

JUAN SALVAT PUIG

**TIPAJE DE LOS MARCADORES GENÉTICOS
ABO, Rh, MNSs, Gc, Pi y AcP EN LA COMARCA SALMANTINA
DE LAS ARRIBES DEL DUERO.
APLICACIONES MEDICOLEGALES**



EDICIONES UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

COLECCIÓN VITOR

72

©

Ediciones Universidad de Salamanca
y Juan Salvat Puig
1ª edición: Octubre, 2001
I.S.B.N.: 84-7800-849-7
Depósito Legal: S. 1309-2001

Ediciones Universidad de Salamanca
Plaza de San Benito, s/n
37002 Salamanca (España)
Página en internet: <http://webeus.usal.es>
Correo-e: eus@usal.es

Realización:
Nemática, S.L.

Impreso en España - Printed in Spain

*Todos los derechos reservados.
Ni la totalidad ni parte de este libro
puede reproducirse ni transmitirse
sin permiso escrito de
Ediciones Universidad de Salamanca*

CEP. Servicio de Bibliotecas

SALVAT PUIG, Juan

Tipaje de los marcadores genéticos ABO, Rh, MNSs, Gc, Pi y AcP en la comarca salmantina de Las Arribes del Duero [Archivo de ordenador]: aplicaciones medicolegales / Juan Salvat Puig.—Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca, 2001
1 disco compacto.--(Colección Vitor; 72)
Tesis-Universidad de Salamanca, 2000

1. Universidad de Salamanca (España) -Tesis y disertaciones académicas. 2. Paternidad, Investigación de la-España-Salamanca (Provincia). 3. Genética.

347.63 : 575(043)

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas que han contribuido de alguna forma a la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Rafael Muñoz Garrido, Catedrático de Medicina Legal de la Universidad de Salamanca, por su estímulo y apoyo durante la realización de esta tesis.

Al Prof. Dr. D. Emilio Huguet Ramia, Catedrático de Medicina Legal de la Universidad Central de Barcelona, por sus consejos y continua colaboración.

A la Prof. Dra. Dña. Carmen Muñiz Fernández por su ayuda en el trabajo de documentación e investigación.

Al Prof. Dr. D. Secundino Vicente González, Profesor Asociado Medicina Legal de la Universidad de Salamanca, por su valiosísima ayuda e inestimables consejos.

A la Dra. Dña. Eva María García García, Profesora Colaboradora de Medicina Legal de la Universidad de Salamanca, por su colaboración desinteresada.

A los Médicos Titulares de los Municipios de La Ribera por su amable contribución y ayuda.

A las Enfermeras Titulares de los Municipios de La Ribera por su generosa colaboración en la recogida de muestras.

A los Alcaldes y Secretarios de los Ayuntamientos de La Ribera por las facilidades brindadas para que este trabajo fuera realizado.

A todas las Personas residentes en los Municipios de Aldeadávila de la Ribera, Hinojosa de Duero, La Fregeneda, Masueco, Mieza, Pereña, Saucelle, Vilvestre y Villarino de los Aires, que hicieron posible esta investigación con la donación desinteresada de sus muestras de sangre.

Resumen

Los objetivos de este trabajo han sido conocer la distribución de las frecuencias fenotípicas y frecuencias génicas de tres grupos de antígenos eritrocitarios, ABO, Rh y MNSs, dos marcadores plasmáticos, proteínas Gc y Pi y de un marcador enzimático eritrocitario, la AcP₁ en la comarca natural “Las Arribes” de la provincia de Salamanca. Se ha realizado la comparación los resultados obtenidos con las frecuencias génicas de estos marcadores genético-moleculares en otras poblaciones españolas.

Además se ha comprobado la existencia de equilibrio Hardy-Weinberg y se ha calculado el índice de heterocigosidad para cada uno de los marcadores.

La selección de los individuos se realizó a partir del padrón municipal de 1996 de cada municipio. La muestra fue seleccionada mediante un proceso aleatorio simple solicitando su colaboración a cada persona elegida. El tamaño de la muestra fue de 404 personas y se distribuyó proporcionalmente al número de habitantes de cada municipio.

El análisis estadístico de la distribución de frecuencias fenotípicas teóricas y observadas mediante el estadístico ji-cuadrado permite establecer que en la población de Las Arribes existe equilibrio para los locus ABO, Rh, Gc, Pi y AcP₁, no existiendo dicho equilibrio para el locus MNSs.

Los índices de heterocigosidad calculados indican un elevado polimorfismo genético para todos los sistemas estudiados, destacando el sistema Rh.

La comparación de poblaciones permite establecer diferencias estadísticamente significativas con algunas poblaciones españolas, aunque también existen similitudes con otras, para cada marcador estudiado.

Abstract

The aim of the present work was to gain insight into the distribution of the phenotypical frequencies and gene frequencies of three groups of erythrocyte antigens-, ABO, Rh and MNSs-, two plasma markers -Gc and Pi proteins and one erythrocyte enzymatic marker- AcP₁- in the “Las Arribes” district of the province of Salamanca (Spain). The results obtained were compared with the gene frequencies of these genetic-molecular markers in other Spanish populations. We also observed the existence of Hardy-Weinberg equilibrium and calculated the heterozygosity index for each of the markers. Selection of subjects was based on the municipal census from 1996 in each municipality. The sample was selected by a simple randomised process, requesting participation from each person chosen. The sample comprised 404 individuals and was distributed proportionally to the number of inhabitants in each municipality.

Statistical analysis of the distribution of the theoretical phenotypical frequencies and those observed, using the χ^2 statistic, revealed that in the *Las Arribes* population there is equilibrium for the ABO, Rh, Gc, Pi and AcP₁ loci, this equilibrium not existing for the MNSs locus.

The heterozygosity indices calculated indicate a high degree of genetic polymorphism for all the systems studied, the Rh system being outstanding. Comparison of populations allowed us to establish statistically significant differences with other Spanish populations, although there were also similarities with others, for each marker studied.

INDICE

1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	12
2. INTRODUCCION.....	16
2.1. Aspectos jurídico-sociales	17
2.2. Métodos de investigación de la paternidad.....	20
2.3. Peritación medicolegal de la paternidad	28
2.3.1. Exclusión de la paternidad.....	28
2.3.2. Probabilidad de la paternidad	41
3. DELIMITACION DE LA COMARCA DE LAS ARRIBES	44
3.1. La provincia de Salamanca	45
3.1.1. Origen y geografía de Salamanca.....	45
3.1.2. Historia de la provincia de Salamanca	50
3.1.3. La repoblación de la provincia de Salamanca	55
3.1.4. Las comarcas de la provincia de Salamanca.....	68
3.1.5. La población de la provincia de Salamanca	72
3.2. El partido judicial de Vitigudino: Su evolución histórica.....	74
3.3. La comarca de Las Arribes	78
3.3.1. Las Arribes: denominaciones.....	78
3.3.2. Geografía de la comarca de Las Arribes.....	80
3.3.3. Historia de Las Arribes.....	83
3.3.4. Evolución de la población en Las Arribes.....	84
3.3.5. Economía de Las Arribes	88
3.3.6. Características de los riberanos.....	90

3.3.7.	Los pueblos de Las Arribes.....	92
4.	GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS	100
4.1.	Sistema ABO	101
4.1.1.	Características del sistema ABO	104
4.1.2.	Función del sistema ABO	108
4.1.3.	Genética del sistema ABO	109
4.1.4.	El sistema ABO en la investigación de la paternidad.....	117
4.2.	Sistema Rh	120
4.2.1.	Características del sistema Rh	121
4.2.2.	Función del sistema Rh	121
4.2.3.	Genética del sistema Rh.....	123
4.2.4.	El sistema Rh en la investigación de la paternidad.....	125
4.3.	Sistema MNSs	128
4.3.1.	Características del sistema MNSs.....	129
4.3.2.	Función del sistema MNSs	131
4.3.3.	Genética del sistema MNSs.....	132
4.3.4.	El sistema MNSs en la investigación de la paternidad.....	136
4.4.	Sistema Gc	138
4.4.1.	Características del sistema Gc	140
4.4.2.	Función del sistema Gc	141
4.4.3.	Genética del sistema Gc	142
4.4.4.	El sistema Gc en la investigación de la paternidad....	145
4.5.	Alfa-1-antitripsina	149
4.5.1.	Características de la alfa-1-antitripsina	150

4.5.2.	Función de la alfa-1-antitripsina	153
4.5.3.	Genética de la alfa-1-antitripsina.....	156
4.5.4.	La alfa-1-antitripsina en la investigación de la paternidad.....	159
4.6.	Fosfatasa ácida eritrocitaria.....	161
4.6.1.	Características de la fosfatasa ácida	161
4.6.2.	Función de la fosfatasa ácida.....	164
4.6.3.	Genética de la fosfatasa ácida	165
4.6.4.	La fosfatasa ácida en la investigación de la paternidad.....	167
5.	MATERIAL Y METODOS	169
5.1.	Selección de los individuos.....	170
5.2.	Material.....	172
5.3.	Productos.....	174
5.4.	Metodología estadística	178
5.4.1.	Poblaciones estudiadas	178
5.4.2.	Muestreo.....	179
5.4.3.	Frecuencia fenotípica y génica.....	182
5.4.4.	Equilibrio de Hardy-Weinberg	188
5.4.5.	Índice de heterocigosidad.....	194
5.4.6.	Comparación de poblaciones.....	195
5.4.7.	Probabilidad de paternidad.....	195
5.5.	Metodología analítica	204
5.5.1.	Toma y tratamiento de la muestra	204
5.5.2.	Métodos de aglutinación.....	205
5.5.2.1.	Sistema ABO	206

5.5.2.2. Sistema Rh.....	209
5.5.2.3. Sistema MNSs.....	212
5.5.3. Métodos electroforéticos	217
5.5.3.1. Sistema Gc.....	217
5.5.3.2. Alfa-1-antitripsina	220
5.5.3.3. Fosfatasa ácida eritrocitaria	223
6. RESULTADOS	227
6.1. Frecuencia fenotípica y génica.....	228
6.1.1. Sistema ABO.....	228
6.1.2. Sistema Rh.....	229
6.1.3. Sistema MNSs	230
6.1.4. Sistema Gc.....	231
6.1.5. Alfa-1-antitripsina	232
6.1.6. Fosfatasa ácida eritrocitaria	233
6.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	234
6.2.1. Sistema ABO.....	234
6.2.2. Sistema Rh.....	235
6.2.3. Sistema MNSs	237
6.2.4. Sistema Gc.....	238
6.2.5. Alfa-1-antitripsina	239
6.2.6. Fosfatasa ácida eritrocitaria	240
6.3. Índice de heterocigosidad.....	241
6.4. Comparación de poblaciones	242
6.4.1. Sistema ABO.....	242
6.4.2. Sistema Rh.....	243
6.4.3. Sistema MNSs	244

6.4.4. Sistema Gc.....	245
6.4.5. Alfa-1-antitripsina	246
6.4.6. Fosfatasa ácida eritrocitaria	247
7. DISCUSION.....	248
7.1. Consideraciones sobre el muestreo	249
7.2. Consideraciones sobre los resultados genético-poblacionales	251
7.2.1. Sistema ABO.....	251
7.2.2. Sistema Rh.....	253
7.2.3. Sistema MNSs	255
7.2.4. Sistema Gc.....	256
7.2.5. Alfa-1-antitripsina	257
7.2.6. Fosfatasa ácida eritrocitaria	258
7.3. Aplicación de los polimorfismos genéticos estudiados al cálculo de la probabilidad de paternidad.....	260
7.3.1. Sistema ABO.....	261
7.3.2. Sistema Rh.....	263
7.3.3. Sistema MNSs	266
7.3.4. Sistema Gc.....	267
7.3.5. Alfa-1-antitripsina	268
7.3.6. Fosfatasa ácida eritrocitaria	268
8. CONCLUSIONES	270
9. BIBLIOGRAFIA.....	276

1. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

En cumplimiento del mandato constitucional (Art. 39.2) se promulgó Ley 11/1981, de 13 de mayo, de modificación del Código Civil en materia de filiación, patria potestad y régimen económico del matrimonio (B.O.E. núm. 119, de 19 de mayo de 1981)¹, lo cual ha supuesto un gran aumento de las peritaciones sobre investigación biológica de la paternidad.

Entre los métodos posibles para la identificación genética individual y poblacional, el estudio de los marcadores genéticos sanguíneos ha tenido un gran desarrollo y su uso se ha extendido en el campo de la Medicina Legal dada su fiabilidad y garantía, alcanzando gran importancia en su doble vertiente de Biología Forense y de Genética de Poblaciones Humanas.

Actualmente, en los aspectos de identificación genética individual está siendo muy utilizado el estudio de los polimorfismos del ADN, pero los marcadores genéticos sanguíneos mantienen su vigencia en el estudio de la Genética de Poblaciones Humanas.

¹ Código Civil. Art. 127: “En los juicios sobre filiación será admisible la investigación de la paternidad y de la maternidad mediante toda clase de pruebas, incluidas las biológicas”.

A través de los estudios que se han realizado se conocen las frecuencias relativas de varios marcadores genéticos para diferentes poblaciones españolas y mundiales. Sin embargo, son escasos los trabajos realizados en este campo en las poblaciones de la provincia de Salamanca².

Por todo ello, en el presente trabajo se pretende conocer la distribución de las frecuencias fenotípicas y frecuencias génicas de una serie de marcadores hemáticos en la población de la comarca natural “Las Arribes” de la provincia de Salamanca.

La comarca salmantina de “Las Arribes” tiene su propia idiosincrasia. Es una comarca con elevado grado de endogamia y, desde la década de los años 60, ha sufrido un importante proceso de emigración.

Los datos obtenidos podrán ser contrastados con los resultados obtenidos en estudios similares, ya efectuados, en otras poblaciones españolas, aportando validez o incertidumbre, conociendo la limitada extensión que abarca este estudio, a los índices de paternidad empleados en la actualidad.

Los marcadores genéticos estudiados corresponden a tres grupos de antígenos eritrocitarios, grupos ABO, Rh y MNSs, a dos marcadores

² CASTELLANO ARROYO, M., MARTINEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético-moleculares en población española*, págs. 20-26.

plasmáticos, proteínas Gc y alfa-1-antitripsina, y a un marcador enzimático eritrocitario, la fosfatasa ácida.

La elección de estos sistemas se ha realizado considerando su pertenencia a los distintos marcadores genéticos y, dentro de éstos, a su polimorfismo y eficacia.

Se ha valorado, también, al elegirlos, el elevado número de estudios genético-poblacionales ya realizados con estos marcadores, lo que posibilitará una amplia valoración comparativa.

En definitiva, esperamos que este trabajo facilite el mejor conocimiento genético-poblacional de la provincia de Salamanca y contribuya a elevar el rendimiento de las peritaciones sobre paternidad de nuestro entorno así como la eficacia de los estudios de biología médicolegal.

2. INTRODUCCION

2.1. ASPECTOS JURIDICO-SOCIALES

La determinación de la paternidad se inscribe dentro del capítulo de la identificación de las personas y constituye en la actualidad uno de los más importantes de la Medicina Legal.

A este interés biológico debe sumarse el jurídico y el social. Las relaciones paterno-filiales están reguladas por el derecho de familia y éste ha sufrido, en España, una profunda revisión desde la aprobación de la vigente Constitución³.

En su artículo 39 dice:

1. Los poderes públicos aseguran la protección social, económica y jurídica de la familia.

2. Los poderes públicos aseguran, asimismo, la protección integral de los hijos, iguales éstos ante la Ley con independencia de su filiación, y de las madres, cualquiera que sea su estado civil. La Ley posibilitará la investigación de la paternidad.

³ *Constitución Española*, pág. 35.

3. Los padres deberán prestar asistencia de todo orden a los hijos habidos dentro o fuera del matrimonio, durante su minoría de edad y en los demás casos en que legalmente proceda.

4. Los niños gozarán de la protección prevista en los acuerdos internacionales que velan por sus derechos.

Este primer paso de nuestra Constitución culminó con la modificación de los artículos comprendidos en el Título V del Código Civil “De la paternidad y filiación”, siendo de nuevo cuño la totalidad del articulado de este Título, sus capítulos y rúbricas en conformidad con la Ley 11/1981, de 13 de mayo⁴.

El artículo 108 establece que la filiación puede tener lugar por naturaleza y por adopción. La filiación por naturaleza puede ser matrimonial y no matrimonial. Es matrimonial cuando el padre y la madre están casados entre sí. La filiación matrimonial y la no matrimonial, así como la adoptiva plena, surten los mismos efectos, conforme a las disposiciones de este Código.

El artículo 127 establece que en los juicios sobre filiación será admisible la investigación de la paternidad y de la maternidad mediante toda clase de pruebas, incluidas las biológicas.

El juez no admitirá la demanda si con ella no se presenta un principio de prueba de los hechos en que ésta se funde.

⁴ *Código Civil*, págs. 107-114.

La Ley no obliga al demandado a someterse a las pruebas biológicas fundándose en el artículo 18,1 de la Constitución, donde se garantiza el derecho a la intimidad personal.

La Jurisprudencia de modo constante ha establecido que, existiendo un principio de prueba, dada la inocuidad de las pruebas biológicas, la negativa a someterse a las mismas, unido a las restantes pruebas practicadas, puede servir para llevar al Juzgador a la convicción de la paternidad^{5 y 6}.

La impugnación de la filiación matrimonial está presente en el 80% de las demandas de determinación de paternidad. De éstas el 50% son a instancia del padre legal del hijo impugnado y el 30% son a instancia de la madre⁷.

⁵ *Sentencias del Tribunal Supremo de 7 de febrero de 1986, 21 de abril de 1988, 5 de abril de 1990, 1 de marzo de 1994, de 29 de abril de 1994, de 18 de mayo de 1994, de 27 de mayo de 1994. Sentencia del Tribunal Constitucional 7/1994, de 17 de enero.*

⁶ SANCHEZ-TEMBLEQUE PINEDA, A., “La investigación de la paternidad en las resoluciones del Tribunal Constitucional”, *Actualidad Aranzadi*, nº 143, págs. 1-3.

⁷ HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., “Investigación biológica de la paternidad”. En GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, pág. 1171.

2.2. METODOS DE INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

Existen varios tipos de métodos para la investigación biológica de la paternidad: los métodos orientativos y los métodos analíticos de los caracteres heredables (tabla 1).

MÉTODOS ORIENTATIVOS: Son de empleo ocasional y algunos de ellos, como es la esterilidad comprobada, el embarazo previo de la mujer, etc., tienen fuerza probatoria, pero su utilización en la práctica es excepcional. Tienen un carácter exclusivamente orientativo datos tales como el acto del coito en el ciclo ovular y la correlación entre la fecha del coito y el desarrollo fetal⁸.

En general, son métodos que requieren una valoración retrospectiva, carente con frecuencia de diagnóstico fiable, y, en todo caso, sólo utilizables como procedimientos excluyentes de la paternidad.

⁸ CARRACEDO, A., RODRIGUEZ, M. S., "Procedimientos de investigación de la paternidad. Marcadores genético-moleculares. Técnicas de estudio de los diferentes marcadores empleados". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, págs. 39-40.

MÉTODOS ANALÍTICOS DE LOS CARACTERES HEREDABLES: Son de valoración desigual. Los caracteres físicos, funcionales, citogenéticos y clínicos están sujetos a variaciones ambientales y no son sistematizables, su herencia es de difícil objetivación, y son, por ello, de escasa utilidad práctica.

Tabla. 1. Métodos de investigación de la paternidad

Orientativos	Análisis de los caracteres heredables
Elementos obstétricos	Físicos
Esterilidad varonil	Funcionales
	Citogenéticos
	Clínicos
	Genético-moleculares
	Polimorfismos del ADN

El estudio de los marcadores genético-moleculares y las técnicas de secuenciación de ADN son los únicos métodos fiables en la determinación de paternidad.

Los marcadores genético-moleculares constituyen un conjunto de caracteres genéticos monofactoriales, objeto de la antropología molecular, que poseen una herencia mendeliana simple.

El descubrimiento de los primeros grupos sanguíneos por Landsteiner en 1901 y la posterior comprobación de su transmisión hereditaria realizada por

Von Dungern y Hirschfeld en 1910, constituyen los primeros pasos en la investigación biológica de la paternidad.

En principio, cualquier característica hereditaria puede ser utilizada para la investigación biológica de la paternidad. Sin embargo, solamente deberán seleccionarse aquellos rasgos hereditarios que ofrezcan la suficiente garantía para ser aplicados con eficacia y seguridad en este tipo de estudios.

Las condiciones que debe reunir un carácter hereditario para ser utilizado con fines de investigación de la paternidad fueron señaladas en el XXX Congreso Internacional de Medicina Legal y Social de lengua francesa celebrado en Coimbra en 1965⁹.

El carácter hereditario ha de cumplir las siguientes condiciones:

- Debe ser objetivo, es decir, que no requiera la colaboración activa de las personas examinadas para su comprobación.
- Debe ser discontinuo, o sea, que permita distribuir a los individuos en diferentes grupos bien diferenciados.
- La influencia de factores exógenos (clima, alimentación, etc.) sobre el carácter determinado genéticamente debe ser nula, de forma que no se generen diferencias individuales con respecto a ese rasgo.

⁹ CONCHEIRO, L., "Introducción". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, págs. 3-8.

- La penetrancia y la expresividad debe ser total.
- Los caracteres objeto de estudio deben estar controlados por un par de genes y no ser rasgos poliméricos, es decir, dependientes de una serie de genes localizados en loci diferentes.
- Los genes de los caracteres que se estudien deben poseer una frecuencia adecuada y deben estar en equilibrio en la población.
- La expresión del gen no debe tener relación con la edad.
- El estudio del carácter hereditario no debe suponer riesgo para las personas implicadas y debe precisar una pequeña muestra de sangre.

En los estudios de paternidad, los conceptos de dominancia y recesividad no poseen una significación especial. Sin embargo, cuando los genes son codominantes resulta muy sencillo determinar el genotipo a partir del fenotipo con toda precisión.

Los marcadores genético-moleculares (antígenos eritrocitarios, proteínas séricas, enzimas y antígenos de histocompatibilidad) cumplen totalmente los requisitos señalados.

Se pueden establecer dos grupos de marcadores genético-moleculares¹⁰:

¹⁰ CARRACEDO, A., RODRIGUEZ, M. S., “Procedimientos de investigación de la paternidad. Marcadores genético-moleculares. Técnicas de estudio de los diferentes marcadores empleados”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, págs. 40-41.

- De naturaleza no sanguínea: Su aplicación es limitada. Además, su número es realmente escaso y únicamente merecen ser considerados la amilasa (AMY-1), esterasa, proteínas estructurales y carácter secretor en la saliva, el pepsinógeno (Pg) en la orina y las carboxi-metil-queratinas (SCMK) en pelo. Su utilidad queda casi restringida al campo de la criminalística.
- De naturaleza sanguínea: Actualmente son los empleados en la investigación biológica de la paternidad. Los principales marcadores genético-moleculares sanguíneos pueden observarse en la tabla 2.

Tabla 2. Marcadores genético-moleculares sanguíneos

Plasma/suero	Eritrocitos	Leucocitos
Proteínas séricas	Enzimas eritrocitarias	Enzimas leucocitarias
Enzimas séricas	Antígenos de membrana	Antígenos HLA

Las proteínas y las enzimas séricas constituyen un grupo de marcadores heterogéneo, en el que la mayor parte de los sistemas se analizan por técnicas electroforéticas (haptoglobinas, proteínas Gc, α_1 -antitripsina, transferrina, etc.), pero otros se analizan por técnicas de aglutinación.

Las enzimas eritrocitarias y leucocitarias son muy numerosas. Todas ellas se determinan por técnicas electroforéticas. Los marcadores enzimáticos son de gran utilidad, sobre todo por su seguridad en la exclusión. Las posibles silencias, que pudieran ser fuentes de error en las exclusiones indirectas o de

segundo orden, son fácilmente detectables en la mayoría de los sistemas, pues los heterocigotos portadores de un alelo silente poseen una menor actividad enzimática.

Los sistemas de antígenos de membrana son productos directos o indirectos de genes que tienen su expresión en la membrana del hematíe como glicolípidos o glicoproteínas y que por la acción de los anticuerpos específicos (generalmente inmunoglobulinas IgG) dan lugar a la aglutinación de hematíes. Este es el procedimiento para ponerlos de manifiesto.

El sistema HLA¹¹ está constituido por una serie de genes situados en el brazo corto del cromosoma 6, que codifican los antígenos HLA de clase I y de clase II. Existen tres productos de clase I con un polimorfismo detectable serológicamente y son los pertenecientes a los loci A, B y C. Estos antígenos están presentes en la mayoría de las células del organismo, pero para análisis serológicos los linfocitos son las células de elección. Los genes de clase II codifican los antígenos DR, DP y DQ que solo se expresan normalmente en algunas células (linfocitos B y macrófagos). El sistema HLA, por su amplio polimorfismo y su elevado rendimiento, constituye un método importante en la determinación de paternidad.

¹¹ ERCILLA, G., "El sistema HLA en la investigación de la paternidad". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, págs. 66-77, CASTELLANO ARROYO, M., "Evolución histórica de la investigación de la paternidad". En: MARTINEZ JARRETA, M. B. (ed.), *La prueba del ADN en Medicina Forense*, págs. 35-51.

En la investigación biológica de la paternidad se utiliza un método de análisis del ADN que se basa en el estudio de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (FRLP)¹².

Existen dos tipos de polimorfismo: polimorfismo de las dianas de restricción y polimorfismo de longitud.

Polimorfismo de las dianas de restricción: Debido a una mutación puntual (cambio de un nucleótido) que modifica una diana de restricción de una enzima determinada, ésta ya no reconoce la secuencia específica de la diana y no puede cortar el ADN por ese lugar. Se puede obtener un fragmento más largo o dos fragmentos más pequeños. En ambos casos existe un polimorfismo.

Polimorfismo de longitud: Se debe al polimorfismo cromosómico, fundamentalmente por delección o inserción de material genético. Este tipo de polimorfismo es más raro y se asocia a la presencia de regiones hipervariables (minisatélites). La región variable consiste en repeticiones en tandem de una secuencia. El polimorfismo resulta de las diferencias alélicas en el número de repeticiones.

Se ha demostrado que los FRLP tienen una herencia mendeliana y que se transmiten de una manera estable a la descendencia, por lo que son aptos para

¹² MARCH, M., ERCILLA, G., "Polimorfismo del ADN". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 161-163.

ser utilizados en la investigación de paternidad.

El uso del ADN en la investigación biológica de la paternidad pretende poner de manifiesto que aquellos minisatélites que sean específicos en localización y longitud para cada persona, y no procedan de la madre, deben provenir del padre putativo.

La probabilidad de error en la confirmación de una paternidad es de una entre un millón utilizando una sonda multilocus con 20 bandas.

Cuando se emplea una sonda monolocus, la confirmación de la paternidad se hace con una probabilidad del 98%. Este porcentaje aumenta hasta el 99,999% al utilizar tres sondas monolocus¹³.

¹³ VILLANUEVA CAÑADAS, E., LORENTE ACOSTA, J. A., “Aplicaciones del ácido desoxirribonucleico (DNA) en Medicina Legal”. En: GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, págs. 1048-1052.

2.3. PERITACION MEDICOLEGAL DE LA PATERNIDAD

Toda investigación de paternidad persigue dos objetivos:

En primer lugar establecer la no paternidad de un hombre falsamente acusado.

En segundo lugar, de no haber sido excluido, buscar argumentos bioestadísticos en favor de su paternidad biológica, es decir, probar su paternidad.

De cualquier forma, una exclusión de paternidad lograda utilizando un único sistema nunca debe ser considerada sin realizar previamente un cálculo de la probabilidad de paternidad y de la proporción de excluidos por el resto de los sistemas.

2.3.1. EXCLUSION DE LA PATERNIDAD

Se denomina “probabilidad de exclusión a priori” (P_e) de un marcador genético en una población determinada, al porcentaje de presuntos padres falsamente imputados cuya paternidad quedaría excluida de acuerdo a ese marcador.

La “probabilidad de exclusión a priori” depende del número de alelos

identificados y de la distribución de sus frecuencias.

Se puede deducir una fórmula general para su cálculo, independientemente del número de alelos, pero los cálculos se simplifican cuando se trata de sistemas codominantes con dos alelos¹⁴.

1) Sistema con dos alelos codominantes

En este caso la probabilidad de exclusión viene dada por la fórmula siguiente:

$$P_e = pq(1-pq)$$

donde: p= probabilidad de que un individuo sea transmisor del gen 1

q= probabilidad de que un individuo sea transmisor del gen 2

Esta fórmula se deduce del análisis estadístico de los sucesos de incompatibilidad genética que pueden presentarse a peritación. Estos sucesos y sus probabilidades de ocurrencia se indican en la tabla 3.

Las probabilidades que figuran en la última columna de la tabla citada se han obtenido de la siguiente forma:

$$P(S_i) = P(A_i \quad B_i \quad C_i)$$

¹⁴ RODRIGUEZ CALVO, M. S., MUÑOZ BARUS, J. Y, "Parámetros estadísticos de eficacia *a priori*". En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*", págs. 55-62.

donde A, B y C representan, respectivamente, el fenotipo de la madre, del hijo y del presunto padre, correspondientes a cada suceso ($i= 1, 2, 3, 4, 5, 6$).

Tabla 3. Combinaciones que excluyen la paternidad para un sistema codominante con dos alelos

Suceso	Madre	Hijo	Presunto Padre	$P(S_i)$
S1	1-1	2-1	1-1	p^4q
S2	2-2	2-1	2-2	pq^4
S3	2-2	2-2	1-1	p^2q^3
S4	2-1	2-2	1-1	p^3q^2
S5	1-1	1-1	2-2	p^3q^2
S6	2-1	1-1	2-2	p^2q^3

$P_e = \sum P(S_i)$

Como el fenotipo del presunto padre es independiente de los fenotipos de la madre y el hijo, esta probabilidad puede expresarse como:

$$P(S_i) = P(A_i \cap B_i) \times P(C_i) = P(A_i) \times P(B_i / A_i) \times P(C_i)$$

La probabilidad de que el fenotipo del presunto padre sea 1-1 es p^2 , ya que es la probabilidad de que tanto su padre como su madre le transmitan el gen 1, y la probabilidad de que el fenotipo del presunto padre sea 2-2 es, por un razonamiento análogo, q^2 .

En cuanto al fenotipo de la madre, las probabilidades serán: p^2 cuando el fenotipo es 1-1, q^2 cuando el fenotipo es 2-2 y $2pq$ cuando el fenotipo es 2-1. Esta última probabilidad resulta de sumar la probabilidad de que su padre la transmita el gen 1 y su madre el gen 2 (pq) y la probabilidad de que su padre le transmita el gen 2 y su madre el gen 1 (qp).

