arch Med Sci*. 2013 Dec 30;9(6):1102-6. doi: 10.5114/aoms.2013.39212. Epub 2013 Nov 29.
- ¹⁴ Lee DO, Cho D, Shin MG, Kim SO, Parque JT , Kim HK , Ryang DW . The first known case of blood group chimerism in monochorionic dizygotic twins in Korea. *Ann Lab Med*. 2014 May;34(3):259-62. doi: 10.3343/alm.2014.34.3.259. Epub 2014 Apr 8.
- ¹⁵ Lee HJ1, Yoon SC, Ko JM, Seong MW, Park SS, Choi JS, Oh SK. Monochorionic dizygotic twins with discordant sex and confined blood chimerism. *Eur J Pediatr*. 2014 Apr 6. (pendiente de publicación)
- ¹⁶ Yu N, Kruskall MS, Yunis JJ, Knoll JH, Uhl L, Alosco S, Ohashi M, Clavijo O, Husain Z, Yunis EJ, Yunis JJ, Yunis EJ. Disputed maternity leading to identification of tetragametic chimerism. *N Engl J Med*. 2002 May 16;346(20):1545-1552.
- ¹⁷ Yu Q , Q Li , Gao S, Do Y, Z Deng . Congenital tetragametic blood chimerism explains a case of questionable paternity. *J Forensic Sci*. 2011 Sep; 56 (5) :1346-8. doi: 10.1111/j.1556-4029.2011.01794.x.
- ¹⁸ Pai CY, Hsieh LL, Tsai CW, Chiou FS, Yang CH, Hsu BD. Allelic alteration at the STR markers in the buccal tissue cells of oral cancer patients and the oral epithelial cells of healthy betel quid-chewers: an evaluation of forensic applicability. *Forensic Sci Int*. 2002;129:158-167.
- ¹⁹ Peloso G, Grignani P, Rosso R, Previderè C. Forensic evaluation of tetranucleotide STR instability in lung cancer. *International Congress Series 1239*. Elsevier, Amsterdam; 2003:719-721.

^v En Conan Doyle A. *The Adventure Of The Beryl Coronet* Story 13, Case 30, *The Strand Magazine*, May 1892. <http://freeread.com.au/@RGLibrary/ArthurConanDoyle/SherlockHolmes/ADVE.html> (última vista en julio 2014)
En español en: http://www.ciudadseva.com/textos/cuentos/ing/doyle/la_corona_de_berilos.htm (última vista en julio 2014)

- ²⁰ Edelmann J, Lessig R, Hering S, Horn L-C. Loss of heterozygosity and microsatellite instability of forensically used STR markers in human cervical carcinoma. *International Congress Series* 1261. Elsevier, Amsterdam, 2004:499–501.
- ²¹ Vauhkonen H, Hedman M, Vauhkonen M, Kataja M, Sipponen P, Sajantila A. Evaluation of gastrointestinal cancer tissues as a source of genetic information for forensic investigations by using STRs. *Forensic Sci Int.* 2004; 139:159–167.
- ²² Castella V, Lesta Mdel M, Mangin P. One person with two DNA profiles: a(nother) case of mosaicism or chimerism. *Int J Legal Med.* 2009 Sep;123(5):427-430. doi:10.1007/s00414-009-0331-1.
- ²³ Brunker PA. Chimerism in transfusion medicine: the grandmother effect revisited. *Chimerism.* 2013 Oct-Dec;4(4):119-125. doi: 10.4161/chim.26912.
- ²⁴ Dauber EM, Dornera G, Mitterbauer M, Wendaa S, Faéa I, Glocke B, Mayra WR. Discrepant results of samples taken from different tissues of a single individual. *International Congress Series* 1261. Elsevier, Amsterdam, 2004:48-49.
- ²⁵ Pope S, Chapman H, Lambert JA. Effect of bone marrow transplant on DNA profiles: a case example. *Sci Justice* 2006;46:231–237.
- ²⁶ Tran SD, Pillemer SR, Dutra A, Barrett AJ, Brownstein MJ, Key S, Pak E, Leakan RA, Kingman A, Yamada KM, Baum BJ, Mezey E. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet* 2003 Mar 29;361(9363):1084-1088.