La probabilidad del fenotipo del hijo condicionada al fenotipo de la madre vendrá determinada de modo diferente para cada uno de los seis casos:

En el primer suceso $P(B_1/A_1) = q$, ya que si la madre le transmite el gen 1, el fenotipo del hijo sólo puede ser 2-1 si el padre le transmite el gen 2, y la probabilidad de que ésto ocurra es por definición q .

En el segundo suceso $P(B_2/A_2) = p$, ya que si la madre le transmite el gen 2, el fenotipo del hijo sólo puede ser 2-1 si el recibe del padre el gen 1, y la probabilidad de que ésto ocurra es p .

En el tercer suceso $P(B_3/A_3) = q$, dado que la madre le ha transmitido el gen 2, el fenotipo del hijo solo será 2-2 si el padre le transmite también el mismo gen, y la probabilidad de ésto es q .

En el cuarto suceso $P(B_4/A_4) = 1/2 q$, ya que una madre de fenotipo 2-1 transmitirá a su hijo el gen con una probabilidad de $1/2$ (ya que se trata de alelos codominantes), y la probabilidad de que el hijo tenga el fenotipo 2-2 será igual a la probabilidad de que la madre le transmita el gen 2 ($1/2$) por la probabilidad de que el padre le transmita el gen 2 (q).

En el quinto suceso $P(B_5/A_5) = p$, ya que si la madre le transmite el gen 1, la probabilidad de que el fenotipo del hijo sea 1-1 es igual a la probabilidad de que el padre le transmita también el mismo gen (p).

En el sexto suceso $P(B_6/A_6) = 1/2 p$, ya que la probabilidad de que la madre de fenotipo 2-1 transmita a su hijo el gen 1 es igual a $1/2$, y la

probabilidad de que el padre le transmita el mismo gen es p .

La probabilidad de exclusión es la probabilidad de que se presente a peritación alguno de los seis sucesos mencionados y, por lo tanto, será la suma de las probabilidades de cada suceso, ya que al tratarse de sucesos disjuntos la probabilidad de su unión es igual a la suma de sus probabilidades.

Operando de forma matemática, esta suma puede expresarse de la forma siguiente:

$$P_e = pq(1-pq)$$

y teniendo en cuenta que $q = 1-p$, P_e puede expresarse como:

$$P_e = p - 2p^2 + 2p^3 - p^4$$

Esta expresión se puede representar gráficamente (fig.1).

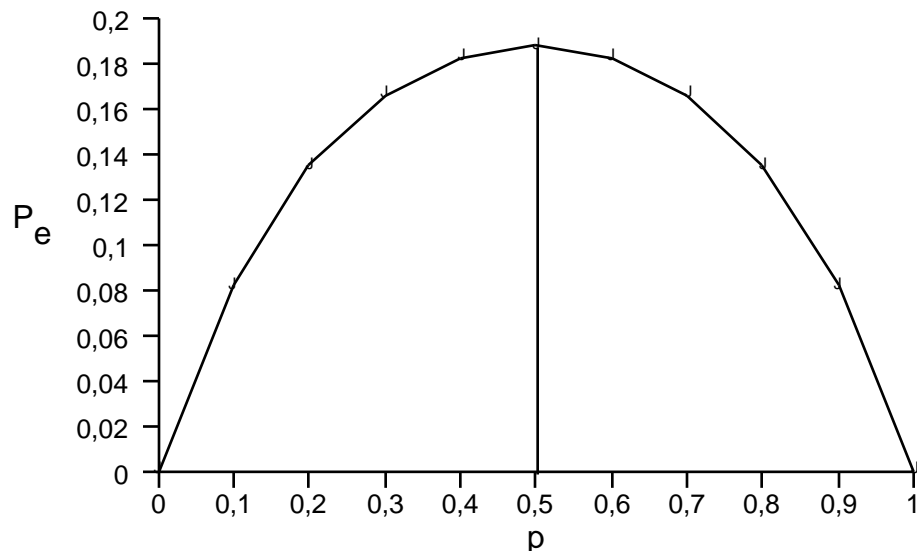


Fig. 1. Probabilidad de exclusión de la paternidad en función de la probabilidad génica

Se puede observar que la gráfica es simétrica en torno al valor de $p = 0,5$, al que le corresponde el máximo valor de $P_e = 0,1875$. Esto significa que con el análisis de un sistema determinado por dos alelos codominantes la máxima probabilidad de exclusión que puede obtenerse es 18,75%.

La probabilidad de transmitir el gen 1 (p) y la probabilidad de transmitir el gen 2 (q) equivalen a sus frecuencias génicas y su cálculo se realiza de la forma que anteriormente ha sido expuesta.

2) Sistema con “n” alelos codominantes.

Podemos distinguir cuatro situaciones de exclusión:

1. Hijo homocigótico y presunto padre carente de ese gen.

Hijo $i-i$, ($i = 1, \dots, n$)

Presunto padre i

$$\text{Prob}_1 = \sum_{i=1}^n P_i^2 A_i \qquad A_i = (1 - P_i^2 - 2 \sum_{s=1}^n P_i P_s)$$

2. Hijo heterocigoto con un gen que no recibe de la madre, homocigota, y presunto padre carente de ese gen.

Madre $i-i$

Hijo $i-q$

Presunto padre q

$$\text{Prob}_2 = \prod_{i=1}^n \prod_{q=1}^n P_i^2 P_q A_q \quad A_q = (1 - P_q^2 - 2 \prod_{s=1}^n P_s P_q)$$

3. Hijo heterocigoto con un gen que no recibe de la madre y presunto padre carente de ese gen.

Madre i-j

Hijo i-q ó j-q

Presunto padre distinto q

$$\text{Prob}_3 = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^n \prod_{q=1}^n 2P_i P_j P_q A_q \times \frac{1}{2} = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^n \prod_{q=1}^n P_i P_j P_q \quad (i \neq j \neq q)$$

4. Madre e hijo son heterocigotos iguales y el presunto padre carece de ambos genes.

Madre i-j

Hijo i-j

Presunto padre i, j

$$\text{Prob}_4 = \prod_{i=1}^n \prod_{j=1}^n \left[2P_i P_j \frac{1}{2} P_i + 2P_i P_j \frac{1}{2} P_j \right] A_{ij} \quad (i \neq j)$$

$$A_{ij} = (1 - P_i^2 - P_j^2 - 2 \prod_{s=1}^n P_i P_s - 2 \prod_{s=1}^n P_j P_s)$$

La probabilidad de exclusión total, al tratarse de sucesos disjuntos será:

$$P_e = \text{Prob}_1 + \text{Prob}_2 + \text{Prob}_3 + \text{Prob}_4$$

Mediante la utilización de programas informáticos este cálculo se ha visto facilitado y siendo n el número de alelos y p_i las frecuencias génicas respectivas, la fórmula para la probabilidad de exclusión es:

$$P_e = \sum_{i=1}^n p_i (1 - p_i)^2 (1 - p_i + p_i^2) + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i p_j (p_i + p_j) (1 - p_i - p_j)^2$$

La probabilidad de exclusión “a priori” es función directa del polimorfismo de un sistema. Así, cuanto más polimórfico sea un sistema y cuanto más equilibradas estén las frecuencias de sus alelos, tanto mayor será su probabilidad de exclusión “a priori” y, por tanto, su eficacia en la investigación de la paternidad.

3) Probabilidad de exclusión acumulada

Es un valor que se suele utilizar para determinar la eficacia que “a priori” posee un laboratorio para la exclusión de la paternidad. Es la probabilidad favorable de que con el uso de unos sistemas determinados puedan excluirse los falsos padres. Se suele expresar en porcentaje y cuantifica los posibles errores que podría cometer el laboratorio por no excluir personas que no son el padre.

Esta probabilidad de exclusión “a priori” para un conjunto de sistemas viene dada por la expresión:

$$P_e \text{ acumulada} = 1 - (1 - P_1) (1 - P_2) \dots (1 - P_n)$$

siendo P_1, P_2, \dots, P_n las probabilidades de exclusión individuales de cada uno de los sistemas.

En nuestro país, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Hemogenética Forense, se considera que un laboratorio está capacitado para realizar pruebas de paternidad cuando alcanza al menos 99,9% de probabilidad de exclusión “a priori”.

4) Exclusión de la paternidad

La exclusión de la paternidad sigue las reglas de la herencia mendeliana.

Las reglas fundamentales de exclusión son:

Primera regla: Puesto que se trata de caracteres mendelianos simples, es evidente que un niño no puede poseer un carácter que no posea su padre o su madre.

Segunda regla: Un individuo homocigoto para un gen dado no puede engendrar ni puede haber sido engendrado por un individuo homocigoto para otro gen diferente del mismo locus. Esta regla tiene rarísimas excepciones.

Tercera regla: Exige el estudio del árbol genealógico de los implicados, a fin de establecer las formas en que aparecen las ligazones genéticas, por tanto, la transmisión de las mismas.

Cuando en el laboratorio se estudian los distintos marcadores que van a formar parte de la prueba de paternidad, puede ocurrir que se encuentre una exclusión en uno o varios marcadores o que ésta no se presente.

En el primer supuesto debe indicarse que no todas las exclusiones poseen el mismo valor. Clásicamente se han considerado dos tipos de exclusiones¹⁵:

Las de primer orden, directas, basadas en la primera regla de Landsteiner. En esta exclusión no existe posibilidad de error debido a la existencia de alelos silentes o que se comporten como tales. Entre los ejemplos más sencillos podemos citar el hijo que posee algún alelo nuevo no presente en ninguno de los padres o cuando el padre es heterocigoto y el hijo no posee ninguno de sus alelos.

Las de segundo orden, indirectas, basadas en la segunda regla de Landsteiner, es aquella en la que existe riesgo de error por alelos silentes. El caso más sencillo es aquel en que el padre y el hijo son homocigotos para alelos distintos.

¹⁵ CARRACEDO, A., HUGUET, E., BARROS, F., "Parámetros estadísticos en la investigación biológica de la paternidad. Exclusión y prueba positiva de paternidad". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 178.

Los alelos silentes existen en mayor o menor grado para todos los polimorfismos genéticos dependiendo del sistema y de la población que se considere.

En algunos casos no son alelos silentes propiamente dichos los que inducen a error en la exclusión de segundo orden, sino alelos raros no detectados como el caso del alelo M_g en el sistema MNSs.

Actualmente en España, las exclusiones aisladas de segundo orden (por un solo marcador) no se consideran como una situación de exclusión en un caso de investigación biológica de la paternidad y cuando se trata de exclusiones aisladas de primer orden o de solo dos exclusiones de segundo orden, es obligado calcular la probabilidad de paternidad sin tener en cuenta los marcadores que han dado lugar a la exclusión para, con todo ello, adoptar una decisión global. Cuando el número de exclusiones sea mayor que las indicadas, la exclusión se debe considerar probada¹⁶.

La probabilidad de exclusión de paternidad “a priori” de los distintos tipos de marcadores genético-moleculares en poblaciones españolas, clasificados de la forma más racional posible, se expone en las tablas 4 a 7¹⁷:

¹⁶ *Op. cit.*, págs. 178-179.

¹⁷ HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., “Investigación de la paternidad”. En: GIBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, págs. 1037-1038.

Tabla 4. Sistema HLA

Locus	Alelos descritos	Probabilidad de exclusión
A	23	76,09
B	47	88,54
C	8	47,88
Total		98,62

Tabla 5. Marcadores plasmáticos proteicos y enzimáticos

Sistema	Locus	Probabilidad de exclusión
Inmunoglobulinas	Gm	34,6
Alfa-1-antitripsina	Pi	32,0
Proteínas Gc	Gc	29,0
Factor XIII	FXIII B	23,0
Orosomucoide	ORM	18,7
Haptoglobinas	Hp	18,5
Alfa-2-HS-glicoproteína	A ₂ HS	18,0
Transferrina	Tf	17,9
Complemento	C6	17,0
Complemento	C4	16,8
Inmunoglobulinas	Km	14,9
Complemento	C3	14,8
Plasminógeno	PLG	13,5
Properdina factor B	Bf	13,3
Colinesterasa	C5	4,4
Amilasa sérica	AMY ₂	2,8
Colinesterasa	E ₁	2,6
Total		96,2

Tabla 6. Marcadores enzimáticos eritrocitarios y leucocitarios

Sistema	Locus	Probabilidad de exclusión
<i>Enzimas eritrocitarias</i>		
Fosfoglucomutasa	PGM ₁	32,0
Fosfatasa ácida	AcP	24,0
Transaminasa glutámico-pirúvica	GPT	18,8
Glioxalasa	GLO	18,8
Esterasa D	EsD	10,9
Delta-aminolevulinato-dehidrasa	ALADH	7,0
Fosfoglicolato-fosfatasa	PGP	6,9
Galactosa-1-fosfato-uridil-transferasa	GALT	6,8
Adenosín-desaminasa	ADA	4,5
Uridín-monofosfoquinasa	UMPk	4,2
Adenilatoquinasa	AK	3,6
6-Fosfogluconato-deshidrogenasa	PGD	2,1
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	Gd	1,0
<i>Enzimas leucocitarias</i>		
Enzima málica	ME ₂	18,2
Fosfoglucomutasa	PGM ₃	17,1
Total		89,6

Tabla 7. Antígenos eritrocitarios

Sistema	Probabilidad de exclusión
MNSs	32,0
Rh	27,8
ABO	20,0
Kidd	18,5
Duffy	18,4
Kell	6,2
Lutheran	3,8
P	2,9
Total	77,1

La combinación de todos los sistemas expuestos en las tablas anteriores proporciona una probabilidad global de exclusión “a priori” de 99,99964%. Quiere esto decir, que de cada diez millones de individuos que son falsamente acusados de paternidad sólo 36 no serían excluidos.

Si la probabilidad de exclusión para los sistemas aplicados es elevada y no se ha podido excluir al individuo estamos ante el segundo objetivo indicado, es decir probar su paternidad.

2.3.2. PROBABILIDAD DE LA PATERNIDAD

Para la prueba positiva de paternidad se utiliza el cálculo del índice de paternidad, el índice de paternidad acumulado y la probabilidad de paternidad, que se basan en el Teorema de Bayes. La forma de realizar estos

cálculos se detalla ampliamente en el capítulo de material y métodos.

Para la aplicación del Teorema de Bayes es indispensable conocer:

1. Los tipos de trio madre-hijo-presunto padre.
2. Las leyes genéticas de los sistemas aplicados.
3. Las frecuencias de los distintos alelos de los sistemas aplicados en la población de procedencia del trío objeto de estudio.

Por tanto, para poder realizar la prueba de paternidad es necesario disponer de un estudio poblacional previo de las frecuencias de los marcadores estudiados, y éste ha sido precisamente el objetivo del presente trabajo.

En la práctica pericial se utilizan los Predicados Verbales de Hummel (tabla 8), que no son más que la expresión gramatical resultante de los cálculos matemáticos de la probabilidad de paternidad (W) y el índice paternidad (IP) alcanzados en la prueba¹⁸.

¹⁸ CARRACEDO, A. HUGUET, E., BARROS, F., “Parámetros estadísticos en la investigación biológica de la paternidad. Exclusión y prueba positiva de paternidad”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 184.

Tabla 8. Predicados Verbales de Hummel

W(%)	Probabilidad
99,73	Prácticamente probada
99,00...< 99,73	Extremadamente probable
95,00...< 99,00	Muy probable
90,00...< 95,00	Probable
> 50,00...< 90,00	Paternidad más probable que no paternidad
50,00...	No paternidad más probable que paternidad

Eficiencia bioestadística

Es un parámetro que indica la eficacia media real de un marcador en la prueba positiva de paternidad. De forma semejante a lo que sucede con la probabilidad de exclusión “a priori”, la eficiencia bioestadística de todos los sistemas empleados valora, en este caso, la potencia en la afirmación que posee un laboratorio determinado.

Para calcular el valor de eficiencia bioestadística, tanto para un sistema como la acumulada de varios sistemas, es preciso recurrir a programas informáticos.

Tanto la probabilidad de exclusión “a priori” como la eficacia bioestadística de un sistema individual o de un conjunto de marcadores, son valores que dependen del polimorfismo del sistema, y son útiles para evaluar su validez “a priori” en la investigación biológica de la paternidad, pero en un caso concreto no presuponen el resultado.

3. DELIMITACION DE LA COMARCA DE LAS ARRIBES

3.1. LA PROVINCIA DE SALAMANCA

3.1.1. ORIGEN Y GEOGRAFIA DE SALAMANCA

El nombre de Salamanca tiene un origen indoeuropeo precéltico¹⁹. Se encuentra citada, por primera vez, con el nombre de Elmántica, en Polibio, libro III²⁰, debiendo su origen al dios Helman, deidad que debía tutelar a sus primeros habitantes²¹.

La Provincia de Salamanca está ubicada en la Submeseta Norte, al Suroeste de la misma (fig. 2), forma un caprichoso rectángulo, parece un continente en miniatura²². Es una de las nueve que integran la Comunidad Autónoma de Castilla y León, ocupa el espacio suroccidental de dicha Comunidad, por lo que posee una amplia zona fronteriza con Portugal, siendo también extensos los límites con Cáceres, Zamora y Avila y, en menor extensión, con Valladolid.

¹⁹ BARRIOS GARCIA, A., “Historia I”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 60.

²⁰ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 18.

²¹ *Op. cit.*, pág. 17.

²² SENA, E., “Prólogo”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 8.

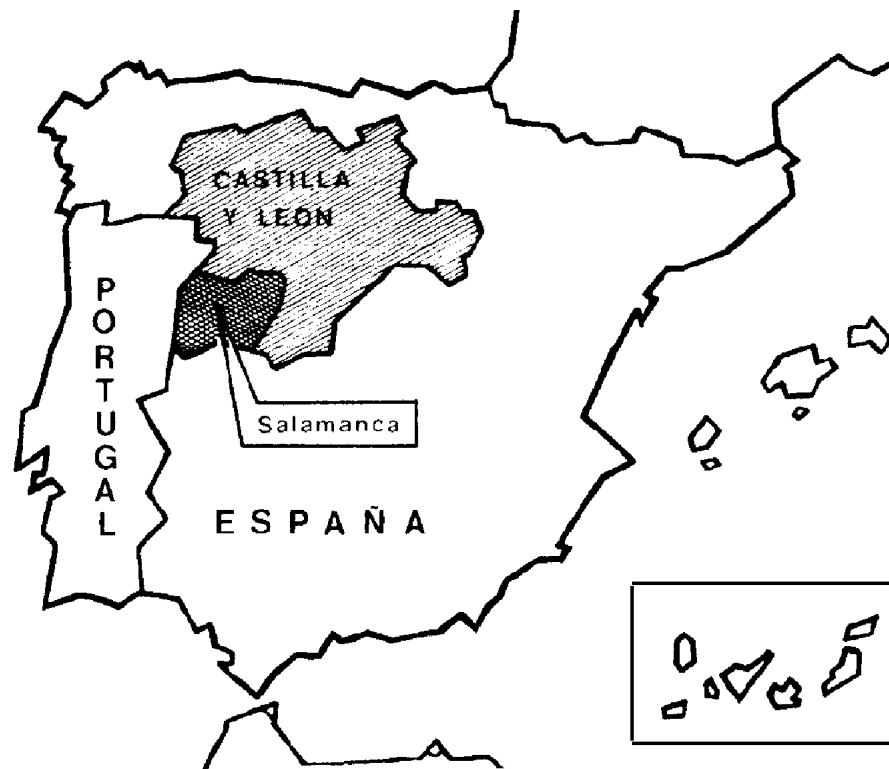


Fig. 2. Localización de la Provincia de Salamanca

Tiene una superficie de 12.336 km², equivalente al 2,44 por 100 del total nacional y al 13,2 por 100 de Castilla y León²³.

Presenta una amplia variedad geográfica. Hay tierras por encima de los 2000 metros, con neveros, y están las únicas tierras que, en la región, se hallan a menos de 200 metros de altitud²⁴.

²³ GARCIA ZARZA, E., "Geografía". En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 33.

²⁴ *Op. cit.*, pág. 9.

Los geógrafos y los geólogos han establecido cuatro zonas diferentes en la Provincia de Salamanca (fig. 3): la llanura terciaria de La Armuña y Peñaranda de Bracamonte, la penillanura paleozoica o Campo Charro, la zona de La Ribera del Duero caracterizada morfológicamente por las <<arribes>> y La Sierra, que engloba toda la orla meridional de la Provincia²⁵.

Las llanuras nororientales constituyen un conjunto de planicies fértiles, eminentemente agrícolas, con las comarcas de La Armuña, Las Villas, Tierra de Cantalapiedra o Las Guareñas y las Tierras de Peñaranda de Bracamonte.

La penillanura constituye una sucesión de campos ondulados, con una altitud media de 700-800 metros, dedicados preferentemente a la ganadería, hay montes de encinas, robles y quejigos. Es la zona de las dehesas características de las tierras centrales que forman el Campo Charro. Alrededor del 77 por 100 de la Provincia de Salamanca pertenece a esta unidad morfológica²⁶. Abarca las comarcas de Tierra de Alba, Salvatierra, Campo de Salamanca, Tierra de Ledesma, Tierra de Vitigudino, El Abadengo, Los Campos de Argañán y Azaba, El Campo de Camaces y El

²⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, págs. 13-14.

²⁶ GARCIA ZARZA, E., "La penillanura salmantina". En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 61.

Campo de Yeltes²⁷.

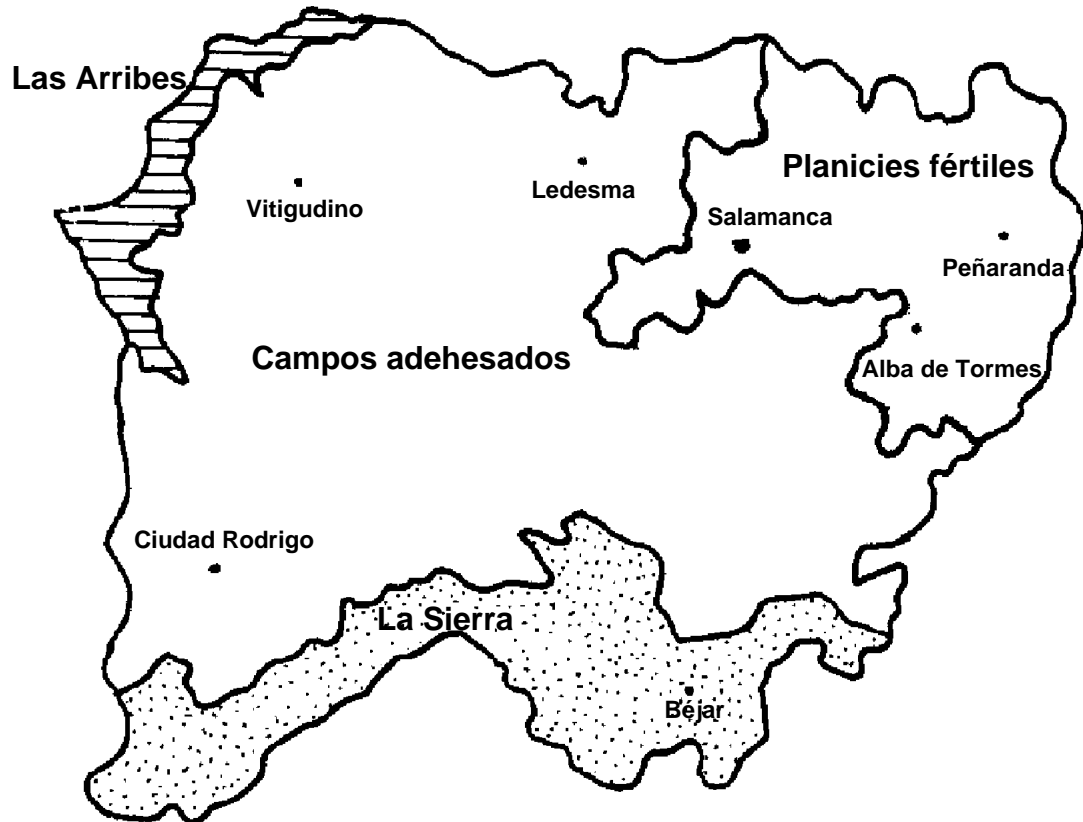


Fig. 3. Localización de Las Arribes en la Provincia de Salamanca

La zona de La Ribera que se localiza en el borde occidental de la penillanura salmantina, constituye una unidad. Se caracteriza por ser una zona erosionada, cortada por la red fluvial que se encaja, pero a 300-400 metros

²⁷ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 127.

por debajo de la penillanura, formando la comarca de Las Arribes²⁸.

La Sierra está situada en la zona meridional de la Provincia. Abarca las comarcas de Sierra de Béjar, Sierra de Francia, Sierra de Gata o Campo de Agadones y El Rebollar²⁹.

En líneas generales, si se prescinde de la Sierra y de Las Arribes, la Provincia puede dividirse en dos grandes unidades geográficas, separadas más o menos por el curso del Tormes. Al norte y al este planicies eminentemente agrícolas, al sur y al oeste campos ondulados dedicados a la ganadería. Dicha dualidad ha condicionado desde siempre la historia, la vida, la explotación de la tierra, la economía e incluso el asentamiento en el territorio provincial de distintos pueblos y tribus³⁰.

²⁸ GARCIA ZARZA, E., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 61.

²⁹ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 127.

³⁰ *Op. cit.*, pág. 14.

3.1.2. HISTORIA DE LA PROVINCIA DE SALAMANCA

Los primeros pobladores de Salamanca llegaron del Norte, quizás en el año 700 a.c., durante la primera oleada migratoria de pueblos indoeuropeos precélticos³¹ o cuando la postrera inmigración céltica³².

La primera tribu que se asentó en la Provincia de Salamanca fue la vettona, de naturaleza celta o precéltica indoeuropea. Posteriormente llegó la tribu vaccea de naturaleza celtibérica³³. Los vettones era un pueblo ganadero, siendo el toro granítico una expresión típica de la cultura vettona, mientras que los vacceos eran agricultores.

En el momento de la llegada a la Meseta de los cartagineses, año 221 a.c.³⁴ y de los romanos, año 218 a.c.³⁵, los vacceos se hallaban en un momento de franca expansión territorial a costa de sus vecinos, entre ellos los vettones³⁶. A la llegada a Salamanca de Anibal, primero, y de los romanos después, al norte y al este del Tormes se hallaban establecidos los vacceos y al otro lado del río, incluyendo quizás la orilla derecha del curso alto del

³¹ BARRIOS GARCIA, A., "Historia I". En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 60.

³² VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 9.

³³ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 17.

³⁴ SALVAT, J. (ed.), *Historia de España*, tomo 1, pág. 140.

³⁵ *Op. cit.*, tomo 1, pág. 140.

³⁶ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 17.

Tormes y las tierras vecinas del Barco y de Piedrahita, vivían los vettones³⁷.

La capital, Salamanca, se hallaba en la zona de contacto de ambos pueblos, vacceos y vettones, y constituía un importante mercado, evolucionando, a través de los tiempos, hasta el actual mercado de productos agropecuarios³⁸.

En la época romana, la actual Provincia de Salamanca pertenecía a la circunscripción administrativa de la Vettonia que se englobaba en la Lusitania³⁹. Estaba repartida en tres circunscripciones que se van a perpetuar con el tiempo: la Tierra de Salamanca (Salamanca), la Tierra de Ledesma (Bletisama) y la Tierra de Ciudad Rodrigo (Miróbriga o Augustóbriga)⁴⁰.

Las diócesis salmantinas se crearon en la época del Bajo Imperio, aunque los primeros datos fehacientes proceden de la época visigótica. La diócesis de Ciudad Rodrigo tenía unos límites muy semejantes a los actuales, mientras que la diócesis de Salamanca quizás, dentro de su semejanza con los actuales, alcanzarán hasta más allá de Medina del Campo⁴¹.

La conquista de Salamanca por los árabes data del año 712⁴².

³⁷ *Op. cit.*, pág. 17.

³⁸ GARCIA ZARZA, E., "Pueblos y Paisajes". En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 26.

³⁹ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 24.

⁴⁰ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 18.

⁴¹ *Op. cit.*, pág. 18.

⁴² VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 44.

En los reinados de los reyes leoneses, Alfonso I y Ordoño I, la ciudad de Salamanca fue destruida. Sus tierras se convirtieron en un desierto estratégico, en una tierra de nadie, y eran un foso insalvable que protegía tanto a musulmanes como a cristianos⁴³.

Su reconstrucción se debe al rey Alfonso VI, al confirmar, el día 26 de Diciembre del año 1107, los privilegios a la iglesia salmantina por su hija doña Urraca y su yerno don Raimundo de Borgoña⁴⁴.

En el año 1230, como resultado de la actividad repobladora, jurídica y administrativa de los siglos XI y XII y el primer tercio del siglo XIII, en la que sería después Provincia de Salamanca aparecen las siguientes circunscripciones administrativas: concejos con sus alfores respectivos, de Alba, Salamanca, Salvatierra, Ledesma, Ciudad Rodrigo, Monleón y Miranda (en el Reino de León), y la villa de Béjar, con su territorio y cabildo, y con su Fuero, perteneciente al alfoz de Avila, por lo tanto, al Reino de Castilla⁴⁵.

La compartimentación administrativa de los alfores y concejos medievales estaban relacionadas con las características de la repoblación y del reparto de las tierras de cada alfoz o de cada concejo, pero debieron cristalizar lentamente a lo largo de los primeros siglos posteriores a la

⁴³ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 48.

⁴⁴ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 47.

⁴⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 30.

reconquista y la colonización⁴⁶.

En el año 1218, con la creación del Estudio General, será cuando se inicie la actividad de mayor trascendencia e influencia, en la vida de Salamanca, la universitaria⁴⁷.

En el año 1770, con la estructuración administrativa de los Borbones, la Provincia de Salamanca se dividía en los corregimientos de Salamanca y Ciudad Rodrigo. El corregimiento de Salamanca comprendía los siguientes partidos: Ledesma, Béjar, Miranda del Castañar, Montemayor, Salvatierra de Tormes, Alba de Tormes y Salamanca. El corregimiento de Ciudad Rodrigo constaba de los cinco Campos tradicionales y del Sexmo de la ciudad y su Socampana (fig. 4)⁴⁸.

El territorio de la actual provincia de Salamanca, como el de todas las provincias, surgió de la división provincial realizada en el año 1833⁴⁹.

⁴⁶ *Op. cit.*, pág. 31.

⁴⁷ GARCIA GARCIA, A., “Los difíciles inicios”. En: FERNANDEZ, ALVAREZ, M. (ed.), *La Universidad de Salamanca*, tomo I, pág.16, GARCIA ZARZA, “Pueblos y Paisajes”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, págs. 26-30.

⁴⁸ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, págs. 42-43.

⁴⁹ GARCIA ZARZA, E., “Geografía”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 33.

LA PROVINCIA DE SALAMANCA Y SUS PARTIDOS EN LA 2ª MITAD DEL SIGLO XVIII. Según el mapa de D. Tomás López, y la reelaboración de M. Dolores Mateos.

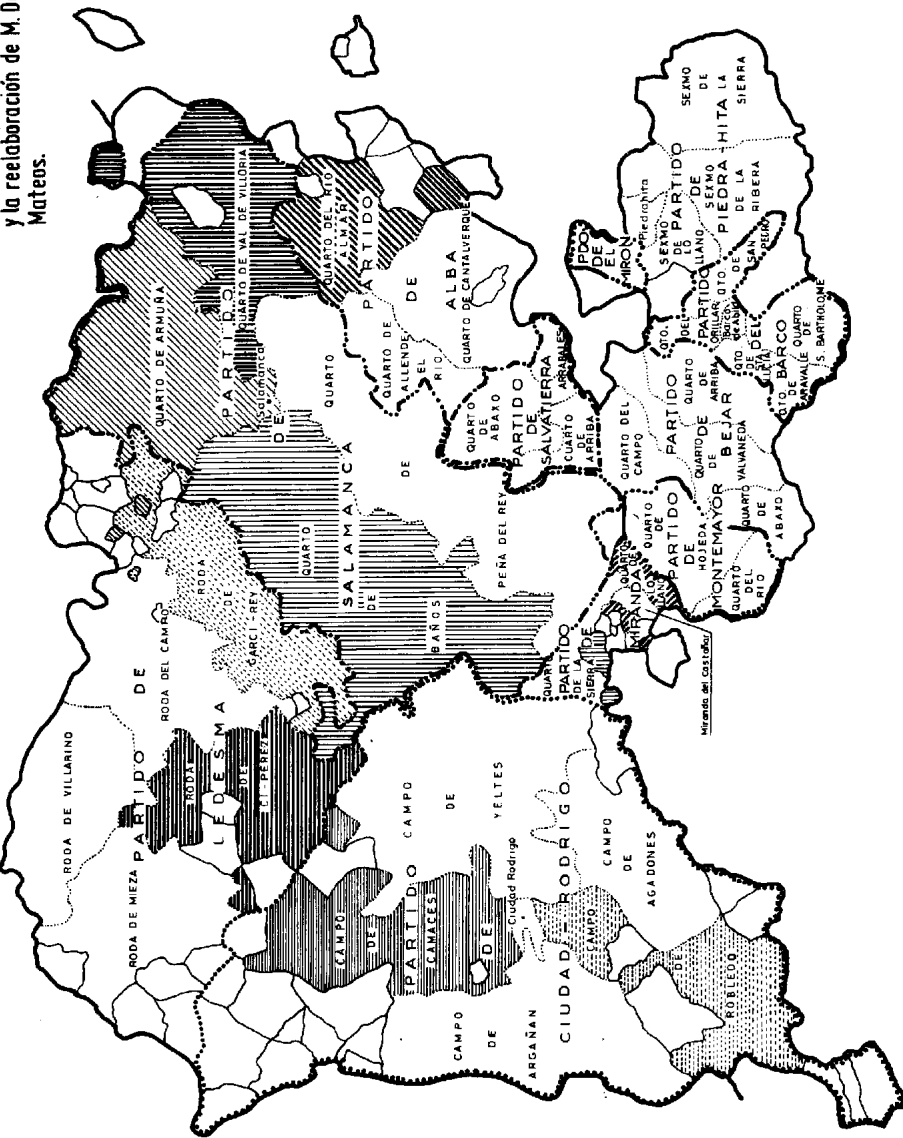


Fig. 4. La provincia de Salamanca y sus Partidos en la 2ª mitad del siglo XVIII

3.1.3. LA REPOBLACION DE LA PROVINCIA DE SALAMANCA

En la Alta Edad Media, un conjunto heterogéneo de causas (luchas civiles, despoblaciones, hambre, etc.) provocaron la destrucción y el abandono de muchos núcleos habitados del valle del Duero. Salamanca quedó reducido a un estado lastimoso después de este periodo medieval, que hizo necesaria su repoblación⁵⁰.

Durante la Reconquista y con anterioridad al año 939, los territorios de Salamanca eran, como ya hemos expuesto, una “tierra de nadie”, es decir, un desierto estratégico, un foso insalvable que protegía tanto a los musulmanes como a los cristianos. No había pobladores estables. Sólo había habitantes sueltos, errabundos, aislados, quizás enemigos entre si, vidas individuales en algunos casos, quizás familiares, pero con el rasgo común de ser inestables. Es decir, era un refugio para aquellos que por cualquier circunstancia encontraban dificultades para vivir en alguna de las dos sociedades circundantes, al sur los árabes y al norte los cristianos. La existencia de esta “tierra de nadie” está confirmada por Sánchez Albornoz, Hernández Pacheco y Menéndez Pidal. Este último sitúa en un mapa a la actual provincia de Salamanca como tierras despobladas (fig. 5)⁵¹.

⁵⁰ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 11.

⁵¹ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 48.

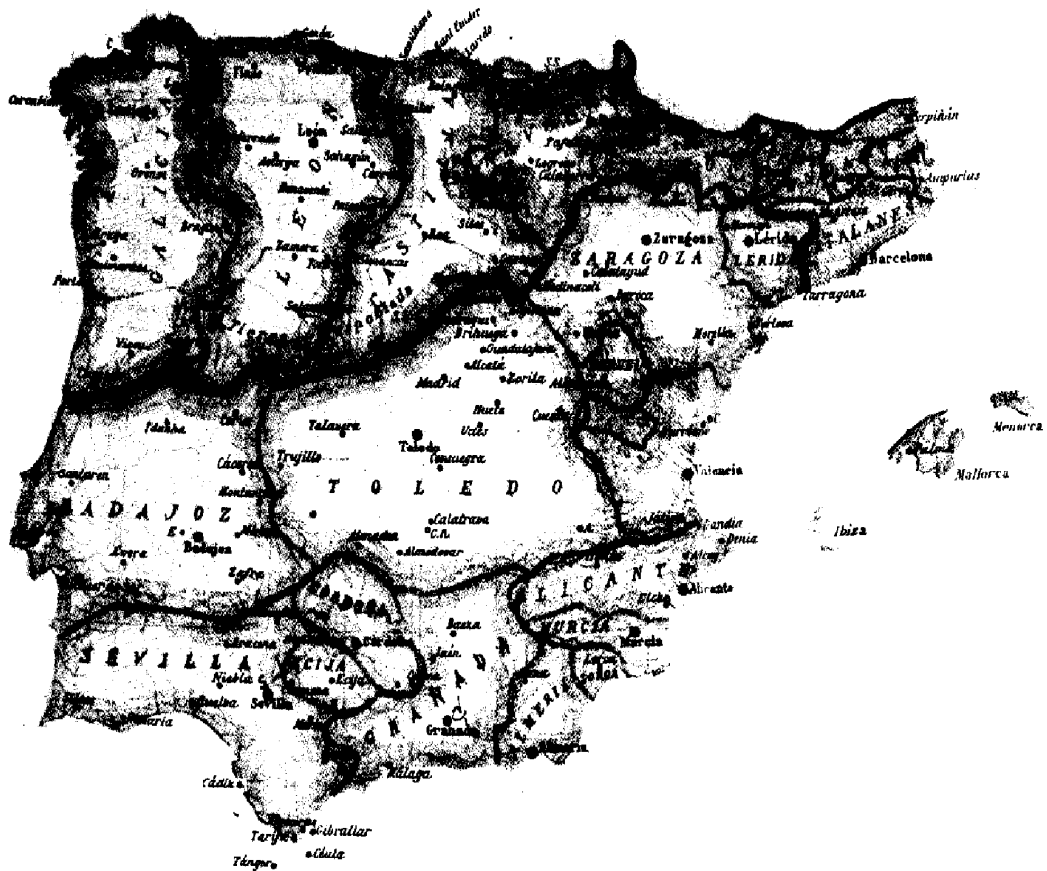


Fig. 5. Mapa político de Hispania en el siglo XI. Según él de España en 1065 por R. Menéndez Pidal

Durante los reinados de Alfonso I, Ordoño I y Alfonso III hubo incursiones en las tierras salmantinas pero nunca fueron repobladas⁵². Su interés era trasladar la población cristiana hacia el norte. Alfonso I (739-757) realizó los primeros trasvases de población, encontrándose Salamanca entre las ciudades que fueron objeto de esta política real. Más tarde, Ordoño I (850-866), continuó la misma línea de acción retornando al territorio

salmantino, donde los árabes habían vuelto a ocupar la ciudad. El rey, en una de sus expediciones, se apoderó de Coria y de Salamanca, en donde mató a parte de sus habitantes y deportó e hizo cautivos a otros⁵³.

Ramiro II (931-950) fue el primer rey cristiano de la Reconquista que inició una repoblación estratégicamente pensada y distribuida en la cuenca del río Tormes. Su labor fue tan meritoria que Menéndez Pidal no duda en llamarlo “el repoblador del Tormes”⁵⁴.

Dos meses después de la victoria de Simancas (año 939), Ramiro II dirigió su atención hacía varios lugares desiertos: Salamanca, Ledesma, Ribas, Los Baños, Alhándiga y Peñausende. Se constituyeron núcleos de población en la orilla derecha del río Tormes, desde Carpio hasta Ledesma⁵⁵. Los pobladores que se establecieron eran de origen leonés. Esta repoblación debió ser poco importante y no estaba destinada a ser definitiva. Su destrucción se debió a dos causas, la decadencia del reino leonés por la lucha sucesoria y las incursiones guerreras de Almanzor, quien conquistó Salamanca y Alba de

⁵² LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 23.

⁵³ NOGALES DELICADO, D., *Historia de Ciudad Rodrigo*, pág. 40, GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 11.

⁵⁴ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 11.

⁵⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 23.

Tormes en el año 986⁵⁶.

Los asentamientos realizados por Ramiro II, a pesar de las destrucciones de Almanzor, serían la base para la repoblación definitiva de la región y núcleos de cristalización de futuras comarcas de carácter político-administrativo⁵⁷.

La definitiva conquista de toda la región salmantina tuvo lugar por el rey Fernando I en 1055⁵⁸. Su repoblación se llevó a cabo en el reinado de Alfonso VI, pero se trata de una responsabilidad y dirección últimas, pues se conservan documentos que testifican, sin lugar a dudas, que el autor inmediato de la repoblación de Salamanca fue don Raimundo de Borgoña⁵⁹, y que la reedificación y repoblación de Civitas Augusta (Ciudad Rodrigo) se llevó a cabo por el conde don Rodrigo González Girón de quien tomó su nombre actual⁶⁰.

⁵⁶ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, págs. 11 y 12, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 23.

⁵⁷ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 21.

⁵⁸ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 24.

⁵⁹ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 15.

⁶⁰ NOGALES DELICADO, D., *Historia de Ciudad Rodrigo*, pág. 41.

En los últimos años del siglo XI, el rey Alfonso VI encomienda a su yerno el conde don Raimundo de Borgoña la repoblación de Segovia, Avila y Salamanca y el territorio de sus obispados respectivos. La repoblación de Salamanca debió de comenzar enseguida, y efectuarse muy rápidamente al principio, pues a partir de 1102 don Raimundo de Borgoña y su mujer la infanta doña Urraca conceden privilegios de todo tipo y se dirigen a Salamanca junto con unos grupos de pobladores que buscaban nuevas tierras donde establecerse y, en 1103, ya hay alguna nueva iglesia funcionando⁶¹. El rey Alfonso VII, hijo de don Raimundo de Borgoña y de doña Urraca, al confirmar al obispo de Salamanca, don Munio, los privilegios que habían sido concedidos por sus padres, hace constar que la dotación de la iglesia salmantina tuvo lugar en día 22 de junio de 1102⁶².

Al mismo tiempo que la repoblación de Salamanca se intenta la repoblación de otros puntos fuertes situados en la línea del Tormes, de la misma manera que había hecho Ramiro II, siglo y medio antes; estos puntos eran, entre otros, Ledesma, Ribas y Alba (fig. 6)⁶³.

Esta repoblación, en cuanto a Salamanca y su alfoz se refiere, está perfectamente documentada en el Fuero de Salamanca donde están

⁶¹ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 21, GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, págs. 15-16.

⁶² GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 15.

⁶³ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 24, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 21.

consignadas las “naciones” repobladoras⁶⁴. Otros grupos menores son conocidos a través de la documentación de los archivos⁶⁵.

En principio, los repobladores constituyen un elemento heterogéneo por su origen territorial, ya que provenían de los diversos reinos cristianos peninsulares y extrapeninsulares, y también por los motivos que los movían a acogerse a las franquicias de la nueva ciudad: aventuras en territorio fronterizo, huida de la justicia, etc., predominando, sin duda alguna, la búsqueda de tierra⁶⁶.

Tanto en el Fuero de Salamanca como en una escritura de 22 de mayo de 1246, siempre se citan siete naciones repobladoras⁶⁷. Estas naciones o linajes, en la repoblación de Salamanca y de su alfoz, se hallan traducidos a sexmos, con lo cual éstos representan la naturas de los repobladores y nunca a las divisiones territoriales, quizás como supervivencia de las costumbres germánicas, usuales en el derecho leonés⁶⁸. La división de su alfoz se hizo en sexmos. Así, pues, los repobladores de Salamanca fueron los francos o franceses, los sarranos o serranos, los castellanos, los bregancianos, los portogaleses, los toreses y los mozárabes. Es de destacar que el Fuero de Salamanca no nombra a los gallegos⁶⁹.

⁶⁴ *Fuero de Salamanca*, 120 págs.

⁶⁵ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 16.

⁶⁶ *Op. cit.*, pág. 16.

⁶⁷ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 71.

⁶⁸ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, págs. 31-32.

⁶⁹ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, págs. 66-68, GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 17.

LOS CONCEJOS DE CIUDAD RODRIGO, LEDESMA, SALAMANCA Y ALBA DE TORMES EN EL SIGLO XII.

MAPA INSRADO EN LOS CORRESPONDIENTES DE J. GONZALEZ Y M. GONZALEZ GARCIA, CON LEVES MODIFICACIONES.

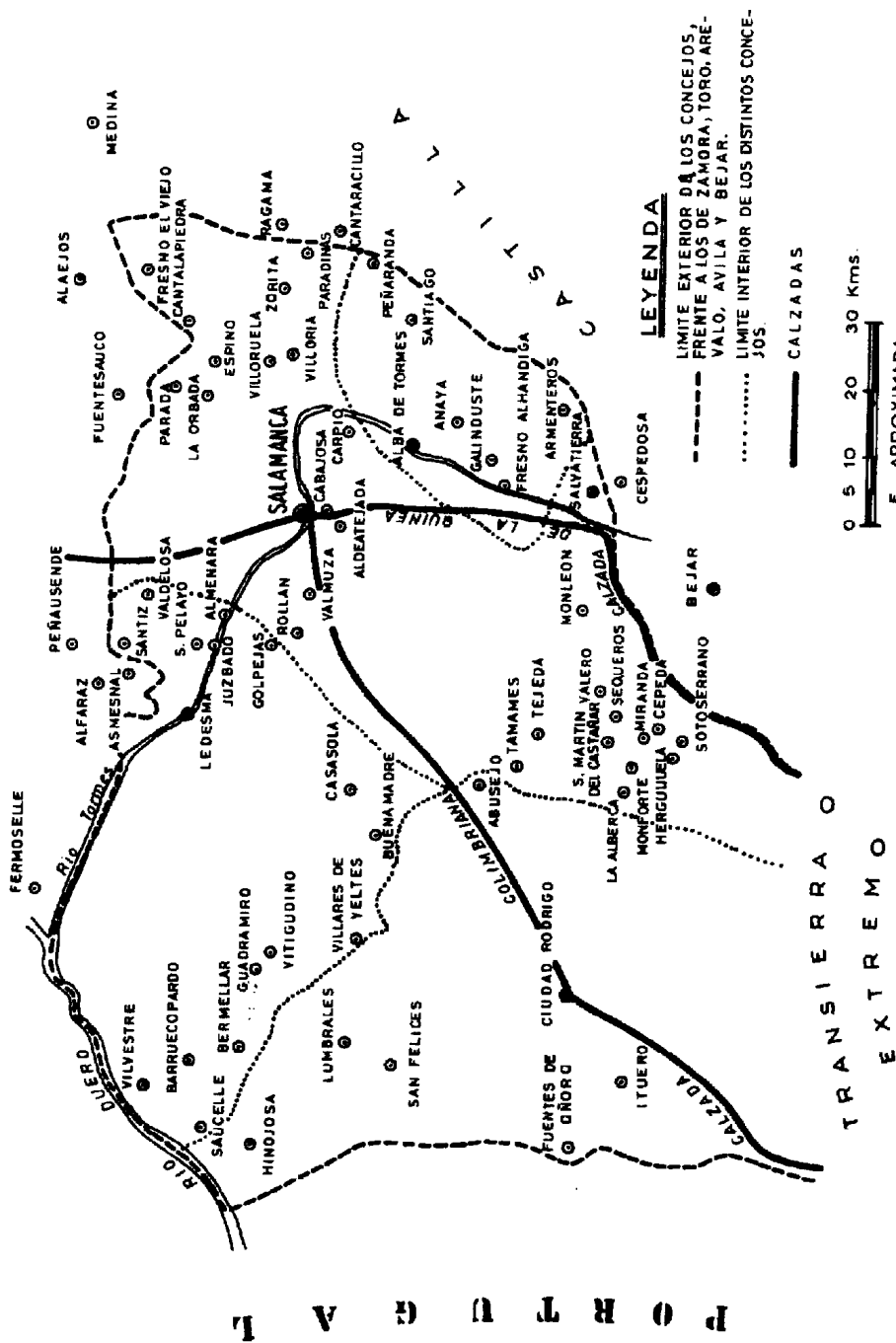


Fig. 6. Los Concejos de la Provincia de Salamanca en el siglo XII

Con respecto a los gallegos, que probablemente fue el grupo que intervino en más proporción en la repoblación de la comarca, como se ve hoy por la frecuencia del nombre de “gallegos” en la toponimia y en los patronímicos, serían parte integrante de los bregancianos y portugueses del norte que en aquella época se empezaban a conocer como “galleci o gallizianos” y que en el Fuero deben separarse de los llamados “gallici” que corresponderían a los francos⁷⁰.

La repoblación de Ciudad Rodrigo y su alfoz se llevó a cabo fundamentalmente, por leoneses⁷¹, pero también aparece el nombre de “gallegos” en la toponimia y en los patronímicos.

En el campo solo la toponimia y los patronímicos ayudan a rastrear el origen de los repobladores y, con ello, la información es importante respecto a la presencia de “gallegos” y escasa respecto al resto de los repobladores⁷².

Con el nombre de francos se designaba en la España cristiana occidental, durante la Alta Edad Media, a los extranjeros europeos, comprendiendo a catalanes y guipuzcoanos. En las ciudades, con el nombre de francos, se designaba a los vecinos de origen francés que vivían en un barrio o en una

⁷⁰ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 24.

⁷¹ NOGALES DELICADO, D., *Historia de Ciudad Rodrigo*, pág. 49.

⁷² GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: la repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 16, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 26.

calle. Estos serían protegidos por los dos personajes más relevantes de la repoblación salmantina del siglo XII: el conde don Raimundo de Borgoña y don Jerónimo, ambos ultrapirenaicos⁷³. A partir del siglo XII el grupo franco salmantino se fue diluyendo entre el resto de la población⁷⁴.

Con el nombre de serranos se designaba a los repobladores llegados de las montañas de Asturias y de León⁷⁵ o a los repobladores llegados de la Comarca de las Cinco Villas, que pueden ser, con más probabilidad, alguna de las dos comarcas de Navarra que llevan dicho nombre “Cinco Villas del Bidasoa” y “Cinco Villas del Valle de Goñi” sin llegar a descartar la comarca de las “Cinco Villas de Aragón”⁷⁶. En principio, no deben considerarse como indígenas de las Sierras de Francia y Béjar. El territorio de los serranos no necesitó repoblación posterior alguna⁷⁷.

Con el nombre de castellanos se designaba a los repobladores del antiguo condado de Castilla⁷⁸. La llegada de castellanos debió ser anterior a la separación de Castilla y León en el año 1157. Cuando ambos reinos vuelvan a

⁷³ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 24, GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: la repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 21.

⁷⁴ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: la repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 22.

⁷⁵ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, págs. 66-68, GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 17.

⁷⁶ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, págs. 19-20.

⁷⁷ *Op. cit.*, pág. 20.

⁷⁸ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, págs. 66-68, GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 17.

unirse en la persona de Fernando II, ya habrá tenido lugar en Salamanca la repoblación llevada a cabo por Alfonso IX, y además la atención de Castilla estará concentrada en Andalucía. Estas circunstancias hacen improbable la llegada de apreciables contingentes de pobladores castellanos a la ciudad después de 1157. Su territorio, en tiempos de Alfonso IX, fue entregado a la clerecía salmantina y a la Orden de Alcantara para su repoblación⁷⁹.

Con el nombre de bregancianos se designaba a los repobladores procedentes de Braganza⁸⁰.

Con el nombre de portugueses se designaba a los repobladores procedentes de Portugal que eran distinguidos entre si a causa de la mayor o menor proximidad geográfica a la ciudad salmantina. La corriente inmigratoria de los portugueses quedó cortada casi totalmente desde el momento en que Portugal fue independiente⁸¹.

Con el nombre de toreses se designaba a los repobladores toresanos del antiguo señorío de la infanta doña Elvira⁸². Es probable que con dicho nombre no solo se englobara a las personas procedentes de la ciudad de Toro sino también algunas otras originarias de las tierras leonesas y zamoranas.

⁷⁹ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág 20.

⁸⁰ *Op. cit.*, pág. 22.

⁸¹ *Op. cit.*, págs. 22 y 23.

⁸² VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, págs. 66-68, GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 17.

Parte del territorio de los toreses precisó una nueva repoblación⁸³.

Con el nombre de mozárabes se designaba a los pobladores ya existentes en Salamanca⁸⁴. De todos los linajes que intervinieron en la repoblación, es el de origen más impreciso, por no saberse si eran los mozárabes salmantinos que encontró Fernando I al reconquistar la ciudad, o si procedían de los mozárabes andaluces, de los que en tan gran número se sirvieron los Reyes leoneses para la repoblación de Tierra de Campos y orillas del Duero⁸⁵. Fueron incorporados, como grupo social, a la ciudad y al reino en virtud de una conquista y no por decisión propia, conservando sus propiedades, sus viviendas, etc. Su evolución fue la emigración hacia zonas más seguras⁸⁶.

Hubo otros repobladores, los judíos y los árabes. Los judíos no pueden considerarse repobladores pero si puede considerarse como moradores de Salamanca, coexistirían ya con los mozárabes. El Fuero manda que tengan por señor al Rey y que el concejo de Salamanca los ampare con derecho⁸⁷. Mantuvieron su extranjerismo racial permaneciendo inasimilables. Vivían en

⁸³ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 21.

⁸⁴ VILLAR Y MACIAS, M. *Historia de Salamanca*, tomo I, págs. 66-68.

⁸⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, pág. 25.

⁸⁶ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, págs. 23-25.

⁸⁷ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, págs. 72-73.

la judería⁸⁸.

Los árabes tuvieron una situación diversa según se tratase de moros libres o de moros sujetos a servidumbre⁸⁹.

La Tierra de Alba fue repoblada, predominantemente, por gentes procedentes de Navarra, Aragón y La Rioja. Su alfoz se dividió en cuartos⁹⁰.

La Tierra de Béjar fue repoblada por castellanos procedentes del concejo de Avila, debido a la separación de los Reinos de Castilla y León después de Alfonso VII. Esta es la causa de la diferente repoblación efectuada entre la Sierra de Béjar y la Sierra de Francia⁹¹.

La Tierra de Ciudad Rodrigo fue repoblada en el año 1161 con gentes procedentes de Zamora, León y Salamanca. Los límites de su alfoz y diócesis debieron establecerse coincidiendo exactamente con los límites del antiguo municipio de Miróbriga o Augustóbriga. El alfoz se dividió en campos⁹².

La Tierra de Ledesma fue repoblada en el año 1161 con gente procedente de Zamora y Benavente, seguramente en su mayoría oriundos de la vecina comarca de Sayago. La villa de Ledesma en ese momento estaba

⁸⁸ GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, pág. 27.

⁸⁹ *Op. cit.*, pág. 30.

⁹⁰ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 23.

⁹¹ *Op. cit.*, pág. 23.

⁹² *Op. cit.*, págs. 24-25.

completamente deshabitada⁹³. El alfoz se dividió en rodas. Inicialmente comprendía las rodas: del Campo, de Garci-Rey, de Villarino, de Mieza y de Cipérez⁹⁴. El próximo parentesco geográfico y geoeconómico de la Tierra de Ledesma histórica por una parte y Sayago, por otra, encontraría un refuerzo en la afinidad étnica de sus habitantes. Es decir, los modos de vida, las costumbres agrícolas y ganaderas, los tipos de “habitat” rústico, etc., de la Tierra de Ledesma Histórica y Sayago presentaría afinidad no sólo como consecuencia de unos mismos o muy semejantes condicionamientos geográficos sino también como resultado de la misma ascendencia étnica, de cuyo legado etnográfico y folklórico parece comprobarse la existencia de unos elementos leoneses occidentales⁹⁵.

La actual Tierra de Ledesma es bastante más reducida que la Tierra de Ledesma histórica. Por una parte se ha desgajado de ella todo el rincón occidental que pasó a formar parte del partido de Vitigudino, que incluye la comarca de Las Arribes.

⁹³ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 177, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, págs. 23-26.

⁹⁴ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 43.

⁹⁵ *Op. cit.*, págs. 26-27.

3.1.4. LAS COMARCAS DE LA PROVINCIA DE SALAMANCA

Una comarca es un espacio geográfico de poca extensión, cuya unidad física, histórica o cultural, la distinguen dentro de una región o de un país.

Las comarcas de la provincia de Salamanca pueden delimitarse, según Llorente Maldonado⁹⁶, desde la tradición o según los geógrafos.

Pueden clasificarse en dos grandes grupos: comarcas charras y comarcas no charras; las comarcas charras forman parte de la Charrería; las comarcas no charras, a su vez, pertenecen a tres distintas unidades: La Sierra, La Tierra de Peñaranda y las Guareñas, y La Ribera o Las Arribes. Dichas unidades son perfectamente caracterizables desde los puntos de vista geológico y geográfico (figs. 7 y 8).

Estas cuatro grandes unidades provinciales se articulan en:

La Charrería incluye El Campo Charro, La Armuña y Las Villas. A su vez, El Campo Charro abarca las comarcas de La Tierra de Alba, Salvatierra, El Campo de Salamanca, La Tierra de Ledesma, La Tierra de Vitigudino, El Abadengo, Los Campos de Argañan y Azaba, El Campo de Camaces y el Campo de Yeltes. La Armuña, a su vez, se divide en Armuña Alta y Armuña Baja.

⁹⁶ *Op. cit.*, págs. 49-84.

La Sierra incluye La Sierra de Béjar, La Serranía de Francia, La Sierra de Gata o Campo de Agadones y El Rebollar.

La planicie nororiental se divide en La Tierra de Peñaranda y La Tierra de Cantalapiedra o Las Guareñas.

La Ribera o Arribes no presenta divisiones internas, constituyendo una sola comarca⁹⁷.

⁹⁷ *Op. cit.*, págs. 127-128.