- ²⁷ Rutkowska J, Interewicz B, Rydzewski A, Swietek M, Dominiak A, Durluk M, Olszewski WL. Donor DNA is detected in recipient blood for years after kidney transplantation using sensitive forensic medicine methods. *Ann Transplant.* 2007;12(3):12-14.
- ²⁸ Dauber EM, Müller CJ, Schöniger-Hekele M et al. Artificial blood chimerism and graft-versus-host disease alter liver transplantation. *International Congress Series* 1288. Elsevier, Amsterdam, 2006:840–842.
- ²⁹ Blau IW, Basara N, Lentini G, Guenzelmann S, Kirsten D, Schmetzer B, Bischoff M, Roemer E, Kiehl MG, Fauser AA. Feasibility and safety of peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors: results of a single-center study. *Bone Marrow Transplant.* 2001 Jan;27(1):27-33.
- ³⁰ Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I. Fertilization and cleavage of oocytes from a binovular human ovarian follicle: a possible cause of dizygotic twinning and chimerism. *Fertil Steril.* 1983 Dec;40(6):841-843.
- ³¹ Van de Leur SJ, Zeilmaker GH. Double fertilization in vitro and the origin of human chimerism. *Fertil Steril.* 1990 Sep;54(3):539-540.
- ³² Kühl-Burmeister R, Simeoni E, Weber-Matthiesen K, Milde A, Herwartz C, Neppert J, Suttrop M. Equal distribution of congenital blood cell chimerism in dizygotic triplets after in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 2000 May;15(5):1200-1204.
- ³³ Williams CA, Wallace MR, Drury KC, Kipersztok S, Edwards RK, Williams RS, Haller MJ, Schatz DA, Silverstein JH, Gray BA, Zori RT. Blood lymphocyte chimerism associated with IVF and monozygotic twinning: case report. *Hum Reprod.* 2004 Dec;19(12):2816-2821.
- ³⁴ Simon-Bouy B, Plachot M, Mokdad A, Lavaud N, Muti C, Bazin A, Vialard F, Belaisch-Allart J. Possible human chimera detected prenatally after in vitro fertilization: a case report. *Prenat Diagn.* 2003 Nov;23(11):935-937.
- ³⁵ Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Volume One: Laboratory Perspectives*; 2012
- ³⁶ Kuldeep J, Talwar P. *IVF Techniques for the Beginners.* Jaypee, India; 2013
- ³⁷ Brenner CA, Barritt JA, Willadsen S, Cohen J. Mitochondrial DNA heteroplasmy after human ooplasmic transplantation. *Fertil Steril.* 2000 Sep;74(3):573-578.
- ³⁸ Dale B, Wilding M, Botta G, Rasile M, Marino M, Di Matteo L, De Placido G, Izzo A. Pregnancy after cytoplasmic transfer in a couple suffering from idiopathic infertility: case report. *Hum Reprod.* 2001 Jul;16(7):1469-1472.
- ³⁹ Levy R, Elder K, Ménéz Y. Cytoplasmic transfer in oocytes: biochemical aspects. *Hum Reprod Update.* 2004 May-Jun;10(3):241-50.
- ⁴⁰ Nuffield Council on Bioethics. *Mitochondrial DNA disorders.* Report.
http://www.nuffieldbioethics.org/sites/default/files/Novel_techniques_for_the_prevention_of_mitochondrial_DNA_disorders_compressed.pdf
- ⁴¹ Condit ML. We Are Not Just Our DNA: The Ethical Dangers of Three-Parent Embryos. *Public Discourse* 2014. *Electronic Journal*:
<http://www.thepublicdiscourse.com/2014/03/12897/>
- ⁴² Callaway E. Reproductive medicine: The power of three. *Nature.* 2014 May 22;509(7501):414-7. doi: 10.1038/509414a.
- ⁴³ <http://www.hfea.gov.uk/8807.html> Review of scientific methods to avoid mitochondrial disease - 2014 update