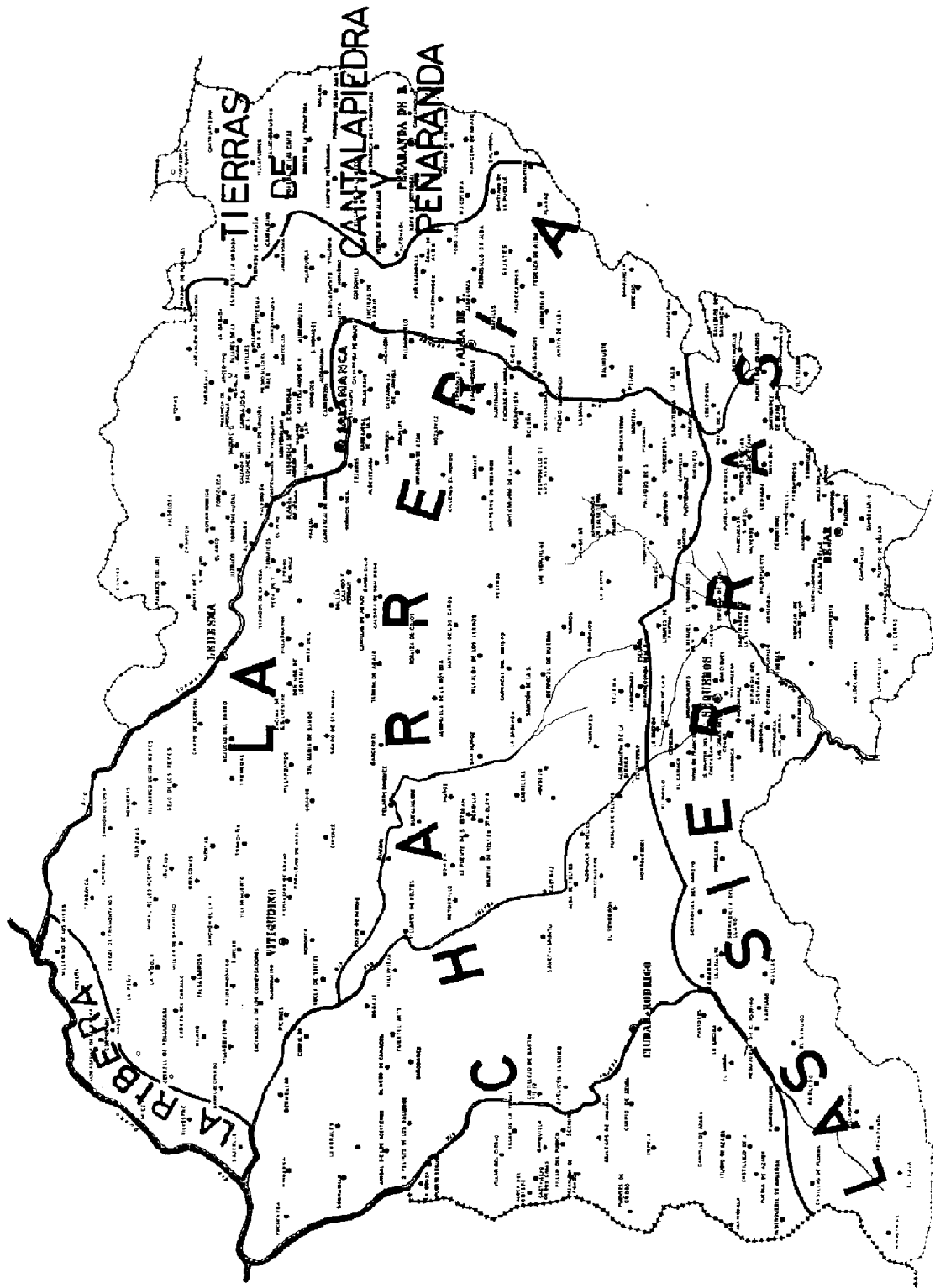


Fig. 7. Las grandes unidades provinciales

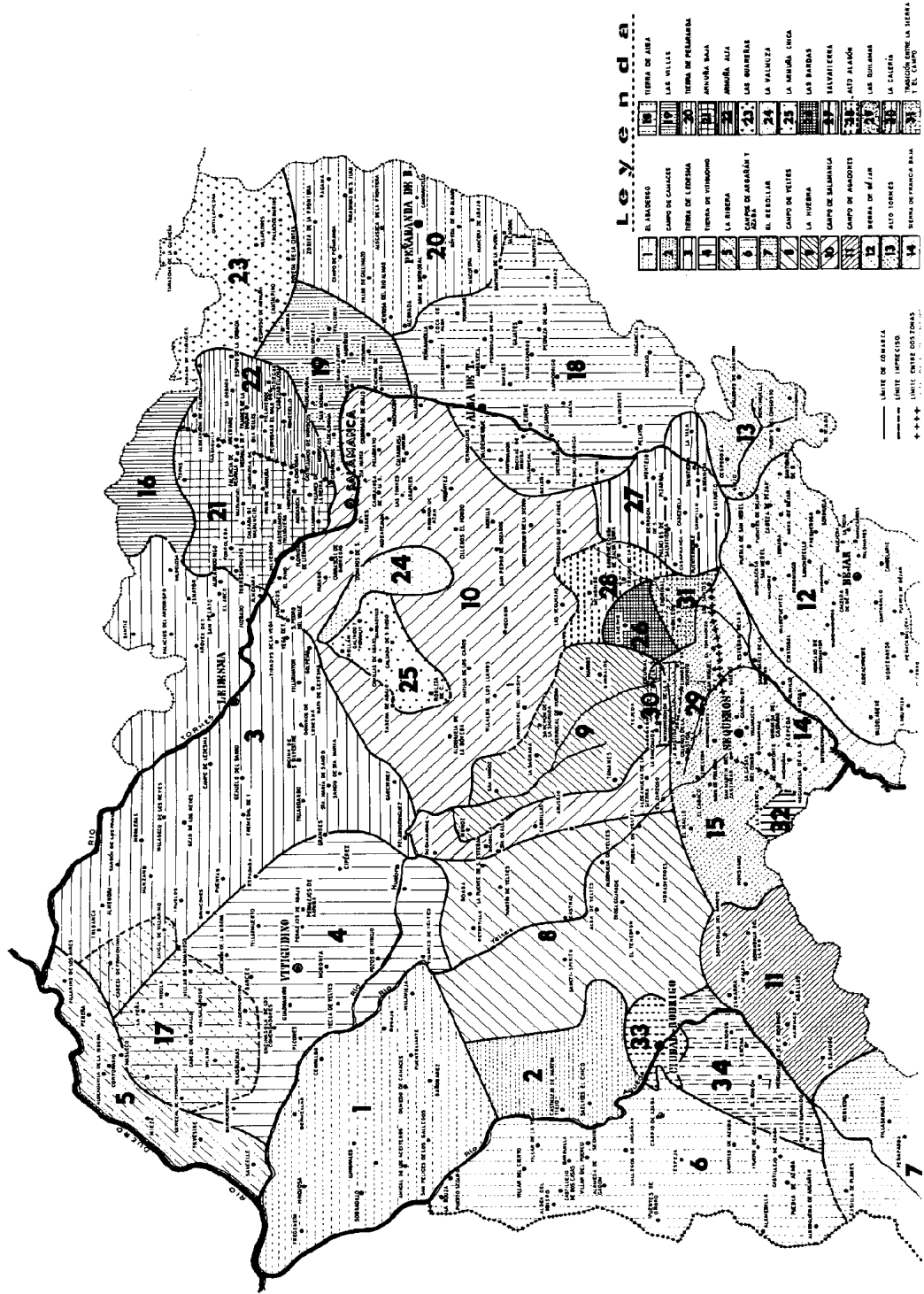


Fig. 8. Las comarcas de la provincia de Salamanca

3.1.5. LA POBLACION DE LA PROVINCIA DE SALAMANCA

La provincia de Salamanca en el Antiguo Régimen englobaba 1.100 núcleos de población ⁹⁸.

En la actualidad la provincia de Salamanca tiene 382 municipios y 19 entidades de ámbito territorial inferior al municipio⁹⁹.

En la provincia de Salamanca tuvo lugar un proceso de despoblamiento que se inició a finales del siglo XIV y principios del siglo XV¹⁰⁰. La causa fue la forma de repoblación llevada a cabo durante la Reconquista que se desarrolló según el modelo que dominaba en Galicia¹⁰¹. Hasta el siglo XVIII desaparecieron 500 pequeñas entidades de población, no quedando restos ni recuerdo alguno de muchas de las mismas¹⁰².

A partir del año 1769 se inició una repoblación creándose para dirigir las Juntas de Repoblación. Las personas que solicitaron habitar los “despoblados”, en su mayoría, fueron habitantes de zonas vecinas. Dichas repoblaciones tuvieron escasos éxitos y se interrumpió a finales del siglo XVIII¹⁰³.

⁹⁸ RODRIGUEZ SANCHEZ, A., “Historia II”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 80.

⁹⁹ *Boletín Oficial de la Provincia de Salamanca*, 3 de Abril de 1991, págs. 1-4.

¹⁰⁰ GARCIA ZARZA, E., *Origen histórico del latifundismo salmantino*, págs. 34-37.

¹⁰¹ GARCIA MARTIN, B., *El proceso histórico de despoblamiento en la provincia de Salamanca*, pág. 14.

¹⁰² *Op. cit.*, pág. 17.

¹⁰³ GARCIA ZARZA, E., *Origen histórico del latifundismo salmantino*, págs. 100-121.

La provincia de Salamanca tenía una participación en la población nacional de 1,72% en 1900, 1,46% en 1950 y 0,94% en 1986.

En el año 1900 vivía en la capital, solamente, el 8,1% de la población provincial. En 1950 pasó al 19,5% (80.239 habitantes en la capital y 331.724 en el resto de la provincia). En 1986 pasó al 45,5% (166.615 habitantes en la capital y 200.053 en la provincia)¹⁰⁴. En el Censo de 1 de marzo de 1991 la provincia tenía 357.801 habitantes, distribuidos 162.888 en la capital y 194.913 en el resto de la provincia¹⁰⁵.

¹⁰⁴ GARCIA ZARZA, E., “Geografía”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 47.

¹⁰⁵ *Poblaciones de Derecho y Hecho de los Municipios Españoles. Censo de Población de 1991*, págs. 189-196.

3.2. EL PARTIDO JUDICIAL DE VITIGUDINO: SU EVOLUCION HISTORICA

La creación en 1833 del partido judicial de Vitigudino dió lugar a que Vitigudino, ubicada en la roda ledesmina de Cipérez, se convirtiera en la capital económica y administrativa de una comarca que habiendo pertenecido al alfoz ledesmino, después al Ducado de Alburquerque, y también al partido de Ledesma (durante el siglo XVIII), se hallaba en una posición excéntrica, arrinconada contra Portugal y bastante alejada de la capital de la antigua Tierra, es decir, de Ledesma.

Vitigudino después de la Guerra de la Independencia tenía 305 habitantes, siendo su importancia demográfica relativa. Aún hallándose en la roda de Cipérez era una villa de realengo eximida, es decir, se gobernaba sin sujeción a la roda a la que pertenecía¹⁰⁶.

El actual partido judicial de Vitigudino abarca la Tierra de Vitigudino, el Abadengo, la parte septentrional del antiguo Campo de Camaces y Las Arribes.

¹⁰⁶ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, págs. 133-135.

La Tierra de Vitigudino comprende tierras de las antiguas rodas ledesminas de Cipérez y de Mieza; la de Mieza contenía parte de Las Arribes y casi toda la comarca que después se conocería con el nombre de Ramajería; pues bien, tanto la zona de Cipérez como la parte no riberana de la roda de Mieza van a constituir la actual Tierra de Vitigudino, comarca con vitalidad en la conciencia del pueblo¹⁰⁷.

El Abadengo históricamente perteneció al Concejo de Ciudad Rodrigo y, desde el punto de vista religioso, perteneció y pertenece, a la diócesis de Ciudad Rodrigo¹⁰⁸.

Se sitúa en la zona comprendida entre los cursos inferiores de los ríos Agueda y Yeltes y el río Duero. El límite meridional, que va desde el Agueda al Yeltes, coincide exactamente con el límite entre los partidos de Ciudad Rodrigo y Vitigudino¹⁰⁹.

Esta comarca se puede dividir en dos partes, el alto Abadengo y el bajo Abadengo. En este último se hallan los términos de San Felices de los Gallegos, Ahigal de los Aceiteros, Sobradillo, Hinojosa de Duero, La Fregeneda y Bermellar¹¹⁰.

¹⁰⁷ *Op. cit.*, pág. 64.

¹⁰⁸ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 178, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 61.

¹⁰⁹ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 61, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, pág. 23.

¹¹⁰ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 239.

Las Arribes, comarca autónoma objeto de esta Tesis, corresponde al noroeste de este partido judicial y es descrita ampliamente en el siguiente apartado.

El territorio del partido judicial de Vitigudino, donde asientan estas comarcas, estuvo habitado desde tiempos muy remotos: estuvieron hombres prehistóricos, celtas, romanos y visigodos. Con la invasión árabe y las guerras de la Reconquista quedaron deshabitadas y convertidas en lo que se ha llamado “tierra de nadie”. Los musulmanes en la Sierra de Gata y los cristianos en la derecha del río Duero y luego en el río Tormes, hicieron imposible, con sus algaradas y sus correrías, cualquier tipo de vida laboriosa y pacífica¹¹¹.

La historia actual comienza con la repoblación iniciada por el rey Fernando II de León (1157 a 1188). Al abrigo de la Sierra de Gata, ya leonesa, y de la fortaleza de Ciudad Rodrigo, que defendía de los árabes y de los portugueses, las tierras del alfoz de Ledesma y las tierras del Abadengo fueron repobladas en su totalidad¹¹².

Los repobladores, de todas estas comarcas, fueron asturianos, gallegos, bregancianos y framontanos. Se ha considerado, en el ámbito de la provincia, como una repoblación leonesa. La región del actual Portugal situada entre los

¹¹¹ *Op. cit.*, pág. 23.

¹¹² *Op. cit.*, págs. 18-23.

ríos Miño y Duero correspondía al reino leonés, y era la parte de Galicia que después pasó a la monarquía lusitana¹¹³.

Los patronímicos recuerdan estos orígenes, pues hay apellidos como Alonso, característico de las tierras del norte de León, o Ferreiras, Pereiras, Guveias, etc., de origen portugués.

En la toponimia de todas estas tierras aparecen señas de las tierras gallegas, cantábricas y precantábricas, nombres como Gallegos de Argañán, San Felices de los Gallegos, Zarza de Pumareda, Cabeza de Framontanos, etc¹¹⁴.

También se ha comprobado, en estas comarcas, la existencia de un legado etnográfico y folklórico rico en elementos leoneses occidentales¹¹⁵.

¹¹³ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 71. MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 21.

¹¹⁴ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 33.

¹¹⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, págs. 26-27.

3.3. LA COMARCA DE LAS ARRIBES

3.3.1. LAS ARRIBES: DENOMINACIONES

El nombre de Las Arribes es la denominación empleada preferentemente por los geógrafos para nombrar a la comarca salmantina situada al N.O. de la provincia¹¹⁶.

Con ese nombre los naturales llaman a los profundos valles fluviales que se hallan en la comarca¹¹⁷.

Se ha suscitado una polémica sobre el género gramatical del apelativo y topónimo Arribes. En concreto, de si lo recomendable y lo correcto es decir Los Arribes o decir Las Arribes. El profesor Antonio Llorente Maldonado ha concluido que tanto Los Arribes como Las Arribes son construcciones lícitas, porque arribe, arribes, es un sustantivo ambiguo, pero los naturales de las

¹¹⁶ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 60.

¹¹⁷ GARCIA ZARZA, A., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 73.

comarcas donde hay arribes, hayan o no hayan estudiado, emplean siempre arribe, arribes como femenino¹¹⁸. Indistintamente se la conoce como La Ribera por su proximidad al río o también como Las Arribes¹¹⁹.

¹¹⁸ LLORENTE MALDONADO, A., “Tanto Los Arribes como Las Arribes son construcciones lícitas, pero...”, *La Gaceta*, pág. 4, Martes, 30 de Enero de 1996.

¹¹⁹ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 60, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 22.

3.3.2. GEOGRAFIA DE LA COMARCA DE LAS ARRIBES

La comarca salmantina de Las Arribes se sitúa en el N.O. provincial. En ese punto, la penillanura salmantina se interrumpe violentamente al encajarse en ella los ríos, con profundos tajos, con paredes verticales de hasta 400 metros y adquiere, desde el punto de vista geográfico, una morfología compleja en contraste con las comarcas vecinas¹²⁰. Es una franja estrecha y alargada que coincide con el recorrido del río Duero, el cual desciende desde la llanura 418 metros¹²¹. Los afluentes salmantinos experimentan algo similar. El Tormes, después de formar varias huertas, se encaja en el zócalo a partir de Ledesma con un desnivel del 7,3 por 100. A los ríos Uces, Camaces, Huebra y Agueda les ocurre otro tanto. Surgen valles encajados en la penillanura que mantiene sus rasgos en los interfluvios de la comarca¹²².

En la provincia de Salamanca constituye la orilla izquierda del Duero, desde que éste abandona la provincia de Zamora, hasta su entrada en Portugal por el término de La Fregeneda, formando, en toda la extensión de su recorrido por la provincia, frontera natural y política con el vecino

¹²⁰ GARCIA ZARZA, E., "La penillanura salmantina". En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 73.

¹²¹ GARCIA ZARZA, E., "Geografía". En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 42.

¹²² GARCIA ZARZA, E., "La penillanura salmantina". En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 73.

país. Desde Villarino a La Fregeneda, los dos extremos de Las Arribes salmantinas, hay una distancia, en línea recta, de 50 kilómetros, que se convierten en 65 kilómetros siguiendo las sinuosidades del río¹²³.

La zona S.O. de la provincia de Zamora se considera, por los geógrafos, que forma parte de Las Arribes. El río Duero tiene, en esa zona de la provincia de Zamora, un recorrido de aproximadamente 44 kilómetros y también constituye frontera natural y política con Portugal.

La anchura de la comarca de Las Arribes se cifra en unos 6 a 8 kilómetros¹²⁴.

En la provincia de Salamanca, Las Arribes, a diferencia de las restantes unidades geográficas, no presenta divisiones internas, constituyendo una sola comarca¹²⁵.

Para algunos autores, aunque Las Arribes, en el rigor de la palabra, llega hasta donde el Duero se interna en Portugal, los límites geográficos van desde la confluencia del río Duero con el río Tormes hasta la confluencia del

¹²³ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, págs. 21-22.

¹²⁴ *Op. cit.*, pág. 22.

¹²⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 127.

río Duero con el río Yeltes (o Huebra), entre Saucelle e Hinojosa¹²⁶.

Las Arribes tienen un clima privilegiado consecuencia de la poca altitud del terreno. La existencia de humedad y temperaturas templadas han dado lugar a cultivos de naranjos, almendros, cerezos, olivos, limoneros, etc., es decir cultivos mediterráneos que marcan diferencia con el resto de la provincia¹²⁷.

¹²⁶ *Op. cit.*, pág. 60.

¹²⁷ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 21. LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 13.

3.3.3. HISTORIA DE LAS ARRIBES

La comarca de Las Arribes después de la invasión árabe se convirtió en una “tierra de nadie”, formaba parte de las zonas despobladas de la submeseta norte¹²⁸. Otras opiniones estiman que en Las Arribes, antes de la repoblación del conde don Raimundo de Borgoña, existían núcleos de población cristianos o musulmanes, que amparándose en lo apartado y escabroso del terreno, se mantuvieron solitarios en medio de la “tierra de nadie”, y a los que posteriormente se agregaron repobladores procedentes de los condados de Galicia y Portugal, formando así una población primitiva, a la que encontrarían los asentados en las comarcas de Salamanca y Ledesma que, una vez firmemente establecidos en el Tormes, avanzaban hacia el oeste para apropiarse y repoblar los territorios dependientes de su obispado, lo que dió origen posteriormente a roces y conflictos con Portugal en el sur de la provincia, donde la frontera es una “raya seca”. Estos conflictos no se podían dar en Las Arribes, donde el Duero ha marcado siempre una frontera natural acatada por los dos países¹²⁹.

Cuando se repoblaron las tierras del alfoz de Ledesma y las tierras del Abadengo con ellas se repobló la actual comarca de Las Arribes.

¹²⁸ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 226.

¹²⁹ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 25.

3.3.4. EVOLUCION DE LA POBLACION EN LAS ARRIBES

Las Arribes, tal como se ha expuesto, tuvieron un poblamiento antiguo que está confirmado por la existencia de restos prehistóricos y restos de la dominación romana¹³⁰.

Después de la invasión árabe y durante los primeros tiempos de la Reconquista, al igual que las comarcas circundantes, fue una “tierra de nadie”, siendo tierras deshabitadas y despobladas¹³¹, aunque, debieron haber núcleos de población cristianos y musulmanes que, amparándose en lo apartado y escabroso del terreno, se mantuvieron solitarios¹³².

Los repobladores de Las Arribes son poco conocidos¹³³. En general, se ha considerado que los repobladores fueron leoneses occidentales¹³⁴.

La persistencia de población anterior al momento de la Reconquista es posible, pues de hecho se la hallan en nombres de origen íbero, como Peña Batueca, en el municipio de Vilvestre¹³⁵.

¹³⁰ GARCIA ZARZA, E., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 73.

¹³¹ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 226.

¹³² LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 25.

¹³³ *Op. cit.*, pág. 23.

¹³⁴ VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, tomo I, pág. 71, MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 33.

¹³⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudios sobre el habla de La Ribera*, pág. 26.

La persistencia de árabes también es posible, pues existen actualmente nombres de origen árabe como los nombres de “almofea” en el municipio de Pereña y en el regato denominado “mariguada”¹³⁶.

La influencia de la repoblación gallega se encuentra reflejada en patronímicos como el apellido gallego, muy frecuente en la comarca, y toponímicos como Arrogallego (Arroyo Gallego) y Monte Gudín¹³⁷.

La influencia de la repoblación vasca se encuentra reflejada en patronímicos como Mieza y en toponímicos como Mieza, Peña Aldana y Lagucea¹³⁸.

La influencia portuguesa se encuentra reflejada por la presencia en el habla de rasgos afines, rasgos que no pueden considerarse como portuguesismos de importación. Se deben a que hubo una época en que las hablas de las dos orillas del Duero se asemejaban bastante, ya por ser la primitiva población o repoblación de estos territorios muy anterior al nacimiento de Portugal, y, por lo tanto, de una época en la que el gallego-portugués no se había destacado con personalidad del romance hablado en todo el occidente de la Península, ya por provenir la mayoría de los repobladores de los Condados de Galicia y Portugal¹³⁹.

¹³⁶ *Op. cit.*, pág. 26.

¹³⁷ *Op. cit.*, pág. 26.

¹³⁸ *Op. cit.*, págs. 26 y 27.

¹³⁹ *Op. cit.*, pág. 25.

Una vez repobladas definitivamente Las Arribes, siguieron, dentro de la Corona de León, una vida pacífica, sin intervenir en los conflictos con Castilla, a causa de su excentricidad, y sin ser molestada tampoco por los portugueses, defendidas como están por el formidable obstáculo natural del río Duero¹⁴⁰.

Las Arribes ya en el siglo XVI tenían una densidad de población más alta que la penillanura, diferencia que se mantuvo en los siglos siguientes. En 1587 tenían unos 17.200 habitantes y sólo unos 300 habitantes más dos siglos después. Se inicia entonces un periodo en el que se pueden señalar cuatro etapas: la primera hasta 1887 con aumento de habitantes, a causa del auge del viñedo. La decadencia de éste provocará una fuerte emigración a Cuba y Argentina hasta 1930; se pierde en este periodo un 21% de la población respecto a 1887. La tercera etapa, hasta 1960, se caracteriza por una emigración escasa. De 1960 a 1970 la emigración se acelera de nuevo, perdiendo aproximadamente otro 27% de la población. A partir de 1970 las causas de esta emigración se han intensificado por la abundancia de pequeños propietarios, jornaleros y explotaciones parceladas y aterrazadas de difícil modernización¹⁴¹.

¹⁴⁰ *Op. cit.*, pág. 27.

¹⁴¹ GARCIA ZARZA, E., "La penillanura salmantina". En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, págs. 73-74.

Hay diferencias entre las poblaciones de Las Arribes y las comarcas vecinas, tanto en su emplazamiento, como en el aspecto de sus calles y también en el tipo de construcción. Su causa debe buscarse en el modo de vida de los riberanos respecto al resto de las comarcas circundantes y a la diferencia de recursos económicos¹⁴².

Los núcleos de población se emplazan en la zona de transición, en el borde de la penillanura hacia las zonas con más pendiente, donde se benefician de las dos zonas morfoclimáticas y económicas de la comarca¹⁴³.

Las construcciones presentan rasgos peculiares. Se trata de una casa bloque en altura con escalera exterior y un balcón sobre la puerta de entrada. En el campo llaman la atención unas casetas sencillas, de forma circular, con falsa bóveda y hechas con lajas de granito y que sirven como refugio para los agricultores y ganaderos. Tienen gran semejanza con las construcciones prehistóricas gallegas, y podría ser éste su origen¹⁴⁴.

¹⁴² *Op. cit.*, pág. 74.

¹⁴³ GARCIA ZARZA, E., “Pueblos y Paisajes”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 20, GARCIA ZARZA, E., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 74.

¹⁴⁴ GARCIA ZARZA, E., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 74, GARCIA ZARZA, E., “Pueblos y Paisajes”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, pág. 20.

3.3.5. ECONOMIA DE LAS ARRIBES

La economía de Las Arribes se sustenta en la agricultura, la ganadería, el comercio y la industria.

La agricultura ocupa el 56% de la superficie de Las Arribes a pesar de las adversas condiciones físicas y de la reducción del terreno cultivable disponible por la construcción de embalses. Posee rasgos derivados de la dualidad morfoclimática. Hay cultivos cerealísticos pobres, como en la penillanura, pero además cuenta con importantes cultivos de viñedo, olivo, almendro, toda clase de frutas (naranjas, limones, etc.) y hortalizas. Todo lo anterior dió mayor variedad y riqueza a la comarca y permitió sostener una densidad de población mayor que la de las comarcas vecinas. Actualmente, los cambios en los mercados, la competencia y la mecanización escasa y difícil ha dado lugar al abandono de muchos cultivos por su escasa rentabilidad facilitando la emigración¹⁴⁵.

En cuanto a ganadería, es muy abundante el ganado cabrío y el lanar, que aprovechan magníficamente el difícil terreno, viviendo en el invierno en los cálidos arribes, y en el verano en el llano oriental. El ganado caballar, así

¹⁴⁵ MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, pág. 222, GARCIA ZARZA, E., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, pág. 74, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, pág. 21.

como el vacuno, es casi desconocido, abundando en cambio mucho los mulos y asnos¹⁴⁶.

El comercio en esta región siempre fue muy activo, por ser algunos de sus productos agrícolas y ganaderos muy apreciados en el resto de la provincia y aún en las de Zamora y Valladolid¹⁴⁷.

La industria que había, en la década de los años 50, era la necesaria para aprovechar y transportar las materias que se producían: molienda de cereales, de aceituna, fabricación de vino y de aguardiente, y todo ello, en general, de una manera rudimentaria¹⁴⁸.

Las condiciones de la red fluvial a su paso por Las Arribes ha permitido construir varios embalses, sólo productores de energía, que han constituido el primer complejo hidroeléctrico de España. La instalación de estos complejos hidroeléctricos ha repercutido en la mejora de carreteras y aporte económico a los riberaños que trabajaron directa o indirectamente en su construcción.

Hoy día, constituye una importante fuente de ingreso los cánones energéticos que las compañías pagan a los municipios donde se enclavan las centrales hidroeléctricas¹⁴⁹.

¹⁴⁶ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, pág. 28.

¹⁴⁷ *Op. cit.*, pág. 29.

¹⁴⁸ *Op. cit.*, pág. 28.

¹⁴⁹ GARCIA ZARZA, E., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, tomo 8, págs. 74-75.

3.3.6. CARACTERISTICAS DE LOS RIBERANOS

En Las Arribes, a diferencia del resto de la provincia, no hay dehesas, ni alquerías ni caseríos aislados, concentrándose toda la vida en los pueblos. Por la noche el campo queda desierto, pues todo el ganado regresa al recinto del pueblo, mientras que durante el día, hombres y animales, se desparraman por los llanos y las arribes¹⁵⁰.

El clima, las condiciones de vida, los alimentos, dan a la larga carácter a los habitantes de una región; para Llorente Maldonado los ribeños se parecen mucho más a los alegres ribereños navarros y riojanos que a sus paisanos salmantinos, son alegres, decididos, pendencieros, cantarines, gastadores, etc.¹⁵¹.

En el estudio de García Boiza sobre los trajes provinciales típicos, la provincia de Salamanca fue dividida en seis zonas, una de estas zonas es La Ribera cuyo traje se diferencia bastante del traje charro propiamente dicho¹⁵².

El habla de La Ribera, para Llorente Maldonado, se presenta como una modalidad del leonés occidental, pero modificada por otras causas que le dan carácter específico dentro del común denominador dialectal: hay rasgos de

¹⁵⁰ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, págs. 36-37.

¹⁵¹ *Op. cit.*, pág. 30.

¹⁵² LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 60.

castellano antiguo, de leonés oriental, de las hablas meridionales de España, de portuguesismos, rasgos análogos al mirandés, y, por último, gran cantidad de salmantinismos, sobre todo en cuanto a entonación y léxico, que hacen que se considere al riberano como perteneciente al leonés propio de la región salmantina. Leonés muy influenciado por el castellano y además con fenómenos peculiares, que son los que le dan personalidad dentro de las hablas occidentales¹⁵³.

Las manifestaciones folklóricas son particulares, en Aldeadávila había “partidas”, en Villarino se divertían con la “bodina”, en Saucelle con el opíparo “alboroque”, en Vilvestre comiendo la típica “choriza” y en Mieza con aparatosas “furrionas”¹⁵⁴.

Esta forma de vida se ha modificado en los últimos años, pues la pérdida de su aislamiento, la escuela, el servicio militar, la llegada del personal de las centrales hidroeléctricas, han dado lugar a una uniformización del lenguaje y de las costumbres.

¹⁵³ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, pág. 201.

¹⁵⁴ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 60, LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, pág. 31.

3.3.7. LOS PUEBLOS DE LAS ARRIBES

Las Arribes constituye una comarca con plena conciencia en la mente de todos sus habitantes e incluso en la mayoría de los habitantes de la Provincia. Se halla citada, de forma continua, por diversos autores, como Vázquez de Parga y Mansilla, Maluquer, Cabo, Zarza y en las encuestas enviadas y posteriormente remitidas por los Ayuntamientos a Llorente Maldonado¹⁵⁵.

Los pueblos que forman parte, de forma estricta, de Las Arribes, en la Provincia de Salamanca, son: Pereña de la Ribera, Villarino, Masueco, Aldeadávila de la Ribera, Corporario (actualmente anejo de Aldeadávila de la Ribera), Mieza, Vilvestre y Saucelle¹⁵⁶.

Hay otros pueblos que se consideran riberanos y no lo son. Esto sucede con aquellos pueblos que pertenecieron a la antigua comarca de la Ramajería y que han perdido conciencia de pertenecer a ella y que, por encontrarse en el extremo occidental de la misma, en contacto directo con las Arribes, de tanta personalidad, se consideran riberanos. Estos pueblos son Trabanca, Cerezal de Peñahorcada, Zarza de Pumareda, Barruecopardo, Cabeza de Framontanos, Cabeza del Caballo y Ahigal de Villarino¹⁵⁷.

¹⁵⁵ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, págs. 60-87.

¹⁵⁶ *Op. cit.*, pág. 60.

¹⁵⁷ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la Provincia de Salamanca*, pág. 93.

Los estudios de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Junta de Castilla y León para la creación de un Parque Natural de Arribes del Duero en las provincias de Salamanca y Zamora, incluye, dentro de la provincia de Salamanca, los términos municipales de Villarino de los Aires, Pereña, Masueco, Mieza, Vilvestre, Puerto Seguro, San Felices de los Gallegos, Ahigal de los Aceiteros, Sobradillo, La Fregeneda, Hinojosa del Duero, Saucelle, Aldeadávila de la Ribera, La Bouza, Cerralbo, Bermellar, Saldeana y Barruecopardo.

Como zona periférica de protección del parque natural incluyen los términos municipales de El Milano, Villasbuenas, Encinasola de los Comendadores, Trabanca, Lumbrales, Olmedo de Camaces, Fuenteliante, Bogajo, La Redonda, Valderrodrigo, Cerezal de Peñahorcada, La Zarza de Pumareda y La Peña¹⁵⁸.

Este proyecto de Parque Natural de Arribes del Duero abarca, en la Provincia de Salamanca, además, a las comarcas del Abadengo y la Ramajería (Tierra de Vitigudino), siendo, pues, una concepción extensiva que sobrepasa los límites de lo que históricamente ha sido la comarca de Las Arribes.

Se ha discutido si Hinojosa de Duero y La Fregeneda, pueblos del Abadengo, forman parte de la comarca de Las Arribes; hoy día, hay

¹⁵⁸ *El Parque Natural de Arribes del Duero*, pág. 54.

tendencia a considerar a Las Arribes en sentido amplio, y, por lo tanto, deberían ser incluidos.

En el “Estudio sobre el habla de La Ribera” realizado por Llorente Maldonado, en 1947, incluyó Hinojosa de Duero, matizando que por “tener características del habla de la Ribera, y además marcar la transición hacia el lenguaje del resto de la provincia, sobre todo el charrísimo lenguaje del Abadengo”, y no incluyó la Fregeneda, en la que, por “su importancia como estación fronteriza con aduana de bastante movimiento, el crecido número de funcionarios y el constante intercambio con Portugal sin tener ya el impedimento del río, se hablaba una mezcla de dialecto y de castellano correcto impregnado de portuguesismos”¹⁵⁹.

Por la naturaleza del trabajo propuesto, estimamos que deben ser estudiados, los pueblos de la comarca tradicional de Las Arribes de la Provincia de Salamanca, es decir, aquellos pueblos que Llorente Maldonado considera que forman parte estricta de la comarca: Aldeadávila de la Ribera, Corporario, Masueco, Mieza, Pereña, Saucelle, Vilvestre y Villarino de los Aires, añadiendo Hinojosa de Duero y La Fregeneda, lo que permitirá observar si hay diferencias genéticas entre estas poblaciones.

¹⁵⁹ LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, pág. 23.

En la tabla 9 se observa la evolución de la población de estos municipios durante el siglo XX. El número de habitantes de estos pueblos ha sufrido un paulatino descenso a lo largo de este siglo, fundamentalmente debido a las emigraciones que han tenido lugar. Hubo un crecimiento de la población en los años sesenta, de tipo temporal, coincidiendo con las obras de las presas hidroeléctricas que precisaron gran cantidad de mano de obra. Con motivo de estas instalaciones han surgido algunos núcleos de población como son los poblados del Salto de Aldeadávila y del Salto de Saucelle.

Por otra parte estimamos interesante, que en un futuro, se realizara el estudio de aquellos pueblos de la comarca del Abadengo que están situados en zonas de arribes de los ríos Duero, Huebra y Agueda, que aún no perteneciendo a la comarca estricta de Las Arribes, quedaran englobados por razones geográficas en el Parque Natural de Las Arribes del Duero: Ahigal de los Aceiteros, Barruecopardo, Bermellar, Cerralbo, La Bouza, Puerto Seguro, Saldeana, San Felices de los Gallegos y Sobradillo. Podremos así comparar posteriormente las frecuencias de aparición de los marcadores estudiados en ambos conjuntos.

En la tabla 10 se observa la evolución de la población de estos municipios durante el siglo XX.

Tabla 9. Evolución de la población en los pueblos de Las Arribes durante el siglo XX

Nombre	1900 ^a	1930 ^a	1960 ^a	1970 ^a	1981 ^b	1991 ^c	Var. ^c	Muj. ^c	Ent. Menores ^a
Aldeadávila	1923	1881	3388	1965	1913	1761	906	855	Corporario, Salto de Aldeadavila.
Corporario	302	263	322	257					
Hinojosa del Duero	2059	1745	1800	1279	1014	962	463	499	
La Fregeneda	1499	1532	1294	947	787	689	332	357	
Masueco	1090	995	1091	811	638	514	256	258	
Mieza	1181	990	1151	667	539	431	219	212	
Pereña	1656	1191	1128	1000	571	555	290	265	
Saucelle	1151	921	1630	815	680	575	287	288	Salto de Saucelle
Vilvestre	1672	1449	1394	906	750	711	354	357	
Villarino	2125	1770	1501	2113	1755	1306	645	661	Cabeza de Framontanos

^a Censo 1900, 1930, 1960, 1970¹⁶⁰.

^b Censo 1981¹⁶¹.

^c Censo 1991 y relación de varones y mujeres¹⁶².

¹⁶⁰ *Nomenclator de los Municipios de España*, págs. 8, 62, 108, 111, 136, 176, 210, 220.

¹⁶¹ *Nomenclator Comercial Pueblos de España*, págs. 292-298.

¹⁶² *Poblaciones de Derecho y Hecho de los Municipios Españoles. Censo de Población de 1991*, págs. 189-196.

Tabla 10. Evolución de la población en pueblos situados en arribes durante el siglo XX

Nombre	1900 ^a	1930 ^a	1960 ^a	1970 ^a	1981 ^b	1991 ^c	Var. ^c	Muj. ^c
Ahigal de los Aceiteros	651	655	605	277	287	245	122	123
Barruecopardo	944	927	1595	1113	829	681	341	340
Bermellar	616	502	607	436	284	263	131	132
Cerralbo	883	683	688	487	392	303	162	141
La Bouza	265	258	202	113	68	79	42	37
Puerto Seguro	770	585	485	318	163	127	64	63
Saldeana	461	322	412	304	255	227	118	109
San Felices de los Gallegos	1754	1477	1501	1109	846	733	375	358
Sobradillo	1487	1254	1043	692	499	464	221	243

^a Censos 1900, 1930, 1960, 1970¹⁶³.

^b Censo 1981¹⁶⁴.

^c Censo 1991 y relación de varones y mujeres¹⁶⁵.

Puede observarse una pérdida de población gradual, con dos excepciones, el aumento de la población de Barruecopardo en los años sesenta, que tiene su explicación en la industria extractiva de sus minas de wolframio, y el aumento de la población de Hinojosa de Duero, en los mismos años, que coincide con las obras de la presa hidroeléctrica de Saucelle.

Por último, también consideramos interesante, un estudio posterior de aquellos pueblos que se consideran riberanos y no lo son: Ahigal de Villarino, Barruecopardo, Cabeza del Caballo, Cabeza de Framontanos, Cerezal de

¹⁶³ *Nomenclator de los Municipios de España*, págs. 3, 27, 32, 35, 56, 76, 88, 146, 159, 163, 180.

¹⁶⁴ *Nomenclator Comercial Pueblos de España*, págs. 292-298.

¹⁶⁵ *Poblaciones de Derecho y Hecho de los Municipios Españoles. Censo de Población de 1991*, págs. 189-196.

Peñahorcada, Trabanca y Zarza de Pumareda. Barruecopardo ha sido incluido entre los pueblos que formarán parte del futuro Parque Natural de Las Arribes del Duero por tener su término municipal en las arribes del río Huebra.

En la tabla 11 puede observarse la evolución en la población de estos municipios durante el siglo XX. Se objetiva una pérdida de población gradual, con dos excepciones, el aumento de la población de Barruecopardo, que ya se ha expuesto, y el aumento de la población de Cabeza de Caballo, en los mismos años, que coincide con las obras de la presa hidroeléctrica de Aldeadávila.

Nuestro estudio, junto a los probables trabajos futuros, permitirá comparar las frecuencias de los marcadores genéticos ahora estudiados con la de los otros dos conjuntos.

Los municipios que componen la comarca objeto de nuestro estudio, su extensión¹⁶⁶ y el número de habitantes¹⁶⁷, de cada uno de ellos, en el momento de su realización, se indican en la tabla 12.

¹⁶⁶ *Nomenclator Comercial Pueblos de España*, págs. 292 a 298.

¹⁶⁷ *Censos recogidos en los respectivos municipios en 1996*.

Tabla 11. Evolución de la población en pueblos que se consideran de Las Arribes durante el siglo XX

Nombre	1900 ^a	1930 ^a	1960 ^a	1970 ^a	1981 ^b	1991 ^c	Var. ^c	Muj. ^c	Ent. Menores ^a
Ahigal de Villarino	270	236	204	144	95	61	30	31	
Barruecopardo	944	927	1595	1113	829	681	341	340	
Cabeza de Framontanos	725	718	629	351					
Cabeza de Caballo	931	886	1110	813	632	576	295	281	Fuentes de Masueco
Cerezal de Peñahorcada	538	463	460	334	211	163	84	79	
Trabanca	502	460	466	404	306	264	139	125	
Zarza de Pumareda	559	534	689	384	300	239	130	109	

^a Censo 1900, 1930, 1960, 1970¹⁶⁸.

^b Censo 1981¹⁶⁹.

^c Censo 1991 y relación de varones y mujeres¹⁷⁰.

Tabla 12. Población de la comarca de las Arribes (1996)

Municipios	Habitantes	Extensión km ²	Entidades Menores
Aldeadávila	2159	37,4	Corporario, Salto de Aldeadávila.
Hinojosa de Duero	901	92,6	
La Fregeneda	650	44,6	
Masueco	490	20	
Mieza	437	34	
Pereña	549	48,5	
Saucelle	533	46,5	Salto de Saucelle
Vilvestre	682	46,3	
Villarino	1261	41,3	Cabeza de Framontanos

¹⁶⁸ *Nomenclator de los Municipios de España*, págs. 3, 27, 39, 56, 195, 227.

¹⁶⁹ *Nomenclator Comercial Pueblos de España*, págs. 292-298.

¹⁷⁰ *Poblaciones de Derecho y Hecho de los Municipios Españoles. Censo de Población de 1991*, págs. 189-196.

4. GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

4.1. SISTEMA ABO

Bajo el nombre de grupos sanguíneos se entiende la presencia de determinados antígenos en los hematíes, leucocitos, plaquetas e incluso en el suero. Por tanto, se habla de grupos eritrocitarios, leucocitarios, plaquetarios y séricos, si bien, en la práctica, con el término de grupos sanguíneos nos referimos a los eritrocitarios, por ser los más importantes y conocidos desde más antiguo.

En la actualidad se conocen cerca de 400 marcadores antigénicos de los hematíes.

Los grupos sanguíneos se heredan según las leyes de Mendel y existen siempre en el individuo, no modificándose por la edad o las circunstancias ambientales (aunque si por algunas enfermedades). Teniendo en cuenta que actualmente se conocen ya numerosos sistemas de grupos sanguíneos, cada uno dotado de varios antígenos, resulta que las posibilidades de combinación en un individuo se multiplican casi hasta el infinito. Por tanto, el tipo sanguíneo constituye una característica muy peculiar de cada

persona, hecho bien aprovechado por las ciencias antropológicas y, sobre todo, por la Medicina Legal¹⁷¹.

Landois, en 1875, durante una transfusión sanguínea observó que se había producido una aglutinación de los eritrocitos del donante al entrar en contacto con el suero del receptor. A partir de ese momento este fenómeno de aglutinación fue descrito repetidamente, aceptándose como explicación del mismo la existencia en el individuo de ciertas enfermedades¹⁷².

Landsteiner, en 1901, señaló que también en las personas sanas, en ciertas circunstancias, el suero sanguíneo podía aglutinar los eritrocitos de otros individuos. Como resultado de sus estudios, clasificó a las personas en tres grupos que denominó A, B y C. Sus discípulos Decastello y Sturli hallaron un cuarto grupo de individuos cuyos eritrocitos eran aglutinados por el suero de los restantes grupos, pero cuyo suero no aglutinaba los eritrocitos de los otros grupos¹⁷³.

Posteriormente, Jansky y Moss realizaron la clasificación fisiológica de las personas en cuatro grupos denominados: I, II, III y IV¹⁷⁴.

¹⁷¹ ROZMAN, C., “Enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos. Hematología”. En: ROZMAN, C. (ed.), *Medicina Interna*, tomo II, págs. 369-370.

¹⁷² SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., “Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica”. En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, pág. 1.

¹⁷³ PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, pág. 9.

¹⁷⁴ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., “Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica”. En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, pág. 1.

La existencia de estas dos nomenclaturas daba lugar a frecuentes errores por lo que en 1928 se adoptó la nomenclatura propuesta por Hirszfelfd y Von Dungern en la cual el sistema ABO, basado en la reacción entre antígeno (eritrocitos) y anticuerpos (suero), se estableció según se indica en la tabla 13.

Tabla 13. Determinación de los grupos sanguíneos

Anticuerpos	GRUPOS SANGUÍNEOS			
	Antígenos			
	A	B	AB	O
anti A+B	+	+	+	-
anti B	-	+	+	-
anti A	+	-	+	-

De acuerdo con esta tabla, la determinación de los antígenos eritrocitarios y de los anticuerpos séricos permite el diagnóstico de los grupos sanguíneos.

Especial característica de este sistema es la presencia constante en el suero de anticuerpos o aglutininas frente al antígeno ausente. Esta relación recíproca se denomina ley de Landsteiner.

Respetando la compatibilidad ABO se hizo posible la transfusión sanguínea.

4.1.1. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA ABO

Los antígenos que están presentes en los eritrocitos y que determinan las especificidades A y B son glicolípidos solubles en alcohol. Su especificidad depende del ordenamiento estructural de ciertos azúcares en los componentes hidrocarbonados de las macromoléculas¹⁷⁵.

Existe una sustancia precursora básica formada por cuatro moléculas de tres azúcares diferentes: N-acetil-galactosamina (Gal Nac), D-galactosa (Gal) y N-acetil-glucosamina (Glc Nac).

La unión de otra fucosa al terminal D-galactosa (Gal), por la acción del gen H, confiere a la molécula resultante la especificidad H.

En presencia del gen A el azúcar N-acetil-galactosamina (Gal Nac) se une a la sustancia H y esta se transforma en sustancia A.

En caso de estar presente el gen B es la galactosa la que se une a la sustancia H para formar la sustancia B.

La especificidad A, B y H está pues determinada por unos azúcares específicos que se unen a la estructura del precursor. Estos enlaces tienen

¹⁷⁵ LACADENA, J. R., *Genética*, pág. 429.

lugar por la acción de las enzimas glucosiltransferasas que son productos de los genes A y B¹⁷⁶.

Las etapas de la formación de los antígeno A y B en la membrana eritrocitaria se resumen en la figura 9¹⁷⁷.

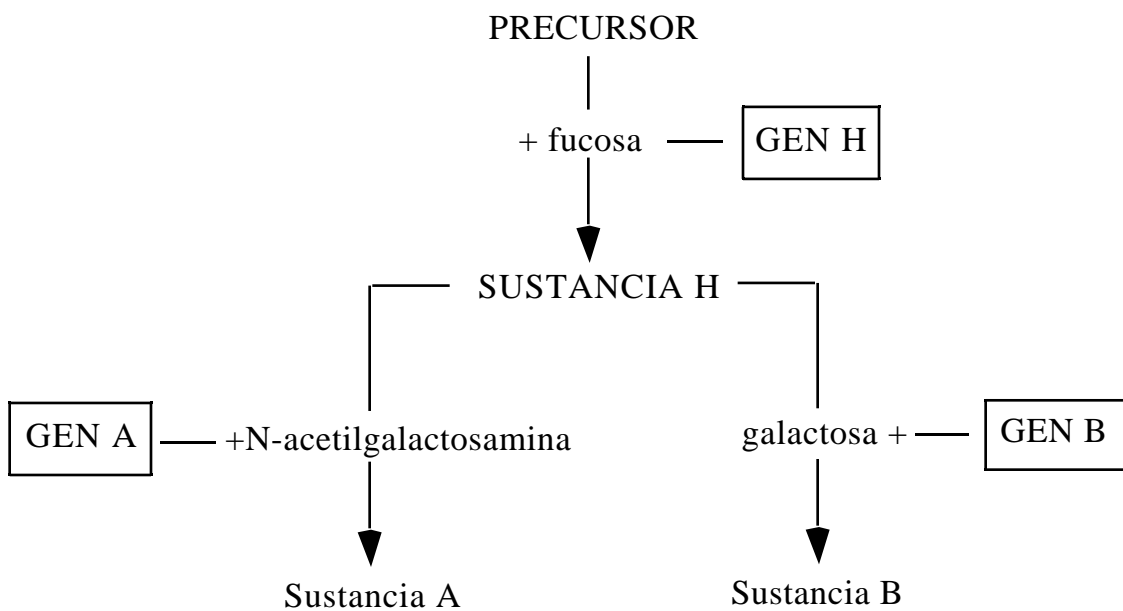


Figura 9. Fases de la síntesis de antígeno A y B en la membrana eritrocitaria

La génesis de los antígenos A y B parece tener lugar mucho antes del nacimiento. Después del nacimiento aumenta el contenido antigénico de los hematíes hasta que a la edad de tres años adquieren la máxima intensidad, que en la edad adulta empieza a decrecer. Asimismo, el antígeno H se halla ya desarrollado en el nacimiento.

¹⁷⁶ SEGALES, J. M., SAEZ, M., FRANCO, E., GRIFOLS, J., "Grupos sanguíneos. Inmunohematología". En: SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología Clínica*, págs. 94 y 95.

¹⁷⁷ RAPAPORT, S. I., *Introducción a la Hematología*, pág. 110.

La presencia del antígeno ABH no se limita a los hematíes humanos, sino que está presente en casi todos los tejidos, por ejemplo en la cornea, en la mucosa gastrointestinal y en cultivos celulares de hígado, riñón, pulmón, corazón y epidermis. También ha sido comprobado en tejidos de la población prehistórica de los guanches canarios así como en los huesos. Finalmente, los antígenos ABH existen en otros componentes celulares de la sangre, además de los hematíes. Se ha demostrado la existencia del antígeno ABH en los normoblastos, en los trombocitos y en los leucocitos. Además, se han encontrado también en los espermatozoides, en las células epidérmicas y epiteliales.

Los isoanticuerpos anti-A y anti-B por lo general se forman entre los tres y seis meses después del nacimiento; en la vejez se observa una disminución del título de anticuerpos.

No se conocen hechos evidentes en la génesis de los anticuerpos. El concepto de que los anticuerpos constituyen caracteres condicionados por los genes se enfrenta con la hipótesis relativa de que los anticuerpos aparecen en los primeros meses de la vida a consecuencia de la inmunización.

A favor de una regulación genética de los anticuerpos existe el hecho de que a menudo los gemelos univitelinos exhiben igual título de anticuerpos que los bivitelinos, observándose una tendencia a heredar el nivel de la titulación, así como la aparición intrafamiliar de otros anticuerpos.

Respecto al problema de la inmunización, la génesis de un anticuerpo específico puede estar determinada por un antígeno exógeno. Se desarrollan en la infancia por contacto con sustancias similares a los antígenos A y B, que se encuentran extensamente distribuidas en la naturaleza (plantas, animales y bacterias).

Las investigaciones sobre el tamaño molecular de los isoanticuerpos pertenecientes a las gammaglobulinas han puesto de manifiesto que los pesos moleculares de anti-B están vinculados al genotipo. Para una persona del tipo A_1O , el peso molecular es de 500.000, en los individuos del tipo A_1A_1 alrededor de 300.000 y en un sujeto del genotipo OO sólo 170.000.

Hasta el momento presente, no se ha descubierto ningún anticuerpo anti-O genuino con el que pueda demostrarse el producto génico r , en el sentido de Bernstein (véase: Genética del Sistema ABO).

4.1.2. FUNCION DEL SISTEMA ABO

La función biológica de los antígenos eritrocitarios se desconoce. Sin embargo la destacada importancia clínica que revisten los antígenos sanguíneos se debe a sus propiedades sensibilizantes y a la capacidad de reaccionar con sus correspondientes anticuerpos. Los anticuerpos del grupo ABO son isoanticuerpos, naturales, regulares, de clase Ig M y aglutinantes¹⁷⁸.

Los grupos sanguíneos tienen gran interés en Medicina Clínica debido a sus propiedades inmunológicas.

La transfusión sanguínea no fue un arma terapéutica eficaz hasta el descubrimiento del sistema ABO y se hizo más segura con el descubrimiento, en 1940, del sistema Rh, y el conocimiento de los efectos del anticuerpo Rh₀ (anti D), causa de enfermedad hemolítica en el feto y reacción transfusional en la madre¹⁷⁹.

La práctica de transfusiones seguras prohíbe la transfusión de sangre A, B y AB a pacientes cuyos hematíes carezcan de los correspondientes antígenos, ya que el plasma del receptor contiene anticuerpos incompatibles.

¹⁷⁸ SEGALES, J. M., SAEZ, M., FRANCO, E., GRIFOLS, J., “Grupos sanguíneos. Inmunohematología”. En: SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología Clínica*, pág. 92.

¹⁷⁹ MORALEDA, J. M., CORRAL, M., “Grupos sanguíneos. Anemias hemolíticas por aloanticuerpos. Enfermedad hemolítica del recién nacido”. En: MORALEDA JIMENEZ, J. M. (ed.), *Hematología*, pág. 132.

4.1.3. GENETICA DEL SISTEMA ABO

La demostración de la heredibilidad de los grupos ABO y formulación de una hipótesis sobre su transmisión hereditaria se debe a Von Dungern y Hirschfeld, que sostuvieron la existencia de dos pares de genes independientes entre sí, genes A y B, que se comportaban de modo dominante frente a los genes a (“no-A”) y b (“no-B”). Según su hipótesis un progenitor con dotación Aa Bb (fenotipo AB) puede tener hijos con el genotipo aa bb, es decir del fenotipo O. Los casos insólitos observados por esos autores de niños O descendientes de un progenitor AB actualmente se consideran determinaciones erróneas o signos de ilegitimidad¹⁸⁰.

Bernstein, en el año 1924, logró aclarar totalmente la herencia de los grupos ABO. Señaló que, según la hipótesis de dos pares de genes, las diferencias entre los valores observados y los valores esperados, en una comunidad, eran tan elevadas que no podían explicarse por desviaciones debidas al azar. En cambio se observó que estas desviaciones eran bien explicadas por la hipótesis de Bernstein. Para este autor existen tres genes, que denomina p (para el A), q (para el B) y r (para el O), que dirigen la herencia de los grupos sanguíneos según un modelo de alelos múltiples (tabla

¹⁸⁰ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., “Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica”. En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, pág. 2.

14)¹⁸¹. La diferencia entre la teoría de los dos pares de genes y la de los alelos múltiples de Bernstein estriba en que según esta última, admitida en la actualidad, un progenitor AB no puede tener hijos O¹⁸².

Tabla 14. Expresión fenotípica de los genotipos del sistema ABO

Fenotipos	Genotipos
O	OO (rr)
A	AA (pp) AO (pr)
B	BB (qq) BO (qr)
AB	AB (pq)

Hirschfeld y Von Dungern, en 1911, informaron que después de la absorción de un suero anti-A por los eritrocitos A de determinadas sangres, todavía quedaba un resto de anticuerpos que podía aglutinar los eritrocitos A de otro grupo de personas, pero no absorbían los eritrocitos A ya utilizados. Esto condujo a pensar en la posible existencia de un segundo tipo de anticuerpos. Esta hipótesis también fue mantenida por Landsteiner y Witt en 1926. Otros investigadores observaron una mayor capacidad de fijación y menor aglutinación, diferenciándose un grupo A “grande o fuerte” de un

¹⁸¹ PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, págs. 12-13.

¹⁸² SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., “Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica”. En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, pág. 2.

grupo A “pequeño o débil”. Estos grupos fueron denominados A_1 y A_2 por Landsteiner y Witt¹⁸³. Pero el estado conceptual actual de los subgrupos A ha podido ir aclarándose por numerosos y diferentes caminos, sabiéndose hoy que la diferencia entre el grupo A_1 y el A_2 no se debe sólo a una cuestión de cantidad de A, sino también de calidad¹⁸⁴.

Los mecanismos de la herencia de los subgrupos A_1 y A_2 fueron establecidos mediante las investigaciones de Thomse, Friedenreich y Worsaae en 1930, siendo admitidos dos genes alelomorfos, uno para el desarrollo de A_1 y otro para el desarrollo de A_2 . El gen A_1 dominaría sobre A_2 y A_2 sobre O, pudiendo combinarse A_2 y B, así como A_1 y B¹⁸⁵. Según esto, el sistema genético estaría formado por cuatro alelos múltiples: A_1 , A_2 , B y O, resultando las siguientes correspondencias genotipo-fenotipo expresadas en la tabla 15¹⁸⁶.

Además de las variantes mencionadas del grupo A, se han descrito otras variantes menos frecuentes A_0 , A_z , A_x , A_m , A_{end} , A_{el} , A_3 , A_4 , A_5 , A_6, \dots ¹⁸⁷.

¹⁸³ *Op. cit.*, págs. 2-3.

¹⁸⁴ PROKOP, O, *Los grupos sanguíneos humanos*, pág. 15.

¹⁸⁵ *Op. cit.*, págs. 15-16

¹⁸⁶ LACADENA, J. R., *Genética*, pág. 430.

¹⁸⁷ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., “Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica”. En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, págs. 3-5.

También para el antígeno B se han encontrado distintos grados de expresividad. Moskow, en 1935, los subdividió en los grupos B_1 y B_2 . Posteriormente se han descrito las variantes B_3 , B_x , B_w , B_m ...¹⁸⁸.

Todas estas variantes se pueden diferenciar serológicamente.

Tabla 15. Correspondencias genotipo-fenotipo en los grupos ABO

Fenotipo	Genotipo
A_1	A_1A_1, A_1A_2, A_1O
A_2	A_2A_2, A_2O
B	BB, BO
A_1B	A_1B
A_2B	A_2B
O	OO

Sistema Hh. Fenotipo Bombay (Oh)

Para que puedan expresarse los genes A y B debe existir otro gen llamado H. Está situado en un locus aparte de los anteriores y define el sistema de grupo sanguíneo Hh.

¹⁸⁸ *Op. cit.*, págs. 7-8.

Se admite la existencia de una sustancia precursora sobre la que actuaría el gen H para convertirla en sustancia H.

Esta sustancia H en presencia de los genes A y/o B, se transforma en sustancia A y/o B. El gen O no transforma la sustancia H y por tanto en los hematíes del grupo O esta sustancia está ampliamente representada (fig. 9).

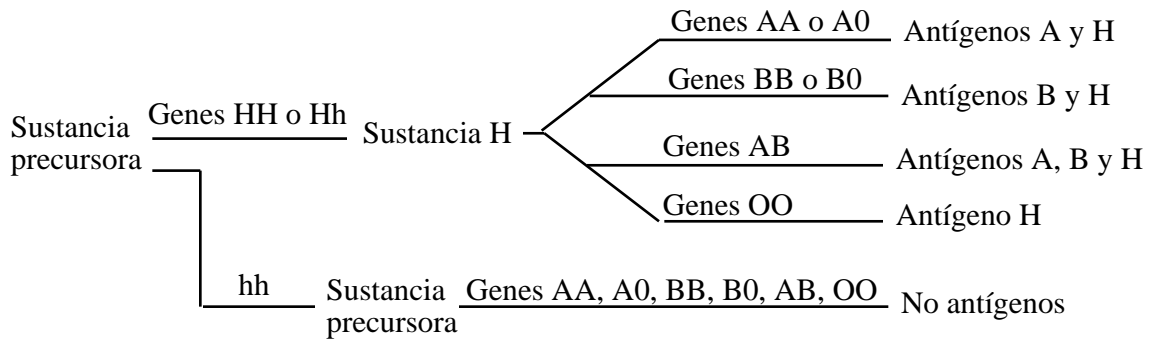


Fig. 9. Desarrollo de la expresión de los genes ABH

La cantidad de sustancia H presente en los hematíes depende del grupo sanguíneo a que pertenezcan y varía según el siguiente orden:

$$O > A_2 > A_2B > B > A_1 > A_1B$$

Cuando los hematíes tienen poca sustancia H como en los grupos A y AB, se puede detectar en el suero la presencia de anticuerpos anti-H. Esta situación se produce de forma natural sin que exista estimulación antigénica conocida. Estos anticuerpos actúan a baja temperatura y no suelen tener significación clínica.

El gen H puede encontrarse en forma homocigota (HH) o heterocigota (Hh). Como el gen H es amorfo, la situación Hh no puede identificarse.

El fenotipo h (hh) se denomina Bombay y es extremadamente raro. Fue descrito por primera vez por Bhende en 1952. Los individuos que poseen este fenotipo carecen del gen H y por lo tanto no pueden producir sustancias A o B aunque hayan heredado dichos genes.

Al investigar el grupo en individuos Bombay, se muestran como O y en su suero se detectan anti-A, anti B y anti H, mientras que en un grupo O normal sólo se detecta anti-A y anti B.

Estos anticuerpos anti-H tienen significación clínica y por ello los individuos Bombay sólo deben ser transfundidos con sangre procedente de otro individuo Bombay¹⁸⁹.

El gen secretor

El 80% de los individuos de la raza blanca heredan un gen Se que controla la presencia en plasma, saliva y otras secreciones, de los antígenos A, B y H. Se trata de glucoproteínas con propiedades antigénicas ABO. Estos antígenos son hidrosolubles. Los individuos que los contienen se les llama

¹⁸⁹ SEGALES, J. M., SAEZ, M., FRANCO, E., GRIFOLS, J., "Grupos sanguíneos. Inmunohematología". En: SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología Clínica*, pág. 94.

secretores (genotipo SeSe o Sese). El 20% restante no heredan el gen Se (genotipo sese) y son no secretores.

En los individuos secretores del grupo O se comprobó que sus secreciones contenían una sustancia neutralizadora de dichos anticuerpos. Además, los individuos de los grupos sanguíneos A, B o AB que son secretores poseen asimismo esta sustancia en sus secreciones, aunque en cantidades menores. Como quiera que un individuo con sangre de tipo AB no puede poseer un gen O, es evidente que esta sustancia neutralizadora no requiere el producto de un gen O para su formación. Por consiguiente, no se la denominó sustancia O, sino sustancia H.

El locus génico secretor es independiente de los locus ABO y Hh y está situado en el mismo cromosoma que contiene los genes del sistema Lutheran.

Para determinar si un individuo es o no secretor se procede a buscar los antígenos A, B, y H en su saliva. Estas técnicas pueden resultar imprescindibles cuando la determinación del grupo ABO en sangre no es concluyente (variantes débiles, etc.)¹⁹⁰.

¹⁹⁰ *Op. cit.*, pág. 95.

Por tanto puede afirmarse lo siguiente:

- La producción de sustancia H exige un gen denominado gen H (el alelo inactivo es el gen h).

- La secreción de sustancia H hacia los líquidos orgánicos requiere el gen Se (el alelo inactivo es el gen se).

- La conversión de la sustancia H en los antígenos A o B necesita la presencia de un gen A o B (el alelo inactivo es el gen O).

Los genes de los alelos del sistema ABO se localizan en el brazo largo del cromosoma 9. Los loci del gen H y de los genes ABO no están genéticamente enlazados, pero son sistemas genéticos relacionados¹⁹¹.

¹⁹¹ RAPAPORT, S. I., *Introducción a la hematología*, pág. 109.

4.1.4. EL SISTEMA ABO EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

La determinación de la paternidad constituye una de las aplicaciones más conocidas y difundidas de la genética de los grupos ABO.

El sistema ABO, tal como se ha expuesto anteriormente, está dividido en subgrupos. Los más importantes son los que se han establecido en el grupo A y que comprende los subgrupos A_1 y A_2 , con la correspondiente separación de AB en A_1B y A_2B . Cerca del 85% de las sangres del grupo A son A_1 . Las otras variantes tanto del grupo A como del grupo B son raras¹⁹².

En la determinación de paternidad el sistema ABO se considera como un sistema de cuatro alelos A_1 , A_2 , B y O que determinan seis fenotipos A_1 , A_2 , B, A_1B , A_2B y O, y diez genotipos A_1A_1 , A_1O , A_1A_2 , A_2A_2 , A_2O , BB, BO, A_1B , A_2B y OO.

A pesar de que el número de alelos y genotipos es importante, el hecho de que el alelo O se comporte como recesivo delante de los otros tres y que el alelo A_1 enmascare al A_2 nos deja con sólo seis fenotipos que en tres casos coinciden con el genotipo: OO, A_1B y A_2B . Además, los A_1B y

¹⁹² THOMPSON, J. S., THOMPSON, M. W., *Genética Médica*, pág. 215.

A_2B son poco frecuentes. Estos hechos hacen que el sistema sea poco informativo y tenga una probabilidad de exclusión mucho menor a la que cabría esperar si los cuatro alelos fueran codominantes.

Esta probabilidad de exclusión varía según las frecuencias poblacionales de los alelos, oscilando entre el 8 y el 15%. El alelo más frecuente es el O seguido del A_1 . Menos frecuentes son el A_2 y el B. En la tabla 16 se muestra la frecuencia de estos cuatro alelos para distintas poblaciones españolas¹⁹³.

Por la recisividad del alelo O los fenotipos A y O están muy igualados y en algunas poblaciones el fenotipo A supera al O. En Barcelona el valor Essen-Moller aproximado del sistema ABO es de 9,82.

En general, es un sistema seguro, de buena expresión y con una determinación fácil y rápida. Las silencias descritas, de existir, son detectables por estudios familiares¹⁹⁴.

¹⁹³ CASTELLANO ARROYO, M., MARTINEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético-moleculares en población española*, pág. 23.

¹⁹⁴ HUGUET RAMIA, E., GENE BADIA, M., “Marcadores genéticos eritrocitarios”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 82-83.

Tabla 16. Frecuencia de los alelos del sistema ABO en población española

POBLACION	FRECUENCIAS GENICAS				MUESTRA (n)
	A ₁	A ₂	B	O	
<i>Andalucía</i>					
Andaluces	0,2020	0,0572	0,0715	0,6693	400
<i>Aragón</i>					
Aragoneses	0,2262	0,0265	0,0608	0,6865	400
<i>Cantabria</i>					
Residentes	0,2381	0,0399	0,0522	0,6696	777
Autóctona	0,2326	0,0530	0,0441	0,6701	395
<i>Castilla</i>					
León	0,3773	0,0165	0,0677	0,5386	200
Astorga (Maragatos)	0,3983	0,0253	0,0252	0,5512	300
<i>Cataluña</i>					
Barcelona	0,2549	0,0471	0,0569	0,6431	404
<i>Galicia</i>					
Gallegos (a)	0,2514	0,0618	0,0598	0,6241	439
Gallegos (b)	0,2542	0,0654	0,0477	0,6327	97
Gallegos (c)	0,2765	0,0212	0,0384	0,6638	400
Gallegos (d)	0,2719	0,0554	0,0620	0,6107	400

(a), (b), (c) y (d) son distintas poblaciones gallegas

4.2. SISTEMA Rh

Landsteiner y Wiener, en 1940, culminan el descubrimiento del sistema Rh, en el que también colaboraron los trabajos de Levine y Stetson en 1939. El descubrimiento consistió en inmunizar conejos y cobayas con hematíes de monos *Macacus Rhesus*, observando que los anticuerpos resultantes no sólo aglutinaban los eritrocitos de los monos sino también el 85 % de los hematíes de humanos de raza blanca. De ahí el nombre del sistema (Rh) y que el 85 % de los individuos fueran denominados Rhesus positivos (Rh +) y el 15 % restante Rhesus negativos (Rh -).

Los estudios posteriores pusieron de manifiesto que el sistema era mucho más complejo, ya que en 1941 y en 1946 Fisher propuso la actual nomenclatura de tres pares de alelos C/c, D/d, E/e, definible por los correspondientes antisueros. El descubierto por Landsteiner y Wiener era el anti-D, que es el principal.

Mourant, en 1945, había descubierto el suero anti-e, que es el último que validaba la hipótesis ya que el suero anti-d no ha podido ser descrito y lamentablemente no se puede evidenciar un individuo de genotipo Dd,

persistiendo la clasificación inicial de positivos y negativos respecto al alelo D: positivos los genotipos DD - Dd y negativo el genotipo dd.

4.2.1. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA Rh

Los determinantes antigénicos Rh dependen de interacciones poco conocidas entre una proteína hidrófoba de 30 a 32 kDa de la membrana de los hematíes y la adición postraducción de moléculas de fosfolípidos¹⁹⁵. En la actualidad se han descrito alrededor de 48 antígenos diferentes.

Su presencia o ausencia en el hematíe está determinada por genes.

4.2.2. FUNCION DEL SISTEMA Rh

Uno de los aspectos más interesantes de este sistema ha sido el descubrimiento de fenotipos con deleciones (deprimidos o silenciosos). Han contribuido a demostrar que el antígeno Rh es necesario para mantener la integridad de la membrana celular¹⁹⁶. La ausencia de antígenos del sistema

¹⁹⁵ KLEIN, H. G., "Grupos sanguíneos y transfusión de sangre". En: HARRISON, *Principios de Medicina Interna*, pág. 2060.

¹⁹⁶ SEGALES, J. M., SAEZ, M., FRANCO, E., GRIFOLS, J., "Grupos sanguíneos. Inmunohematología". En: SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología Clínica*, pág. 98.

Rh ocasiona la enfermedad del Rh nulo, que cursa además con anemia hemolítica estomatocítica.

Los anticuerpos del sistema Rh y, sobre todo, los anti-D, tienen gran importancia transfusional. En general son inmunes y de clase IgG. Se calcula que el 50 % de los individuos dd pueden desarrollar un anti-D a partir de la primera transfusión con sangre Rh (D)-positiva. También es el antígeno que ha causado mayor número de incompatibilidades en la enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), hasta la aparición de la inmunoglobulina específica que permite prevenir la formación de estos anticuerpos. Los otros antígenos del sistema Rh son menos inmunogénicos y carecen de interés transfusional, excepto cuando está presente el anticuerpo. Los anticuerpos del sistema Rh tienen relación con la anemia hemolítica autoinmune (AHA), ya que en los de tipo IgG la especificidad de los autoanticuerpos suele ser anti-Rh¹⁹⁷.

¹⁹⁷ MARTIN VEGA, C., “Grupos sanguíneos. Inmunohematología”. En: FARRERAS-ROZMAN, *Medicina Interna*, vol. II, pág. 1807.

4.2.3. GENETICA DEL SISTEMA Rh

Los genes del sistema Rh se hallan en el brazo corto del cromosoma 1¹⁹⁸.

Para describir el sistema Rh se emplean tres nomenclaturas, basadas en diferentes concepciones genéticas, sin que exista un acuerdo internacional claramente definido a favor de una de ellas.

Fisher y Race denominaron a los seis antígenos principales: D (Rh original), C, E, c, e, d. Su forma de concebir los fenotipos Rhesus se basa en la noción de haplotipos representados por tres letras (DCe, dce, DcE, dCE,.....) que definen la presencia de los antígenos correspondientes a nivel de la membrana eritrocitaria.

En el modelo de Wiener existe un único gen con múltiples formas alélicas, pero las seis más frecuentes son: R^1 , R^2 , R^0 , r , r' , r'' . La letra mayúscula R define la positividad Rh y la negatividad se expresa con r minúscula (fig. 10).

¹⁹⁸ RUDDLE, F., RICCIUTI, F., MCMORRIS, F. A., TISCHFIELD, J., CREAGAN, R., DARLINGTON, G., CHEN, T., "Somatic cell genetic assignment of peptidase C and the Rh linkage group to chromosome A-1 in man", *Science*, vol. 176, págs. 1429-1431, MARSH, W. L., CHAGANTI, R. S. K., GARDNER, F. H., MAYER, K., NOWELL., P. C., GERMAN, J., "Mapping Human autosomes: evidence supporting assignment of Rhesus to the short arm of chromosome No. 1", *Science*, vol. 183, págs. 966-968.

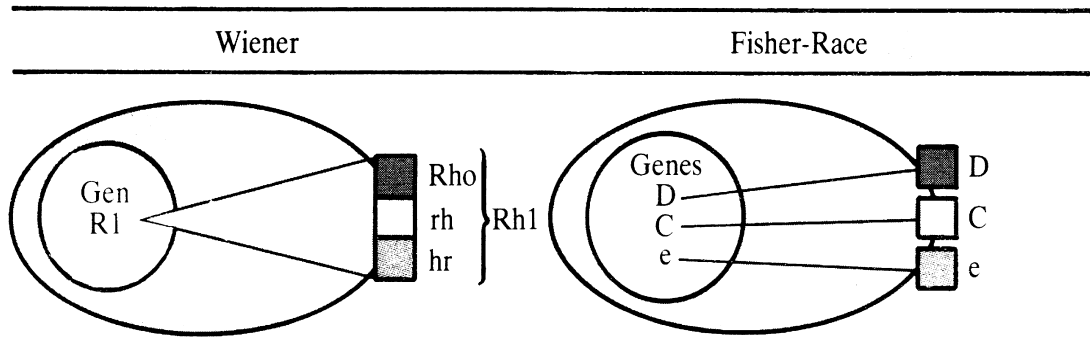


Fig. 10. Teoría de los alelos múltiples de Wiener y teoría de los genes ligados de Fisher-Race

Rosenfield los expresa con un número determinado RH 1, 2, 3, 4,..... Su ausencia se expresa por una cifra idéntica, precedida del signo (-).

En la tabla 17 aparece un resumen comparativo de las denominaciones Fisher-Race y Wiener para el sistema Rh.

La teoría de Fischer parece la más improbable porque sugiere un sistema genético muy complejo, pero es muy didáctica y de fácil comprensión, utilizándose habitualmente en la escritura ordinaria.

Los postulados de Wiener cuentan con más adictos y estudios familiares parecen confirmarlos, pero la nomenclatura utilizada es muy complicada.

Tabla 17. Comparación de las denominaciones Fisher-Race y Wiener para el sistema Rh

Denominaciones Fisher-Race		Denominaciones Wiener		
Complejo Genético	Antígenos	Genes	Aglutinogenos	Factores
Dce	D, c, e	R ⁰	Rh ₀	Rh ₀ , hr', hr''
DCE	D, C, e	R ¹	Rh ₁	Rh ₀ , rh', hr''
DcE	D, c, E	R ²	Rh ₂	Rh ₀ , hr', rh''
DCE	D, C, E	R ^z	Rh _z	Rh ₀ , rh, rh''
dce	c, e	r	rh	hr', hr''
dCe	C, e	r'	rh'	rh', hr''
dcE	c, E	r''	rh''	hr', rh''
dCE	C, E	r ^y	rh _y	rh', rh''

4.2.4. EL SISTEMA Rh EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

El sistema Rh es el primero en eficiencia bioestadística ya que su valor Essen-Möller es el más bajo de todos (9,72).

Considerando tres locus genéticos y un par de alelos en cada locus resulta que pueden formarse ocho tripletas distintas que darán lugar a 36 genotipos distintos. La no determinación de los heterocigotos Dd reduce los fenotipos a 18 (tabla 18).

La existencia de alelos Du y Cw, poco frecuentes, pero que deben tenerse en cuenta, hace que en caso de exclusión en los loci C o D, deban descartarse las posibilidades de que se trate de uno de estos alelos¹⁹⁹.

Tabla 18. Expresión de tripletas, fenotipos y genotipos del sistema Rh

Tripletas	Fenotipos	Genotipos	
CDE	CCDEE	CDE/CDE	CdE/cDe
CDe	CCDEe	CDE/CDe	CdE/cdE
CdE	CCDee	CDE/CdE	CdE/cde
Cde	CcDEE	CDE/Cde	Cde/Cde
cDE	CcDEe	CDE/cDE	Cde/cdE
cDe	CcDee	CDE/cDe	Cde/cDe
cdE	ccDEE	CDE/cdE	Cde/cdE
cde	ccDEe	CDE/cde	Cde/cde
	ccDee	CDe/CDe	cDE/cDE
	CCdEE	CDe/CdE	cDE/cDe
	CCdEe	CDe/Cde	cDE/cdE
	CCdee	CDe/cDE	cDE/cde
	CcdEE	CDe/cDe	cDe/cDe
	CcdEe	CDe/cdE	cDe/cdE
	Ccdee	CDe/cde	cDe/cde
	ccdEE	CdE/CdE	cdE/cdE
	ccdEe	CdE/Cde	cdE/cde
	ccdee	CdE/cDE	cde/cde

¹⁹⁹ HUGUET RAMIA, E., GENE BADIA, M., “Marcadores genéticos eritrocitarios”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, págs. 84-85.

En la tabla 19 se recogen las frecuencias génicas en población española para este sistema Rh²⁰⁰.

Tabla 19. Frecuencia de los alelos del sistema Rh en población española

POBLACION	FRECUENCIAS GENICAS								MUESTRA
	CDE	CDe	CdE	Cde	cDE	cDe	cdE	cde	(n)
<i>Andalucía</i>									
Andaluces	0,0133	0,4242	0,0000	0,0253	0,1171	0,0380	0,0000	0,3821	400
Cádiz	0,0163	0,3911	0,0004	0,0601	0,1200	0,0606	0,0102	0,3413	542
<i>Aragón</i>									
Aragoneses (a)	0,0122	0,4407	0,0000	0,0336	0,1048	0,0318	0,0058	0,3711	400
Aragoneses (b)	0,0000	0,4260	0,0000	0,0000	0,0825	0,0110	0,0000	0,4802	8706
Zaragoza	0,0000	0,4188	0,0000	0,0000	0,1147	0,0161	0,0000	0,4502	2949
<i>Cantabria</i>									
Residentes	0,0033	0,3869	0,0000	0,0056	0,1038	0,0179	0,0033	0,4724	715
Autóctona	0,0063	0,3841	0,0000	0,0049	0,1068	0,0179	0,0019	0,4863	371
<i>Cataluña</i>									
Barcelona (a)	0,0047	0,4339	0,0035	0,0000	0,1365	0,0484	0,0038	0,3759	406
Barcelona (b)	0,0037	0,4898	0,0000	0,0000	0,1178	0,0064	0,0048	0,3775	223
Catalanes	0,0137	0,3845	0,0000	0,0208	0,1430	0,0509	0,0032	0,3839	400
<i>Galicia</i>									
Gallegos (a)	0,0052	0,4625	0,0122	0,0000	0,1240	0,0392	0,0023	0,3545	604
Gallegos (b)	0,0059	0,4322	0,0000	0,0059	0,1272	0,0397	0,0640	0,3827	400

(a) y (b) son distintas poblaciones estudiadas en la misma zona geográfica

²⁰⁰ CASTELLANO ARROYO, M., MARTINEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético-moleculares en población española*, pág. 24.

4.3. SISTEMA MNSs

En un principio se definió como un sistema dialéctico formado por M y N, cuyos genes se heredan de forma codominante y dan lugar a tres posibles genotipos MM, MN y NN. Estudios genéticos posteriores añadieron a este sistema otro locus y dos alelos nuevos S y s, íntimamente relacionados con los anteriores.

Landsteiner y Levine, en 1927, trabajando con sueros antihumanos, observaron que algunos de estos sueros, después de ser absorbidos con sangre de un dador determinado contenían aún un anticuerpo, el cual, siendo independiente y distinto de los del grupo ABO, aglutinaba determinadas muestras de sangre humana. Así, fue identificada una nueva cualidad de los hematíes humanos, a la que denominaron M. Algunos antisueros, después de la absorción con hematíes M, aún revelaron una cualidad inédita de los eritrocitos, a la que llamaron N²⁰¹.

²⁰¹ PROKOP, O, *Los grupos sanguíneos humanos*, pág. 38. SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica". En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, pág. 29.

Walsh y Montgomery, en 1947, descubrieron un anticuerpo que tenía características suficientes para causar la subdivisión de los grupos humanos MN. Con este anticuerpo denominado anti-S se pudo identificar el antígeno S, quedando ampliado así el sistema MN²⁰².

Las relaciones de anti-S con el sistema MN fueron confirmadas matemáticamente. El carácter S, por otra parte, no tenía relación alguna con los demás grupos sanguíneos. Las correlaciones existentes se explicaron admitiendo cuatro alelos en el locus MN: M, MS, N y NS, de los que S sería el resultado de una mutación en el locus MN. Mediante numerosos estudios familiares fue determinada la herencia de S. Posteriormente Levine, en 1951, descubrió el anticuerpo anti-no S (anti-s)²⁰³.

4.3.1. CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA MNS_s

Los antígenos M, N, S y s se encuentran ya diferenciados en el organismo fetal. En cuanto a la presencia de los antígenos M y N fuera de

²⁰² SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., “Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica”. En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, pág. 32.

²⁰³ PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, pág. 45.

los hematíes, algunos autores han hallado estos mismos factores en el hígado, riñones, bazo y otros tejidos²⁰⁴.

Los antígenos MN se hallan en una sialoglucoproteína, la glicoforina A, y los determinantes Ss y U en la glicoforina B de la membrana del hematíe. Estos antígenos son desnaturalizados por tratamiento enzimático.

Los precursores bioquímicos de los antígenos M y N son los antígenos Tn y T. En una primera etapa se forma la estructura Tn, que pasa a ser sustrato sobre el que actúa la enzima T y lo transforma en estructura T. La ausencia o inoperancia de esta enzima da lugar a la poliaglutinabilidad Tn, pues el sustrato queda al descubierto. Las últimas etapas que partiendo de T conducen a la formación de N y posteriormente M no están todavía esclarecidas²⁰⁵.

Los anticuerpos de este sistema se obtienen a partir de la inmunización de conejos, y también se han descrito anti-M, anti-N y anti-S en humanos, apareciendo de modo espontáneo o después de inmunizaciones²⁰⁶.

²⁰⁴ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica". En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, págs. 38-39.

²⁰⁵ SEGALÉS, J.M., SAEZ, M., FRANCO, E., GRIFOLS, J., "Grupos sanguíneos. Inmunohematología". En: SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología clínica*, págs. 90-112.

²⁰⁶ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica". En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, págs. 39-41.

El anti-N es un anticuerpo aún más raro que el anti-M y se encuentra casi exclusivamente en individuos S-s- que sean U-.

El anti-S es de tipo IgG o IgM, en cambio el anti-s y anti-U normalmente son de tipo IgG²⁰⁷.

4.3.2. FUNCION DEL SISTEMA MNSs

Los anticuerpos del sistema MNSs presentan fuerte efecto de dosis, aunque anti-M y anti-N no son importantes desde el punto de vista transfusional por su bajo poder inmunógeno.

El anti-M natural (IgM) no presenta interés transfusional, en cambio el inmune (IgG) lo posee debido a las características propias de este tipo de anticuerpos.

Estos anticuerpos pueden estar implicados en reacciones transfusionales y en la enfermedad hemolítica del recién nacido.

²⁰⁷ SEGALES, J.M., SAEZ, M., FRANCO, E., GRIFOLS, J., “Grupos sanguíneos. Inmunohematología”. En: SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología clínica*, págs. 90-112.

4.3.3. GENETICA DEL SISTEMA MNSs

Landsteiner y Levine interpretaron el comportamiento hereditario de los factores M y N, realizando un estudio en familias, y consideraron la existencia de dos genes alelos codominantes entre sí, de modo que al fenotipo M correspondería el genotipo MM, al fenotipo N correspondería el genotipo NN y al fenotipo heterocigótico MN correspondería el genotipo MN²⁰⁸.

Estudios posteriores confirmaron la hipótesis hereditaria establecida²⁰⁹.

Respecto a la interdependencia de los factores MN con los factores S y s, se presentaron varias hipótesis genéticas. Una primera hipótesis sostenía la existencia de dos pares de genes autosómicos, el M, N y el S, s ocupantes de lugares vecinos en el mismo cromosoma. En cada uno de estos pares de alelos la pareja de un par cromosómico homólogo se manifiesta con función combinante. Al realizar las pruebas con los sueros anti-M, anti-N, anti-S y anti-s pueden ocurrir los casos expuestos en la tabla 20.

²⁰⁸ PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, pág. 39.

²⁰⁹ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica". En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, pág. 29.

Una segunda hipótesis defendía el concepto de alelia múltiple aceptando cuatro alelos múltiples (L^s , L , l^s y l); cada alelo dirigiría la síntesis de un aglutinógeno (MS , Ms , NS y Ns) y cada aglutinógeno se compondría de dos factores²¹⁰.

Tabla 20. Expresión de los fenotipos y genotipos MNSs

anti-M	anti-N	anti-S	anti-s	Genotipo	Fenotipo
+	-	+	-	MS/MS	MS
+	-	+	+	MS/Ms	MS
+	-	-	+	Ms/Ms	Ms
+	+	+	-	MS/NS	MNS
+	+	+	+	MS/Ns o Ms/NS	MNSs
+	+	-	+	Ms/Ns	MNs
-	+	+	-	NS/NS	NS
-	+	+	+	NS/Ns	NSs
-	+	-	+	Ns/Ns	Ns

Ambas hipótesis se distinguen entre sí por la posibilidad o imposibilidad de un intercambio de factores.

²¹⁰ PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, págs. 46-48. SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica". En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, págs. 32-33.

Wiener y cols., en 1953, encontraron un nuevo anticuerpo anti-U. Estudios posteriores demostraron que pertenecía al sistema Ss y que se trataba no de una combinación de anti-S y anti-s, sino de un anticuerpo único con especificidad anti-Ss. Se aceptó que en el locus S existe otro alelo denominado S^u que aparece sólo en la raza negra²¹¹.

Otros antígenos

Pertenecientes al sistema MNSs existen otros caracteres raciales. Se trata de los caracteres Henshaw y Hunter. El antígeno Hu (Hunter) fue descubierto en 1934 por Landsteiner y cols. Estos autores al inmunizar un conejo con sangre de una persona de raza negra, obtuvieron un antisuero que parecía presentar las características de anti-N, por dar reacciones positivas con los eritrocitos de los tipos N y MN, pero sólo en individuos de raza negra. Comprobaciones posteriores demostraron que este factor se halla asociado casi siempre a Ns y raramente a NS.

²¹¹ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica". En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, págs. 33-34.

Ikin y Mourant, en 1951, inmunizaron conejos con sangre de una persona de raza negra y obtuvieron un antisuero que no podía corresponder a anti-Hu. El carácter que se ponía de manifiesto con dicho antisuero fue denominado He (Henshaw). Este factor va unido casi siempre a NS²¹².

Se han descrito otros antígenos asociados al sistema MNSs: Mg, Su, Mi^a, Vw, Mu, Vr, St^a, Ri^a, Cl^a, Ny^a, Sul, Ve, M^v, etc²¹³.

Dado que existe una transmisión genética muy estrecha entre los antígenos MN y Ss, se los considera como un solo sistema con dos loci genéticos el MN y el Ss con un par de alelos cada uno. Deben estar muy próximos ya que la probabilidad de recombinación es prácticamente nula. Los dos alelos de cada locus hacen que cada individuo tenga cuatro alelos, lo que da un total de nueve fenotipos y diez genotipos. Estos loci se localizan en el cromosoma 4.

²¹² PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, pág. 48.

²¹³ SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica". En: BECKER P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 4, págs. 34-37. PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, pág. 49.

4.3.4. EL SISTEMA MNSs EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

Es sin discusión el mejor sistema de marcadores eritrocitarios ya que es el de más probabilidad de exclusión “a priori”, por ser un sistema muy informativo al ser sus alelos codominantes.

El sistema MNS proporciona un importante servicio en la investigación de la exclusión de paternidad, a condición de explorar seriamente toda probabilidad de interferencia de un antígeno raro, en el caso donde la exclusión se derive de la aplicación de la regla de los homocigotos²¹⁴.

Su probabilidad de exclusión supera el 30% y su valor Essen-Moller es de 9,76²¹⁵.

En la tabla 21 se recogen las frecuencias génicas en población española para este sistema MNSs²¹⁶.

²¹⁴ SALMON, CH., SALMON, D., MULLER, J. Y., SEGER, J., “Groupes sanguins, groupes de protéines et groupes tissulaires dans le recherche de paternité”. En: DEROBERT, L., *Medecine Legale*, págs. 760-761.

²¹⁵ HUGUET RAMIA, E., GENE BADIA, M., “Marcadores genéticos eritrocitarios”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 83.

²¹⁶ CASTELLANO ARROYO, M., MARTÍNEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético-moleculares en población española*, pág. 28.

Tabla 21. Frecuencia de los alelos del sistema MNSs en población española

POBLACION	FRECUENCIAS GENICAS				MUESTRA
	MS	Ms	NS	Ns	(n)
<i>Cantabria</i>					
Residentes	0,2479	0,2752	0,0893	0,3857	500
Autóctona	0,2546	0,2729	0,0899	0,3776	252
<i>Cataluña</i>					
Barcelona (a)	0,2766	0,3033	0,0893	0,3308	388
Barcelona (b)	0,2491	0,2801	0,0900	0,3808	907
<i>Galicia</i>					
Gallegos	0,2459	0,2647	0,0699	0,4195	455
Lugo	0,2427	0,3107	0,0575	0,3891	76

(a) y (b) son distintas poblaciones estudiadas en Barcelona

4.4. SISTEMA Gc

La proteína Gc, también llamada componente específico de grupo, fue descubierta en el año 1959 por Hirschfeld. Puso de manifiesto, en el suero de individuos sanos tratados mediante técnicas inmunolectroforéticas en gel de agar, diferencias cualitativas en la región de las γ_2 -globulinas.

Los patrones electroforéticos obtenidos fueron clasificados, inicialmente, en tres grupos llamados “1”, “2” y “3”. Los tres arcos de precipitación (fig. 11) están caracterizados del modo siguiente:

Grupo 1: emigra rápidamente hacia la región γ_2 .

Grupo 2: muestra dos arcos de precipitación, casi siempre confluentes.

Grupo 3: emigra lentamente hacia la región γ_2 .

Por otra parte el tipo “2” resultaba electroforéticamente indistinguible de un suero fabricado con una mezcla del tipo “1” y “3”.

Estudios familiares posteriores demostraron que el sistema podía ser explicado por un par de alelos codominantes cuyo locus genético se denominó

“group specific component” (componente específico de grupo o grupos Gc)²¹⁷.

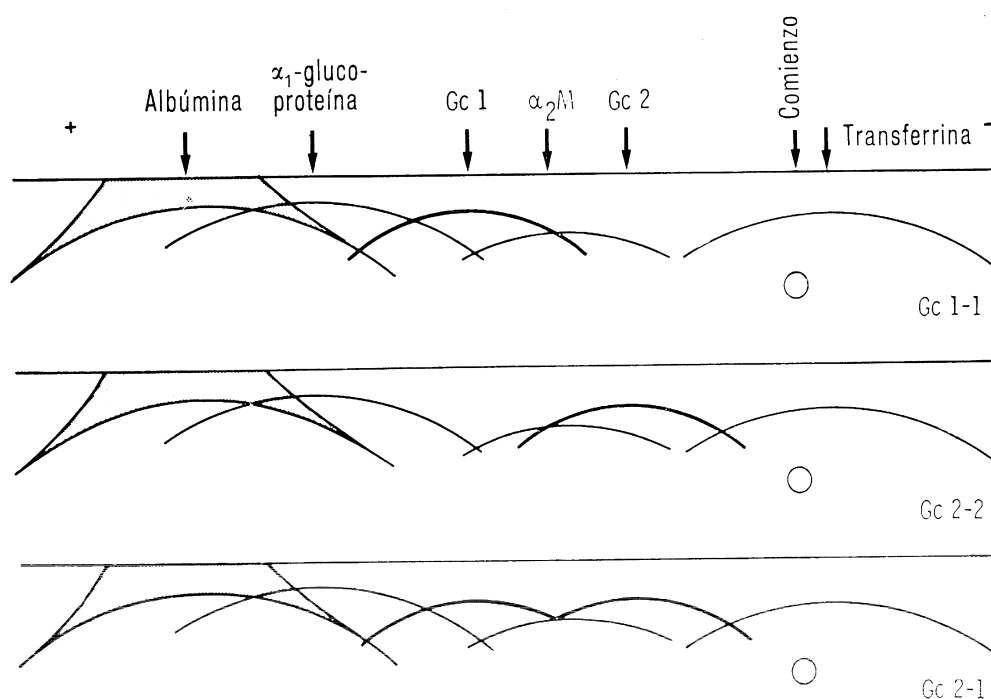


Fig. 11. Esquema de los tres fenotipos Gc más frecuentes

Dichos alelos, Gc¹ y Gc², describirían tres posibles fenotipos: Gc1-1, Gc2-1 y Gc2-2. Posteriormente, en 1977, se demostró que el sistema Gc estaba, en realidad, compuesto por tres alelos codominantes: Gc¹F, Gc¹S y Gc² que a su vez daban lugar a seis fenotipos distintos ²¹⁸.

²¹⁷ HIRSCHFELD, J., “The Gc system. Immuno-electrophoretic studies of normal human sera with special reference to a new genetically determined serum system (Gc)”, *Progr. Allergy*, vol. 6, págs. 155-186.

²¹⁸ CONSTANS, J., VIAU, M., CLEVE, M., JAEGER, G., QUILICI, J. C., PALLISSON, M. J., “Analysis of the Gc polymorphism in human populations by isoelectrofocusing on polyacrylamide gels. Demonstration of subtypes of the Gc1 allele and of additional Gc variants”, *Hum. Genet.*, vol. 41, págs. 53-60.

4.4.1. CARACTERISTICAS DEL SISTEMA Gc

Los grupos Gc se engloban dentro de las α_2 -globulinas. La constante de sedimentación de Gc1 y de Gc2 es $S_{20} = 4,13$. Se ha calculado un peso molecular aproximado de 50.800, que correspondería a 450 residuos aminaácidos ²¹⁹.

Bowman y Bearn llegaron a la conclusión de la existencia de dos subunidades en las proteínas Gc, cada una de las cuales tendría un peso molecular aproximado de 25.000, unidas ambas por puentes disulfuro²²⁰. El análisis bioquímico de estas proteínas reveló la siguiente composición: hexosas (2%), hexosamina (2%), fucosamina (0,2%) y una fracción proteica del 96%. A diferencia de las restantes α_2 -globulinas la proteína Gc no contiene ácido neuramínico ²²¹.

²¹⁹ JÖRGENSEN, G., RITTER, H., VOGEL, F., "Polimorfismo Gc (<<componente específico de grupo>>)". En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 3, pág. 116, BOWMAN, B. H., BEARN, A. G., "The presence of subunits in the inherited group-specific proteins of human serum", *Proc. Nat. Acad. Sci. Usa*, vol. 53, págs. 722-729.

²²⁰ BOWMAN, B. H., BEARN, A.G., "The presence of subunits in the inherited group-specific proteins of human serum", *Proc. Nat. Acad. Sci. Usa*, vol. 53, págs. 722-729, JÖRGENSEN, G., RITTER, H., VOGEL, F., "Polimorfismo Gc (<<componente específico de grupo>>)". En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 3, pág. 118.

²²¹ CLEVE, H., BEARN, A. G., "The group specific component of serum: genetic and chemical considerations", *Progr. Med. Genet.*, vol. 2, págs. 64-82.

La concentración de esta proteína en plasma de sujeto sano es 30-55 mg/100 ml. El punto isoeléctrico está comprendido entre 4,95 y 5,10²²².

4.4.2. FUNCION DEL SISTEMA Gc

La función de la proteína Gc es la fijación y el transporte de la vitamina D y sus metabolitos²²³.

Cada molécula de Gc sólo contiene un sitio de unión a la vitamina D²²⁴. Sin embargo, esta proteína es tan abundante en el suero que únicamente son utilizadas el 1-2% de los lugares de unión de Gc para el almacenamiento y transporte de los metabolitos de vitamina D²²⁵.

Recientemente se han realizado estudios que muestran una correlación entre el fenotipo IF-IF y una mayor susceptibilidad a la infección por el virus

²²² GENE, M., HUGUET, E., "Proteínas plasmáticas". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 102.

²²³ DAIGER, S. P., SCHANFIELD, M. S., CAVALLI-SFORZA, L. L., "Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D", *Proc. Nat. Acad. Sc. Usa*, vol. 72, págs. 2076-2080.

²²⁴ HADDAD, J. G., WALGATE, J., "25-hydroxy vitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calcifodiolbinding protein", *J. Biol. Chem.*, vol. 251, págs. 4803-4809.

²²⁵ HADDAD, J. G., HILLMAN, L., ROJANASATHIS, S., "Human serum binding capacity and affinity for 25-hydroxy-cholecalciferol", *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 43, págs. 86-91.

del HIV (virus de la inmunodeficiencia humana), mientras que los individuos Gc2-2 serían relativamente resistentes a la infección inicial²²⁶.

4.4.3. GENETICA DEL SISTEMA Gc

El gen que codifica la proteína Gc se ha localizado, por hibridación celular somática, en el cromosoma 4, en la zona 4q11 y 4q13 ²²⁷.

El modelo genético propuesto para el sistema Gc ha variado a lo largo del tiempo según se han ido aplicando nuevas técnicas para su estudio.

Mediante inmunolectroforesis en gel de agarosa pueden observarse tres patrones comunes de emigración Gc1-1, Gc2-2 y Gc2-1, codificados por dos alelos codominantes denominados Gc¹ y Gc² ²²⁸.

Utilizando técnicas de isoelectroenfoque se ha evidenciado la heterogeneidad del alelo Gc¹. El alelo Gc¹ se puede subtipar en dos variantes según su movilidad electroforética: IF (fast) y IS (slow)²²⁹. Por tanto, existen seis posibilidades fenotípicas: IF-IF, IS-IS, IF-IS, 2-IF, 2-IS y 2-2.

²²⁶ EALES, L. S., "Association of different allelic forms group specific component with susceptibility to and clinical manifestation of human immunodeficiency virus infection", *Lancet*, vol. 1, págs. 999-1002.

²²⁷ COOKE, N. E., WILLARD, H. F., DAVID, E. V., GEORGE, D. L., "Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of a associated DNA polymorphism", *Human. Genet.*, vol. 73, págs. 225-229.

²²⁸ HIRSCHFELD, J., "The Gc system. Immunolectrophoretic studies of normal human sera with special reference to a new genetically determined serum system (Gc)", *Progr. Allegy.*, vol. 6, págs. 155-186.

²²⁹ CONSTANS, J., VIAU, M., CLEVE, M., JAEGER, G., QUILICI, J. C., PALLISSON, M. J., "Analysis of the Gc polymorphism in human populations by isoelectric focusing on polyacrylamide gels: demonstration of subtypes of Gc1 alleles and of additional Gc variants", *Hum. Genet.*, vol. 41, págs. 53-60.

En esta proteína se han descubierto un gran número de variantes, la mayoría de las cuales pueden ser detectadas únicamente mediante la técnica de isoelectroenfoque²³⁰. En la literatura científica son muy numerosos los estudios familiares y poblacionales relacionados con las proteínas Gc²³¹, así como la descripción de nuevas variantes alélicas²³².

Siguiendo las recomendaciones de Constans y cols. en 1978²³³, en 1979 se adoptó una nueva nomenclatura para las variantes genéticas de la proteínas

²³⁰ KAMBOH, M. I., FERRELL, R. E., "Ethnic variation in vitamin D- binding protein (Gc): a review of isoelectric focusing studies in human populations", *Hum. Genet.*, vol. 72, págs. 281-293.

²³¹ DYKES, D., COPOULS, B., POLESKY, H., "Description of six new Gc variants", *Hum. Genet.*, vol. 63, págs. 35-37, FLORIS-MASALA, R., GRUPPIONI, G., LUNESU, M., MAMELI, G. E., PORCELLA, P., RISTALDI, M. S., SUCCA, V., VONA, G., "Gc and C3 polymorphisms in South Sardinia", *Hum. Hered.*, vol. 37, págs. 127-128, FERTAKIS, A., MIHAS, B., ANGELOPOULOS, B., "Distribution of the groups-specific component in Greece", *Am. Soc. Hum. Genet.*, vol. 8, pág. 589, GARBER, R. A., DELAPOINTE, L., MORRIS, J. W., "PGM1 and Gc subtype gene frequencies in a California hispanic population", *Hum. Hered.*, vol. 35, págs. 773-776, GENE, M., HUGUET, E., CARRACEDO, G., CORBELLA, J., "Frequency and distribution of Pi, Gc, Tf and PLG subtypes by Isoelectric Focusing in Barcelona". En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, K., *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, págs. 235-239, THYMANN, M., "Gc subtypes determined by agarose Isoelectric Focusing. Distribution in Denmark and application to paternity cases", *Hum. Hered.*, vol. 31, págs. 214-221, PAPIHA, S. S., WHITE, Y., SINGH, B. N., AGARWAL, S. S., SHAN, K. C., "Groups-specific Component (Gc) subtypes in the Indian subcontinent", *Hum. Hered.*, vol. 37, págs. 250-254, NEVO, S., "Gc subtypes in some population groups from Israel", *Hum. Hered.*, vol. 37, págs. 161-169, OLSON, J., LAAS, T., "Isoelectric Focusing in agarose under denaturing conditions", *J. Chromatogr.*, vol. 215, págs. 373-378, LEFRANC, M. P., CHIBANI, J., HELAL, A. N., BOUKEF, K., SEGER, M. J., LEFRANC, G., "Human transferrin (Tf) and Group-specific Component (Gc) subtypes in Tunisia", *Hum. Genet.*, vol. 59, págs. 60-63, KOUVATSI, A., TRIANTAPHYLIDIS, C. D., "Gc and Tf subtypes in Greece", *Hum. Hered.*, vol. 37, págs. 62-64, KUEPPERS, F., HARPER, B., "Groups-specific Component (Gc) "subtypes" of Gc by Isoelectric Focusing in US blacks and whites", *Hum. Hered.*, vol. 29, págs. 242-249.

²³² THYMANN, M., HJALMARSSON, K., SVENSSON, M., "Five new Gc variants detected by Isoelectric Focusing in agarose gel", *Hum. Genet.*, vol. 60, págs. 340-343, DYKES, D., POLESKY, H. F., "Gc 1C12: A new variant", *Hum. Hered.*, vol. 32, págs. 136-138.

²³³ CONSTANS, J., VIAU, M., CLEVE, M., JAEGER, G., QUILICI, J. C., PALISSON, M. J., "Analysis of the Gc polymorphism in human populations by isoelectric focusing on polyacrylamide gels: demonstration of subtypes of Gc1 alleles and of additional variants", *Hum. Genet.*, vol. 41, págs. 53-60.

Gc²³⁴. Reciben la denominación de variantes “A” (anódica) o “C” (catódica), según la movilidad relativa sobre el gel.

Las variantes más anódicas que la banda Gc1F se denominan variantes Gc1A (Gc1A1, Gc1A2, Gc1A3, etc.). Las variantes más catódicas que la banda Gc1S reciben el nombre de variantes Gc1C (Gc1C1, Gc1C2, Gc1C3, etc.). De igual manera para el alelo Gc2 las variantes más anódicas se denominan Gc2A y las más catódicas serán las Gc2C.

Una característica importante del sistema Gc es la escasa frecuencia de alelos silentes, que le convierte en un sistema de elevada eficacia.

²³⁴ CONSTANS, J., “Group specific component report on the first International Workshop”, *Hum. Genet.*, vol. 48, págs. 143-149.

4.4.4. EL SISTEMA Gc EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

Son varias las razones por las que se incluye el estudio de la proteína Gc dentro de la investigación de paternidad ²³⁵:

1º El fenotipo observado refleja directamente el genotipo, ya que se trata de alelos codominantes.

2º Esta proteína se encuentra presente en un tejido de interés a lo largo de toda la vida del individuo y es fácilmente accesible. Los caracteres Gc aparecen en el feto ya en la décima semana de gestación.

3º Los caracteres Gc muestran una gran estabilidad frente a factores externos, tales como calor, putrefacción, congelación, etc.

4º Su estudio consume una cantidad muy pequeña de muestra.

5º El polimorfismo de esta proteína tiene una distribución equilibrada en la población general.

²³⁵ RUIZ DE LA CUESTA, J. M., BARASONA, P., GREMO, A., BANDRES, F., PEREZ CONESA, A. F., "Importancia del estudio de la proteína Gc en la investigación de paternidad", *Revista Española de Medicina Legal*, núm. 46-47, pág. 25.

El rendimiento del sistema Gc en la investigación de paternidad ha sido objeto de numerosos estudios ²³⁶.

La máxima probabilidad de exclusión que se puede alcanzar para un sistema con tres alelos codominantes, como es el caso de la proteína Gc, es de 0,37. El rendimiento del sistema se calcula comparando este valor teórico con el valor hallado de la probabilidad de exclusión “a priori” en una población determinada²³⁷.

Así pues, en cada población puede variar el rendimiento del sistema en función de las frecuencias fenotípicas encontradas. En lo que se refiere a la población española en la tabla 22, se expresan las frecuencias génicas obtenidas en distintas poblaciones²³⁸.

²³⁶ RITTNER, C., “Serum groups in patern ity testing: the contribution of the systems detected by PAGIF and of complement polymorphims”, *Forensic Sci. Int.*, vol. 18, pág. 290, POLESKY, H., DYKES, D., “Use of Isoelectric Focusing in parentage testing”, *Forensic Sci. Int.*, vol. 18, pág. 276.

²³⁷ SELVIN, S., “Statistical analysis of blood genetic evidence”. En: GRUMBAUM, B. W., *Handbook for forensic individualization of human blood and blodstains*, págs. 177-211.

²³⁸ CASTELLANO ARROYO, M., MATINEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético moleculares en población española*, pág. 46.

La probabilidad de exclusión “a priori” en la población autóctona de Galicia es de 29%²³⁹, mientras que la probabilidad teórica de exclusión en la población de Barcelona es de 30%²⁴⁰.

²³⁹ CARRACEDO, A., CONCHEIRO, L. “Distribution of de Pi, TFC, and Gc subtypes in Galicia (North West Spain)”, *Z. Rechtsmed*, vol. 90, pág.157.

²⁴⁰ GENE, M., HUGUET, E., “Proteínas plasmáticas”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 103.

Tabla 22. Frecuencia de los alelos del Grupo Gc en población española

POBLACION	FRECUENCIAS GENICAS				MUESTRA
	1F	1S	2	Var	
<i>Andalucía</i>					
A. Orientales	0,111	0,628	0,261	-	437
<i>Aragón</i>					
Aragoneses	0,101	0,535	0,364	-	810
<i>Baleares</i>					
Baleares	0,167	0,551	0,282	-	1018
Ibiza y Formentera	0,169	0,606	0,225	-	109
Mallorca	0,168	0,552	0,280	-	815
Menorca	0,165	0,473	0,362	-	94
<i>Castilla</i>					
Toledo	0,332	0,565	0,103	-	184
<i>Cataluña</i>					
Barcelona	0,132	0,548	0,320	-	839
<i>Galicia</i>					
Gallegos	0,120	0,572	0,308	-	480
<i>Madrid</i>					
Residentes	0,127	0,567	0,312	-	994
<i>Navarra</i>					
Navarros	0,084	0,595	0,321	-	580
<i>País Vasco</i>					
Vizcainos	0,089	0,566	0,342	0,006	196
Residentes	0,126	0,555	0,319	-	281
Foráneos	0,145	0,581	0,274	-	124

4.5. ALFA-1-ANTITRIPSINA (Pi) (α_1 -At)

Desde principios de siglo ha sido constatada en los líquidos orgánicos del hombre, sobre todo en el suero, la presencia de factores inhibidores de proteasas. Landsteiner demostró que la actividad antitripsina del suero se realizaba sobre todo en la fracción albúmina, por lo que el componente responsable no podía ser un anticuerpo de tipo antiglobulina²⁴¹.

Actualmente se conocen seis inhibidores de proteasa en el suero humano, de las cuales la α_1 -antitripsina y la α_2 -macroglobulina se encuentran en mayor concentración.

²⁴¹ LANDSTEINER, K., "Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe", *Ab. Bakt. Y. Abt. Orig.*, vol. 27, pág. 357.

4.5.1. CARACTERISTICAS DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA

Los estudios realizados por Schultze, Heide y Haupt, en 1962, pusieron de manifiesto que se trataba de una α -1-glicoproteína con un contenido de carbohidratos del 12,4 %²⁴².

El peso molecular oscila alrededor de 50.000 daltons²⁴³.

Fagerhol y Braend, en 1965, mediante electroforesis en gel de almidón diferenciaron en la zona de la prealbúmina un sistema proteico que presentaba variabilidad. Se descubrieron cinco fenotipos que estaban controlados genéticamente por tres alelos. El locus se denominó Pr y los alelos Pr^F, Pr^M y Pr^S, aludiendo F, M y S a su movilidad electroforética, fast, mediun y slow respectivamente.

Más tarde se comprobó que el sistema Pr no era un sistema de prealbúminas sino que eran proteínas α -1-antitripsina²⁴⁴, y se denominó sistema Proteasa Inhibidor o sistema Pi²⁴⁵. Este sistema presenta un gran polimorfismo.

²⁴² SCHULTZE, H. E., HEIDE, K., HAUPT, H., "Alpha-1-antitrypsin aus Humanserum", *Klin. Wschr.*, vol. 40, págs. 427-429.

²⁴³ CRAWFORD, Y. P., "Purification and properties of normal human α -1-antitrypsin", *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 156, pág. 215.

²⁴⁴ FAGERHOL, M. K., BRAEND, M., "Classification of human serum prealbumins after starch gel electrophoresis", *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, vol. 68, págs. 434-438.

²⁴⁵ FAGERHOL, M. K., LAURELL, C. B., "The polymorphism of prealbumins and alfa-1-antitrypsin in human sera", *Clin. Chim. Acta*, vol. 16, págs. 199-203.

En la actualidad el número de alelos conocidos es mayor de 60²⁴⁶. Fagerhol y Gedde-Dahl, en 1969²⁴⁷, postulan un modelo genético de múltiples alelos codominantes autosómicos en un locus.

El alelo M (el más frecuente) sirve de referencia para la denominación de los demás alelos descritos, puesto que a los más anódicos se les asignan letras anteriores del abecedario, mientras que a los más catódicos se les denomina con letras posteriores alfabéticamente. La técnica de isoelectroenfoque ha permitido determinar ocho subtipos de tipo M, siendo los más frecuentes el M1, M2 y M3. También se ha descrito la existencia de alelos silentes Pi “0” ó Pi (-), que son altamente infrecuentes²⁴⁸, que en el estado homocigótico revela ausencia de α_1 -antitripsina en el suero.

Los estudios bioquímicos realizados por Hodges y cols.²⁴⁹ en la molécula de α_1 -antitripsina en individuos M, pusieron de manifiesto dos

²⁴⁶ WEIDINGER, S., FABER, J. P., BÄCKER, U., SCHWARZFISCHER, F., OLEK, F., “A de novo Mutation in the Alpha-1-Antitrypsin Gene detected in a Case of disputed Paternity by DNA Sequence Analysis”. En: RITTNER, C., SCHNEIDER, P. M., *Advances in Forensic Haemogenetics* 4, págs. 306-308.

²⁴⁷ FAGERHOL, M. K., LAURELL, C. B., “The polymorphisms of “prealbumins” and alpha-1-antitrypsin in human sera”, *Clin. Chim. Acta*, vol. 16, págs. 199-203.

²⁴⁸ GENE, M., HUGUET, E., “Proteínas plasmáticas”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 101.

²⁴⁹ HODGES, L. C., LAINE, R., CHAN, S. K., “Structure of the oligosaccharide chains in human alpha-1-protease inhibitor”, *J. Biol. Chem.*, vol. 254, págs. 8208-8212.

tipos de cadena de oligosacáridos, una de gran tamaño y con una estructura compleja y otra cadena de menor tamaño. Cada molécula proteica estaría formada por una cadena grande y una pequeña unida a la secuencia peptídica a través de enlaces N-Acetil-D-glucosamina-Aspargina (GlcNac-Asn). La cadena grande puede tener hasta tres residuos terminales de ácido N-Acetil-neuramínico (NAN) y la cadena pequeña hasta dos.

En cuanto a las diferencias fenotípicas del sistema proteasa inhibidor se conoce que la diferencia entre PiM y PiS reside en un único aminoácido²⁵⁰; mientras que PiM tiene una glutamina, PiS tiene una valina. En el caso PiM y PiZ, también difieren en un único aminoácido, glutamina para PiM y lisina para PiZ²⁵¹.

La concentración plasmática media de α_1 -antitripsina en sujetos sanos es de 290 mg/100 ml. Este nivel depende en gran parte del fenotipo del individuo, puesto que hay determinados alelos que condicionarían las tasas de producción. Tomando como referencia el valor 1 para el alelo Pi^M se encuentran valores diferentes para otros alelos: 0 para Pi⁽⁻⁾, 0,15 para Pi^Z y 0,6 para Pi^S.

²⁵⁰ OWEN, M. C., WHITE, Y., SINGH, B. N., AGARWAL., S. S., SHAN, K. C., "The abnormality of the S variant of human alpha-1-antitrypsin", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 453, págs. 257-261, YOSHIDA, A., EWING, C., WESSELS, M., LEIBERMAN, J., GAIDULIS, L., "Molecular abnormality of Pi S variant of human alpha-1-antitrypsin", *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 29, págs. 233-239.

²⁵¹ YOSHIDA, A., CHILLAR, R., TAYLOR, J. C., "An alpha-1-antitrypsin variant PiB. Alhambra (Lys->Asp, Glu->Asp) with rapid anodal electrophoretic mobility", *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 31, págs. 555-563.

4.5.2. FUNCION DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA

La mayoría de la α_1 -antitripsina se sintetiza en el hígado y está presente en suero, secreciones bronquiales, orina y leche.

Numerosos experimentos indican que la α_1 -antitripsina desempeña una función importante en el organismo. Numerosos autores han señalado que la α_1 -antitripsina puede inhibir las proteasas de los leucocitos polinucleares²⁵², así como a una elastasa y a una colagenasa de los granulocitos polimorfonucleares²⁵³. Estas enzimas intervienen en la destrucción de los tejidos durante los procesos inflamatorios.

Otra de sus funciones importantes es la inactivación de las proteasas de los granulocitos y otros tejidos, incluso *in vivo*. La α_1 -antitripsina también es capaz de actuar, así mismo, sobre la génesis de la fibrina y el sistema de la cinina. Su intervención sobre la fibrinólisis podría realizarse a través de la inhibición del antecedente trombolastínico del plasma (PTA). Se ha demostrado que la α_1 -antitripsina puede inhibir la actividad del PTA²⁵⁴.

²⁵² KUEPPERS, F., BEARN, A. G., "Inherited variations of human serum alpha-1-antitrypsin", *Science*, vol. 154, págs. 407-408, OHLSSON, K., "Neutral leucocyte proteases and elastase inhibited by plasma alpha-1-antitrypsin", *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 28, pág. 251.

²⁵³ JANOFF, A., BASCH, R. S., "Further studies on elastase-like esterases in human leukocyte granules", *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, vol. 136, pág. 1045, OHLSSON, K., OHLSSON, I., "The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenase", *Europ. J. Biochem.*, vol. 36, pág. 473.

²⁵⁴ HECK, L. W., KAPLAN, A. P., "A role for α_1 -antitrypsin in the regulation of coagulation", *Fed. Proc.*, vol. 33, págs. 642-647.

Los déficit de α_1 -antitripsina son de origen genético y van asociados a los alelos S y Z. En 1963, Laurell y Erikson²⁵⁵, establecieron por primera vez la relación entre la α_1 -antitripsina y el enfisema pulmonar. El déficit tiene un carácter familiar ligado al alelo Z. En los individuos heterocigotos que poseen el alelo Z el poder antitripsico y los niveles plasmáticos de la proteína son del 50-60 % de los del individuo sano, pero sin manifestaciones clínicas. En el homocigoto la actividad es prácticamente nula (10-15 %) con manifestaciones clínicamente importantes por la disminución de la inhibición de enzimas proteolíticos de origen endógeno. Básicamente la clínica es de enfisema pulmonar grave y hepatopatías de tipo cirrótico y neoplásico, entre otras enfermedades de considerable gravedad²⁵⁶.

Parece ser que el fenotipo ZZ produce una adición incompleta de ácido siálico a la molécula de α_1 -antitripsina. La disminución de la cantidad de ácido podría ser la causa de los bajos niveles de α_1 -antitripsina de estos individuos en el suero, puesto que este ácido interviene activamente en el transporte de las glicoproteínas a través de las membranas, por lo que las glicoproteínas exentas

²⁵⁵ LAURELL, C. B., ERIKSON, S., "The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency", *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 15, págs. 132-140.

²⁵⁶ GENE, M., HUGUET, E., "Proteínas plasmáticas". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 100.

de ácido siálico quedarían fijadas a las membranas de los hepatocitos²⁵⁷.

Las estadísticas señalan que sólo el 70-80 % de los individuos ZZ acaban padeciendo el enfisema obstructivo crónico²⁵⁸.

²⁵⁷ BELL, O. F., CARRELL, R. W., "Basis of the defect in α_1 -antitrypsin deficiency", *Nature*, vol. 243, pág. 410.

²⁵⁸ KUEPPERS, F., " α_1 -antitripsina". En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética Humana*, tomo 3, págs. 47-48.

4.5.3. GENETICA DE LA ALFA-1-ANTITRIPSINA

El gen que codifica para la proteína α_1 -antitripsina está localizado en el cromosoma 14, en la zona 14q24.1-32.1 ²⁵⁹.

La α_1 -antitripsina constituye un claro ejemplo de marcador genético que presenta un elevado número de alelos, de los cuales, la gran mayoría poseen una frecuencia tan baja que no rebasan el nivel de idiomorfos.

Los estudios cuantitativos de los niveles plasmáticos de la α_1 -antitripsina en los individuos que presenta carencia de la misma, indujeron a sospechar desde un principio la existencia de factores genéticos. En las familias en las que un progenitor posee una baja concentración plasmática y el otro progenitor muestra una concentración normal, todos los hijos muestran niveles sanguíneos intermedios.

En las familias cuyos dos progenitores presentan valores intermedios, se encuentran hijos con niveles séricos bajos, intermedios y normales en las proporciones 1/2/1 respectivamente. Estos datos sugirieron que la deficiencia de la α_1 -antitripsina se debe a la presencia en estado de homocigosis de un gen carencial, los valores intermedios al estado heterocigotico del mismo gen y, por último, los valores normales se debían a la presencia del gen normal en estado

²⁵⁹ SCHROEDER, W. T., MILLER, M. F., WOO, S. L., SAUNDERS, F., "Chromosomal localization of the human alpha-1-antitrypsin Gene (π) to 14q31-31", *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 37, pág. 868.

de homocigosis²⁶⁰.

Para el sistema Pi se ha postulado un modelo genético de múltiples alelos autosómicos codominantes²⁶¹. Los estudios interfamiliares llevados a cabo en un total de 15.000 individuos, confirmaron dicha hipótesis²⁶².

La técnica de tipo electroforético, especialmente en geles de almidón, permitió detectar un elevado número de variantes electroforéticas²⁶³. Sin embargo la focalización isoelectrica en geles de poliacrilamida con rangos de pH entre 2,5 y 6,0 permiten una mejor definición de los fenotipos²⁶⁴.

Posteriores investigaciones utilizando esta técnica de focalización isoelectrica han demostrado que el fenotipo MM se subdivide en subtipos,

²⁶⁰ KUEPPERS, F., BRISCOE, W. A., BEARN, A. G., "Hereditary deficiency of serum alpha-1-antitrypsin", *Science*, vol. 146, págs. 1678-1679.

²⁶¹ FAGERHOL, M. K., GEDDE-DAHL, T. Jr., "Genetics of the Pi serum types", *Hum. Hered.*, vol. 19, págs. 354-359.

²⁶² COOK, P. J. L., "The genetics of alpha-1-antitrypsin: a family study in England and Scotland", *Ann. Hum. Genet.*, vol. 38, pág. 275.

²⁶³ FAGERHOL, M. K., "The Pi system. Genetic variants of serum alpha-1-antitrypsin", *Ser. Haematol.*, vol. 1, págs. 153-161.

²⁶⁴ ALLEN, R. C., HARLEY, R. A., TALAMO, R. C., "A new method for determination of alpha-1-antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrilamide gel slabs", *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 62, págs. 732-739.

los cuales son la expresión fenotípica de cinco alelos M1, M2, M3, M4 y M5²⁶⁵.

Los estudios genéticos realizados en grupos familiares confirman que tales subtipos se ajustan al modelo de transmisión genética postulado globalmente para el sistema Pi²⁶⁶.

De todos los fenotipos que se han detectado, unos están mejor caracterizados que otros, ya que la identificación de los mismos no resulta fácil, sobre todo teniendo en cuenta que diferentes técnicas pueden ofrecer distintos patrones de bandas. Por esta razón, en 1978, se creó un Comité para considerar la complejidad del sistema Pi. Este Comité establece laboratorios de referencia para identificar y caracterizar las nuevas variantes, comparándolas con diferentes técnicas. También establece una estandarización en la nomenclatura mediante la utilización de las iniciales para denominar el fenotipo²⁶⁷.

²⁶⁵ KUEPPERS, F., CHRISTOPHERSON. M. J., "Alpha-1-antitrypsin: further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing", *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 30, págs. 359-365, FRANTS, R. R., ERIKSSON, A. W., "Alpha-1-antitrypsin: common subtypes of Pi M", *Hum. Hered.*, vol. 26, págs. 435-440.

²⁶⁶ CLEVE, H., PATUTSCHNICK, W., STRECKER, K., NEVO, S., "Inheritance of PiM subtypes", *Hum. Hered.*, vol. 29, pág. 351.

²⁶⁷ COX, D. W., "Genetic variation of alpha-1-antitrypsin", *Am. J. Human. Genet.*, vol. 30, págs. 660-662, COX, D. W., JOHNSON, A. M., FAGERGHOL, M. K., "Report of nomenclature meeting for alpha-1-antitrypsin", *Hum. Genet.*, vol. 53, págs. 429-433.

4.5.4. LA ALFA-1-ANTITRIPSINA EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

La probabilidad de exclusión “a priori” es función directa del polimorfismo de un sistema. Así, cuanto más polimórfico sea un sistema y cuanto más equilibradas estén las frecuencias de sus alelos, tanto mayor será su probabilidad de exclusión “a priori” y, por tanto, su eficacia en la investigación de la paternidad.

En la tabla 23 se muestran las frecuencias génicas de la alfa-1-antripsina obtenidas en distintas poblaciones españolas²⁶⁸.

La probabilidad de exclusión “a priori” en población gallega²⁶⁹ es de 31,3% mientras que en la población de Barcelona es de 34,6%²⁷⁰.

²⁶⁸ CASTELLANO ARROYO, M., MATINEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético moleculares en población española*, pág. 43.

²⁶⁹ CARRACEDO, A., CONCHEIRO, L., RODRIGUEZ CALVO, M. S., “Plasma protein and red cell enzyme groups in Galicia, (Nort West Spain)”, *Z. Rechtsmed.*, vol. 98, págs. 137-138.

²⁷⁰ GENE, M., HUGUET, E., “Proteínas plasmáticas”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 101.

Tabla 23. Frecuencia de los alelos de la alpha-1-antitripsina en población española

POBLACION	FRECUENCIAS GENICAS								MUESTRA
	M1	M2	M3	Z	P	S	I	F	
<i>Andalucía</i>									
A. Orientales	0,750	0,165	0,006	0,001		0,076		0,001	405
<i>Cataluña</i>									
Barcelona	0,600	0,191	0,099	0,002		0,104		0,002	938
<i>Galicia</i>									
Gallegos	0,660	0,115	0,060	0,009		0,149	0,001	0,005	480
<i>Madrid</i>									
Residentes	0,781	0,125	-	0,005	-	0,088	-	0,001	742
<i>País Vasco</i>									
<i>Vizcaya</i>									
Arratia (nativos)	0,580	0,188	0,125	-	-	0,107	-	-	56
Vizcaya	0,666	0,133	0,066	-	-	0,117	-	-	166
Vizcaya (mixtos)	0,670	0,181	0,021	0,122	-	0,005	-	-	94
Residentes (a)	0,694	0,137	0,055	0,006	-	0,108	-	-	390
Residentes (b)	0,706	0,162	0,024	0,008	-	0,099	-	-	437
<i>Guipúzcoa</i>									
Residentes	0,671	0,158	0,045	-	-	0,126	-	-	155
<i>Alava</i>									
Residentes	0,722	0,196	0,030	0,005	-	0,132	-	-	99

(a) y (b) son distintas poblaciones estudiadas en la misma zona geográfica

4.6. FOSFATASA ACIDA ERITOCITARIA (AcP₁)

La fosfatasa ácida eritrocitaria (EC 3.1.3.2) pertenece al grupo de las fosfohidrolasas y fosfotransferasas. Una característica típica de las fosfatasas ácidas de los hematíes es un valor de pH óptimo bajo. Estas fosfatasas ácidas eritrocitarias difieren también de las fosfatasas de otros tejidos por una serie de parámetros bioquímicos, tales como la especificidad de sustrato.

4.6.1. CARACTERISTICAS DE LA FOSFATASA ACIDA

La fosfatasa ácida no es específica del eritrocito sino que se encuentra distribuida en casi todos los tejidos: hígado, riñón, bazo, músculo esquelético, próstata, placenta y leucocitos²⁷¹.

En varios de estos tejidos, esta enzima puede ser diferenciada de otras fosfatasas ácidas que también actúan y que están determinadas por otros *loci*

²⁷¹ BLAKE, N. M., KIRK, R. L., BARNES, K. R., THOMPSON, J. M., "Expresion of human red cell acid phosphatase activity in placenta and other tissues", *Jpn. J. Hum. Genet.*, vol. 18, págs. 10-23.

génicos, como AcP_2 y AcP_3 ²⁷².

La fosfatasa ácida eritrocitaria se separó mediante electroenfoque preparativo en 21 isoenzimas, con puntos isoelectricos entre 4,2 y 5,8. Estas isoenzimas son sialoproteínas que llevan un cierto número de residuos de ácido neuramínico.

El peso molecular de las isoenzimas cuyos puntos isoeléctricos se hallan entre 4,2 y 5,2 es de 21.000. El peso molecular de las isoenzimas con puntos isoeléctricos entre 5,2 y 5,8 es de 12.000. El peso molecular de la enzima purificada es de 44.000. Estas diferencias de pesos moleculares entre las isoenzimas y el enzima purificado sugiere que el enzima es un dímero o un tetrámero²⁷³.

Los niveles más altos de actividad del enzima AcP_1 se han obtenido utilizando como substratos fenil-fosfato, riboflavina-5-fosfato y fenoftaleína difosfato, aunque ninguno de ellos alcanzaba completamente la actividad del p-nitrofenil-fosfato (PNPP). Niveles moderados de actividad, entre el 10-40 % de los encontrados con el PNPP, fueron observados con el metil-fosfato. Otros substratos como el 6-fosfoglucomato, glucosa-6-fosfato, —glicerolfosfato, 2-3-fosfoglicerato, glucosa-1-fosfato, ATP y AMP mostraron nula o muy baja

²⁷² SWALLON, D. M., POVEY, S., HARRIS, H., "Activity of the "red cell" acid phosphatase locus in other tissues", *Ann. Hum. Genet.*, vol 37, págs. 31-38.

²⁷³ KACZMAREK, M. J., "On the isoenzymes of human red cell acid phosphatase", *Biochem. Med.*, vol. 16, págs. 173-176.

actividad²⁷⁴.

Se ha demostrado que la actividad fosfotransferasa es fenotipo dependiente²⁷⁵. Así la actividad promedio de la fosfatasa ácida eritrocitaria disminuye gradualmente en la siguiente serie fenotípica: $A < BA < CA < B < CB$ ²⁷⁶. La actividad fosfotransferasa para los tres homocigotos sigue el modelo $B > A > C$ (en las proporciones 10 : 9 : 6)²⁷⁷.

También hay evidentes diferencias genotípicas respecto a la termoestabilidad. Luffman y Harris²⁷⁸ observaron que a temperaturas de 47-52° C los fenotipos A, B y AB se desnaturalizaban con mayor facilidad que los fenotipos CA y CB. En general se comprobó una disminución gradual de la termoestabilidad en los diferentes fenotipos, de acuerdo con la escala $CA > CB > B > BA > A$.

²⁷⁴ LUFFMAN, J. E., HARRIS, H., "A Comparison of some properties of human red cell acid phosphatase in different phenotypes", *Ann. Hum. Genet.*, vol. 30, págs. 387-401.

²⁷⁵ GOLDEN, V. L., SENSABAUG, G. F., "Phenotypic variation in the phosphotransferase activity of human red cell acid phosphatase (AcP₁)", *Hum. Genet.*, vol. 72, págs. 340-343.

²⁷⁶ SPENCER, N., HOPKINSON, D. A., HARRIS, H., "Quantitative differences and gene dosage in the human red cell acid phosphatase polymorphism", *Nature*, vol. 201, págs. 299-300.

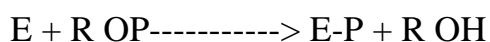
²⁷⁷ GOLDEN, V. L., SENSABUGH, G. F., "Phenotypic variation in the phosphotransferase activity of human red cell acid phosphatase (AcP₁)", *Hum. Genet.*, vol. 72, págs. 340-343.

²⁷⁸ LUFFMAN, J. E., HARRIS, H., "A comparison of some properties of human red cell acid phosphatase in different phenotypes", *Ann. Hum. Genet.*, vol. 30, págs. 387-401.

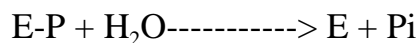
4.6.2. FUNCION DE LA FOSFATASA ACIDA

La fosfatasa ácida eritrocitaria (AcP₁) es una enzima que cataliza la transferencia de grupos fosfato desde ésteres fosfato a agua (reacción de hidrólisis) o a varios alcoholes aceptores (reacción de transferasa). La enzima es capaz de actuar en dos pasos²⁷⁹:

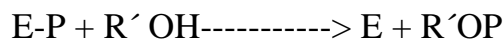
1°. Reacción del enzima y el sustrato ester fosfato, con la consecuente formación de un complejo enzima-fosfato y un derivado alcohólico.



2°. Hidrólisis con producción de fosfato inorgánico,



o transferencia de fosfato produciendo un nuevo ester fosfato.



²⁷⁹ GOLDEN, V. L., SENSABAUGH, G F., "Phenotypic variation in the phosphotransferase activity of human red cell acid phosphatase (AcP₁)", *Hum. Genet. vol. 72, págs. 340-343.*

4.6.3. GENETICA DE LA FOSFATASA ACIDA

La fosfatasa ácida eritrocitaria (AcP₁) está genéticamente determinada por un grupo de genes alélicos en un único locus autosómico, asignado al cromosoma 2, región 2p25.1²⁸⁰.

La demostración de fenotipos de fosfatasa ácida eritrocitaria se obtiene, en general, por la electroforesis en gel de almidón recomendada por Hopkinson y cols.²⁸¹. Estos autores describieron cinco fenotipos de fosfatasa ácida eritrocitaria, que denominaron A, BA, B, CA y CB, de acuerdo con su movilidad electroforética.

Ya en la primera investigación intrafamiliar de Hopkinson y cols.²⁸², se vio que los cinco fenotipos de fosfatasa ácida eritrocitaria eran determinados por tres alelos autosómicos codominantes: AcP^A, AcP^B, AcP^C, que describirían seis fenotipos: AA, AB, AC, BB, BC, CC. Más tarde, Lai y cols.²⁸³ descubrieron el sexto fenotipo que cabría esperar conforme a esta hipótesis genética.

Un cuarto gen, AcP^R, restringido a la población negroide, fue detectado en

²⁸⁰ WAKITA, Y., NARAHARA, K., TAKAHASHI, Y., KIKKAWA, K., KIMURA, S., ODA, M., KIMOTO, H., "Duplication of 2p25: conformation of the assignment of soluble acid phosphatase (AcP₁) locus to 2p25", *Hum. Hered.*, vol. 71, págs. 259-260.

²⁸¹ HOPKINSON, D. A., SPENCER, N., HARRIS, H., "Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism", *Nature*, vol. 199, págs. 969-971.

²⁸² HOPKINSON, D. A., SPENCER, N., HARRIS, H., "Genetical studies on human red cell acid phosphatase", *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 16, págs. 141-154.

²⁸³ LAI, L., NEVO, S., STEINBERG, A. G., "Acid phosphatase of human red cells predicted phenotype conforms to a genetic hypothesis", *Science*, vol. 145, págs. 1187-1188.

negros americanos²⁸⁴. Posteriormente se comprobó que también aparecía en poblaciones sudafricanas²⁸⁵ y en población negra de Carolina del Norte²⁸⁶.

Otro alelo raro, AcP^D, fue detectado en negros y caucasoides²⁸⁷. También se han descubierto dos fenotipos variantes asociados a una actividad enzimática inusualmente alta que se cree debida a una alelo denominado AcP^E²⁸⁸.

Herbich y cols²⁸⁹, en 1970, demostraron la existencia de un alelo AcP⁰. Este gen silencioso reduce la síntesis enzimática de forma que los portadores heterocigotos de este alelo AcP⁰ revelaron la mitad de la actividad normal de la fosfatasa ácida eritrocitaria.

Se han descrito otras variantes fenotípicas raras²⁹⁰.

²⁸⁴ GIBLETT, E. R., SCOTT, N. M., "Red cell acid phosphatase: racial distribution and report of a new phenotype", *Am. J. Hum Genet.*, vol. 17, págs. 425-432.

²⁸⁵ JENKINS, T., CORFIELD, V., "The red cell acid phosphatase polymorphisms in Southern Africa: population data and studies on the R, RA and RB phenotypes", *Ann. Human. Genet.*, vol. 35, págs. 379-391.

²⁸⁶ NELSON, M. S., "A computer assisted population frequency study of fourteen polymorphic blood grouping systems in North Carolina", *J. Forensic Sci.*, vol. 29, págs. 762-763.

²⁸⁷ KARP, G. W., SUTTON, H. E., "Some new phenotypes of human red cell acid phosphatase", *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 19, págs. 54-62.

²⁸⁸ SORGO, G., BRINKMAN, B., "Inheritance of the allele P^R of the red cell acid phosphatase (EC 3.1.3.2) in a caucasian family", *Hum. Genet.*, vol. 24, págs. 155-157, SORENSEN, S. A., "Report and characterization of a new variant, EB, of human red cell acid phosphatase", *Am. J., Hum. Genet.*, vol. 27, págs. 100-109.

²⁸⁹ HERBICH, J., FISHER, R. A., HOPKINSON, D. A., "Atypical segregation of human red cell acid phosphatase phenotypes evidence for a rare "silent" allele P⁰", *Ann. Hum. Genet.*, vol. 34, págs. 145-151.

²⁹⁰ NELSON, M. S., SMITH, E. A., CARLTON, W. K., ANDRUS, R. H., REISNER, E. G., "Three new phenotypes of human red cell acid phosphatase: AcP₁ FA, AcP₁ GA and AcP₁ GB", *Hum. Genet.*, vol. 67, págs. 367-371, TUROWSKA, B., "Evidence of a "new" allele of red cell acid phosphatase AcP K", *Forensic Science International*, vol. 26, págs. 163-167.

4.6.4. LA FOSFATASA ACIDA EN LA INVESTIGACION DE LA PATERNIDAD

La sencillez de las pruebas analíticas, así como las claras proporciones genéticas, permiten la utilización de este polimorfismo enzimático para la determinación de la paternidad.

La probabilidad de exclusión *a priori*, referida a población gallega está cifrada en 20,43 %²⁹¹, es decir, un porcentaje relativamente elevado.

Los sistemas enzimáticos del eritrocito se encuentran en los marcadores más seguros puesto que, en la mayoría, es posible determinar silentes enmascarados en heterocigotos, ya que, habitualmente, en ellos la actividad enzimática está reducida a la mitad. La tasa de silentes para la AcP es 0,34 % en población caucasoide²⁹².

En la tabla 24 se muestran las frecuencias génicas de la AcP₁ obtenidas en distintas poblaciones españolas²⁹³.

²⁹¹ CARRACEDO, A., LAREU, M.V., BARROS, F., "Polimorfismos enzimáticos del eritrocito". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, pág. 135.

²⁹² POLESKY, H.F., "The frequency of "null" genes calculated from trios in disputed parentage cases", *Forensic Science International*, vol. 23, pág. 69.

²⁹³ CASTELLANO ARROYO, M., MATINEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético moleculares en población española*, pág. 35.

Tabla 24. Frecuencia de los alelos de la AcP en población española


POBLACION	FRECUENCIAS GENICAS			MUESTRA
	A	B	C	(n)
<i>Andalucía</i>				
A. Orientales	0,279	0,696	0,025	385
Sevilla	0,367	0,580	0,023	213
<i>Aragón</i>				
Zaragoza	0,234	0,741	0,025	1000
<i>Baleares</i>				
Ibiza	0,249	0,719	0,032	390
<i>Canarias</i>				
Gran Canaria				
Noroeste	0,203	0,773	0,021	300
Noreste	0,167	0,808	0,025	120
Sur	0,206	0,767	0,015	262
<i>Castilla</i>				
León	0,233	0,729	0,038	118
Burgos	0,252	0,723	0,025	119
Palencia	0,287	0,691	0,022	68
Valladolid	0,278	0,699	0,023	108
<i>Cataluña</i>				
Barcelona	0,277	0,648	0,075	944
<i>Galicia</i>				
Gallegos	0,278	0,686	0,036	1086
Lugo	0,298	0,666	0,036	253
<i>Madrid</i>				
Madrileños	0,324	0,623	0,053	190
Residentes	0,275	0,678	0,047	952
<i>Navarra</i>				
Navarros	0,237	0,722	0,041	580
Pamplona	0,257	0,717	0,026	288
<i>País Vasco</i>				
Vizcaya				
Arratia	0,279	0,714	0,007	70
Guernika	0,301	0,685	0,014	73
Uribe	0,300	0,673	0,027	75
Vizcainos	0,281	0,709	0,010	194

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. SELECCION DE LOS INDIVIDUOS

Todas las muestras de sangre utilizadas en este estudio proceden de donantes voluntarios.

Todos los individuos fueron seleccionados a partir del padrón municipal e identificados mediante una ficha de recogida de datos (fig. 12).



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA LEGAL
Profesor R. MUÑOZ

DATOS DE LA TOMA DE SANGRE

Lugar de la toma Fecha

Sin anticoagulante mls. Con anticoagulante mls.

Anticoagulante utilizado

Observaciones

ALMACEN	Suero	Plasma	Hemolizado
Números:			

DATOS PERSONALES

Nombre Edad Registro n.º

Primer apellido Segundo apellido

Residente en Calle N.º Teléf.

Nacido en (.....)

Padre nacido en (.....)

Abuelo paterno nacido en (.....)

Abuela paterna nacida en (.....)

Madre nacida en (.....)

Abuelo materno nacido en (.....)

Abuela materna nacida en (.....)

Fig. 12. Ficha de recogida de datos

Para que un individuo fuera incluido en la muestra se impusieron varias condiciones:

- Sólo se tomaron muestras sanguíneas a las personas que acreditaron estar sanos en el momento de la extracción, con objeto de evitar relación entre enfermedad y fenotipo.
- Solamente se aceptaron las muestras de personas sin relación de parentesco hasta el nivel de primos hermanos.
- Las personas aceptadas en el estudio debían tener padres y abuelos nacidos en la Comarca de Las Arribes.

5.2. MATERIAL

Material de uso común en el laboratorio:

Material de vidrio, pipetas automáticas, pipetas Pasteur, tubos eppendorf, estufas, balanzas de precisión, peachímetro, gradillas, agitador de tubos, agitador magnético, nevera, arcón congelador, centrífuga, baño termostático, estufa de cultivos, sistema de purificación de agua, guantes de vinilo, parafilm, etc.

Toma de muestras:

Agujas y jeringuillas desechables (sistema Venoject).

Tubos de 10 ml utilizando EDTA(K₃) como anticoagulante (sistema Venoject).

Neveras portátiles.

Material para electroenfoque:

Fuente de alimentación: Electroforesis Constant Power Supply ECPS 3000/150 (Pharmacia).

Cubetas: Gel Electrophoresis Apparatus GE - 2/4 (Pharmacia).

Flat Bed Apparatus FBE-3000 (Pharmacia).

Material complementario:

Papel Wathman 3MM.

Molde BIO-RAD.

Placas de cristal de 20 x 11,4 x 0,25.

Tiras electrónicas (Pharmacia).

5.3. PRODUCTOS

Productos utilizados en el tratamiento de la muestra y en el fenotipado de los marcadores genéticos:

Cloruro sódico (Merck).

Suero anti-A (Pronadisa).

Suero anti-A₁ lectina (Pronadisa).

Suero anti-B (Pronadisa).

Suero anti A y B (Pronadisa).

Suero anti-D (Dominion).

Suero anti-C (Menarini).

Suero anti-c (Dominion).

Suero anti-E (Dominion).

Suero anti-e (Dominion).

Suero anti-globulina humana (Biotest).

Suero Rh control (Dominion).

Células control Coombs (Dominion).

Suero anti-M (Dominion).

Suero anti-N (Dominion).

Suero anti-S (Menarini).

Suero anti-s (Dominion).

Productos utilizados en la elaboración de los soportes electroforéticos:

Acrylamide Ultrograde (LKB).

NN'-Methylene-Bisacrylamide Ultrograde (LKB).

Sacarosa (Merck).

Persulfato de amonio (Merck).

Silano (Pharmacia).

Temed (NN'-tetrametiletildiamina) (Sigma).

Anfolinas:

Ampholine 3,5-5 (LKB).

Ampholine 4-6 (LKB).

Ampholine 5-8 (LKB).

Pharmalyte 2,5-5 (Pharmacia).

Pharmalyte 4,2-4,9 (Pharmacia).

Pharmalyte 4-6,5 (Pharmacia).

Pharmalyte 4,5-5,4 (Pharmacia).

Pharmalyte 4,5-5,4 (Pharmacia).

Productos utilizados en la elaboración de soluciones tampón y
electródicas:

Acido fosfórico (Merck).

Acido acético (Merck).

Etanolamina (Merck).

Productos utilizados como sustrato y en el revelado:

Acido acético 100% (Merck).

Agua oxigenada 110 vol (C. Erba).

Agua ultrapura (Elgastat-UHQ).

Papel Wathman 3MM.

Azul de Comassie (LKB).

4-Metil-umbeliferil-fosfato (Sigma).

Acido cítrico (Sigma).

Hidróxido sódico (Fine Chemicals).

Metanol (Probus).

Acido tricloroacético (Merck).

Acido sulfosalicílico (Merck).

Dithiotreitol 0,05M (DTT) (Merck).

5.4. METODOLOGIA ESTADISTICA

Todos los datos fenotípicos obtenidos se procesaron empleando el paquete de software estadístico StatView, versión 4.0 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, California) y la aplicación Excel 4.0 (Microsoft Corporation).

5.4.1. POBLACIONES ESTUDIADAS

Nuestro estudio se ha realizado en la comarca natural de Las Arribes del Duero de la provincia de Salamanca considerando la población censada en mayo de 1996. La población total objeto de estudio es de 7662 habitantes.

Para la obtención de los datos de la población de cada municipio se solicitó autorización a cada corporación municipal para trabajar “in situ” con el censo del año 1991 al objeto de actualizarlo.

Los municipios que componen la comarca estudiada y el número de habitantes de cada uno de ellos se indican en la tabla 25.

Tabla 25. Población de la comarca de Las Arribes

Municipios	Número de habitantes	Entidades Menores
Aldeadávila	2159	Corporario, Salto de Aldeadávila.
Hinojosa de Duero	901	
La Fregeneda	650	
Masueco	490	
Mieza	437	
Pereña	549	
Saucelle	533	Salto de Saucelle
Vilvestre	682	
Villarino	1261	Cabeza de Framontanos

5.4.2. MUESTREO

La elección de los individuos que componen la muestra se realizó mediante un muestreo aleatorio simple, utilizando una tabla de números aleatorios.

Para calcular el tamaño de la muestra se aplica la siguiente expresión²⁹⁴:

$$\frac{t_{\alpha}^2 pq}{d^2}$$

siendo t la t de Student para un nivel de confianza de $(1 - \alpha)$ y d la máxima diferencia que se está dispuesto a admitir entre p y el valor \hat{p} que se obtenga

²⁹⁴ MARTIN ANDRES, A., LUNA DEL CASTILLO, J. D., *Biostatística para las Ciencias de la Salud*, págs. 155-156.

con dicha muestra. La idea es tener garantías de que tomando una muestra de tamaño n , la proporción poblacional p de individuos que verifican la característica es, con una confianza de $(1 - \alpha)$, alguno de los valores entre $\hat{p} \pm d$, con \hat{p} la proporción en la muestra y d un número dado de antemano (cuanto más pequeño, más precisa es la estimación).

El problema radica en que el tamaño de la muestra depende de p que es desconocido y es tanto mayor cuanto mayor sea la confianza del intervalo $(1 - \alpha)$ y cuanto menor sea d . Además la muestra será más grande cuanto más cercano sea p a 0,5, disminuyendo cuando nos enfrentamos a caracteres raros (p pequeño) o muy frecuentes (p grande).

La aplicación de la expresión anterior puede hacerse de dos modos:

- Utilizar para los distintos marcadores los valores de las frecuencias citados en la bibliografía.
- Considerar el reparto de frecuencias fenotípicas más desfavorable (mayor tamaño muestral).

En nuestro caso, se ha preferido la opción de considerar el reparto de fenotipos más desfavorable ($pq=1/4$), y fijando un nivel de confianza del 95%

y un error de 5% el tamaño de la muestra calculado, mediante la expresión anterior, resulta ser de 385 personas.

Como en nuestro caso la muestra se toma de una población de tamaño finito es preciso calcular la fracción de muestreo ($f = n/N$) con objeto de establecer si es necesario realizar una corrección por población finita. Cuando $f < 0,05$ el intervalo de confianza dado para p es bastante válido.

En nuestro caso la fracción de muestreo obtenida es $f = 0,05$, por lo que no es necesario corregir el tamaño muestral.

En la tabla 26 se detalla el número de personas muestreadas en cada municipio.

Tabla 26. Distribución de las muestras por municipios

Municipios	Número de muestras calculadas	Número de muestras tomadas
Aldeadávila	108	112
Hinojosa de Duero	45	50
La Fregeneda	33	37
Masueco	25	25
Mieza	22	27
Pereña	28	36
Saucelle	27	31
Vilvestre	34	34
Villarino	63	52
TOTAL	385	404

5.4.3. FRECUENCIA FENOTIPICA, GENOTIPICA Y GENICA

El conocimiento fenotípico de los individuos es el punto de partida para el estudio de una población.

Consideremos el caso sencillo de un locus autosómico A, con dos alelos diferentes, A_1 y A_2 presentes en todos los individuos. El número de individuos de cada uno de los tres genotipos, A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 equivale al número real de individuos de las tres clases fenotípicas si no hay dominancia, es decir si cada genotipo es fenotípicamente distinguible.

Sean n_1 , n_2 y n_3 los números de los genotipos A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 , respectivamente, de modo que $n_1+n_2+n_3 = N$. En este caso N correspondería al número de individuos que componen la muestra.

Las proporciones de A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 pueden representarse, respectivamente como x, y, z, y se denominan frecuencias genotípicas, siendo:

$$\frac{n_1}{N} = x \qquad \frac{n_2}{N} = y \qquad \frac{n_3}{N} = z$$

$$x + y + z = 1$$

En una población de N individuos existirán 2N alelos ya que cada individuo aporta 2 alelos.

Denominemos p y q , respectivamente, a las frecuencias génicas del alelo A_1 y del alelo A_2 .

Cada individuo homocigoto A_1A_1 aporta dos alelos A_1 , en tanto que cada heterocigoto A_1A_2 sólo aporta un alelo A_1 ; los homocigotos A_2A_2 no aportan en ningún caso alelos A_1 . Por consiguiente, el número total de alelos A_1 en la muestra será $2n_1 + n_2$, que referidos a un total de $2N$, proporciona un valor de p :

$$p = \frac{2n_1 + n_2}{2N}$$

Análogamente, cada individuo homocigoto A_2A_2 aporta dos alelos A_2 , en tanto que cada heterocigoto A_1A_2 sólo aporta un alelo A_2 ; los homocigotos A_1A_1 no aportan en ningún caso alelos A_2 . Por consiguiente, el número total de alelos A_2 en la muestra será $n_2 + 2n_3$, que referidos a un total de $2N$, proporciona un valor de q :

$$q = \frac{n_2 + 2n_3}{2N}$$

Estas frecuencias génicas pueden ser expresadas en función de las frecuencias de los genotipos:

$$p = \frac{n_1 + 1/2n_2}{N} = \frac{n_1}{N} + \frac{1/2n_2}{N} = x + 1/2y$$

$$q = \frac{1/2n_2 + n_3}{N} = \frac{1/2n_2}{N} + \frac{n_3}{N} = 1/2y + z$$

Cuando el número de alelos es mayor de dos, se puede deducir que la frecuencia génica (f) de cada uno de ellos será siempre igual al número de homocigotos (para ese alelo más la mitad de los heterocigotos (Hh), dividido todo ello por el número de individuos estudiados. Es decir:

$$f = \frac{HH + Hh/2}{N}$$

Los sistemas polimórficos ABO, Rh y MNSs se deben estudiar de forma diferente, bien por existir fenómenos de dominancia y recesividad o bien por que la transmisión de los alelos se realiza por haplotipos. Para obtener las frecuencias de un sistema polimórfico que se aproximen a una solución de máxima verosimilitud es necesario obtener en primer lugar unos valores que deberán ser posteriormente corregidos.

Para el cálculo de las frecuencias génicas del sistema ABO se ha aplicado el método de Fisher²⁹⁵, aplicando las siguientes expresiones:

$$r = \sqrt{\bar{O}}$$

$$p_1 = \sqrt{(\bar{O} + \bar{A}_1 + \bar{A}_2)} - \sqrt{(\bar{O} + \bar{A}_2)}$$

$$p_2 = \sqrt{(\bar{O} + \bar{A}_2)} - \sqrt{\bar{O}}$$

$$q = \sqrt{(\bar{O} + \bar{B})} - \sqrt{\bar{O}}$$

siendo \bar{A}_1 , \bar{A}_2 , \bar{B} y \bar{O} las frecuencias fenotípicas y p_1 , p_2 , q y r las respectivas frecuencias génicas.

En la práctica la suma de p_1+p_2+q+r no da como resultado exactamente la unidad.

²⁹⁵ MOURANT, A. E., KOPEC, A. C., DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K., *The distribution of the human blood groups*, págs. 51-52, MUÑOZ, J. L., RODRIGUEZ CALVO, M. S., “Estima de frecuencias génicas”. En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas biostatísticos en genética forense*, págs. 23-24.

Llamando D a la desviación de 1, de acuerdo con Fisher puede encontrarse una mejor corrección de las frecuencias génicas con la siguiente corrección:

$$p_{1c} = p_1 / (1-D)$$

$$p_{2c} = p_2 / (1-D)$$

$$q_c = q / (1-D)$$

$$r_c = r / (1-D)$$

$$\text{siendo } D = 1 - (p_1 + p_2 + q + r)$$

Para el cálculo de las frecuencias génicas del sistema Rh se han aplicado las siguientes expresiones²⁹⁶:

$$\overline{cde} = \sqrt{ccddee} \quad (1)$$

$$\overline{cDe} = \sqrt{ccDee + ccddee} - \overline{cde} \quad (2)$$

$$\overline{Cde} = \frac{\overline{Ccddee}}{2\overline{cde}} \quad (3)$$

²⁹⁶ MUÑOZ, J. L., RODRIGUEZ CALVO, M. S., "Estima de frecuencias génicas". En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas biostatísticos en genética forense*, págs. 24-25,

$$\overline{cdE} = \frac{\overline{ccddEe}}{2\overline{cde}} \quad (4)$$

$$\overline{CDe} = \sqrt{\overline{Cde}^2 + \overline{CCDee}} - \overline{Cde} \quad (5)$$

$$\overline{cDE} = \sqrt{\overline{cdE}^2 + \overline{ccDEE}} - \overline{cdE} \quad (6)$$

$$\overline{CDE} = \frac{\overline{CCDEe}}{2(\overline{CDe} + \overline{Cde})} \quad (7)$$

La frecuencia del haplotipo Cde es cero en casi todas las poblaciones o no más de 0,00005²⁹⁷.

Estas estimaciones preliminares se corrigen multiplicando (3), (5) y (7) por

$$\frac{\overline{C}}{(\overline{CDe} + \overline{Cde} + \overline{CDE})}$$

donde \overline{C} es la frecuencia total del gen C que se obtiene contando los genes, es decir²⁹⁸:

$$C = (2CDE/C + CDE/c + 2CDe/C + Cde/c + 2Cde/C + Cde/c + 2CdE/C + CdE/c) / 2N$$

²⁹⁷ RACE, R. R., MOURANT, A. E., MACFARLANE, M. N., "Travaux récents sur les antigènes et anticorps Rh avec une étude particulière de la théorie de Fisher", *Revue d'Hématologie*, vol. 1, pág. 16.

²⁹⁸ BOYD, W. C., "Shortened maximum likelihood estimation of Rh gene frequencies", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 6, pág. 317.

(4) y (6) por

$$\frac{(\bar{E} - \overline{CDE})}{(\overline{cDE} + \overline{cdE})}$$

donde

$$\bar{E} = 1 - \sqrt{cde + cDe + Cde/c + CDe/c + Cde/C + CDe/C}$$

(1) y (2) por

$$\frac{1 - (\bar{C} + \bar{E}) + \overline{CDE}}{(\overline{cDe} + \overline{cde})}$$

La suma de las frecuencias así obtenidas se aproxima a la unidad y, a menudo, difieren de las estimadas por el método de máxima verosimilitud en menos que un error estandar.

5.4.4. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

La Ley de Hardy-Weinberg, ley básica para estudiar la genética de la población, debe su nombre a Hardy, matemático inglés, y a Weinberg, médico alemán, quienes la formularon, en 1908, independientemente uno de otro.

Las frecuencias de los genotipos de un locus cualquiera de genes, en una población cuyos apareamientos se hacen al azar, se obtienen según las frecuencias relativas de los alelos en la población.

Se afirma que una población se halla en equilibrio Hardy-Weinberg cuando los diferentes genotipos existen según estas proporciones.

El equilibrio Hardy-Weinberg puede ser alterado por varios factores, como el apareamiento no al azar, la mutación, la selección y la migración.

La deducción matemática de esta ley parte del hecho de que el apareamiento aleatorio entre individuos es equivalente a la unión aleatoria de sus gametos.

Consideremos un locus autosómico dialélico, con las frecuencias génicas y genotípicas (tabla 27).

Tabla 27. Frecuencias génicas y genotípicas

	Genes		Genotipos		
	A_1	A_2	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
Frecuencias	p	q	x	y	z

Como existen tres posibles fenotipos, hay en total nueve posibles tipos de apareamiento y sus frecuencias, cuando el cruce es al azar, se indican en la tabla 28.

Tabla 28. Tipos de apareamiento y sus frecuencias

Genotipos del progenitor femenino y sus frecuencias		Genotipos del progenitos masculino y sus frecuencias		
		A_1A_1 x	A_1A_2 y	A_2A_2 z
A_1A_1	x	x^2	xy	xz
A_1A_2	y	xy	y^2	yz
A_2A_2	z	xz	yz	z^2

Puesto que el sexo del progenitor es irrelevante en este contexto, algunos de los tipos de apareamiento son equivalentes y su número se reduce a seis.

Sumando las frecuencias de los tipos de apareamiento que resultan equivalentes, se obtiene la frecuencia de los tipos de apareamiento.

Para hallar la frecuencia de cada genotipo en la progenie total, se suma las frecuencias de cada tipo de apareamiento. Las sumas, tras simplificación, resultan iguales a p^2 , $2pq$, q^2 , como se indica en la tabla 29.

Estas son las frecuencias de equilibrio Hardy-Weinberg, que se obtienen en una sola generación de apareamiento aleatorio.

Conviene hacer notar que las frecuencias genotípicas dependen sólo de las frecuencias génicas en los progenitores, y no de las frecuencias genotípicas parentales, siempre y cuando los progenitores se apareen al azar.

Tabla 29. Frecuencias genotípicas de los tipos de apareamiento

Apareamiento		Genotipo y frecuencia de la progeie		
Tipo	Frecuencia	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2
$A_1A_1 \times A_1A_1$	x^2	x^2	-	-
$A_1A_1 \times A_1A_2$	$2xy$	xy	xy	-
$A_1A_1 \times A_2A_2$	$2xz$	-	$2xz$	-
$A_1A_2 \times A_1A_2$	y^2	$1/4y^2$	$1/2y^2$	$1/4y^2$
$A_1A_2 \times A_2A_2$	$2yz$	-	yz	yz
$A_2A_2 \times A_2A_2$	x^2	-	-	z^2
	sumas	$(x + 1/2y)^2$	$2(x + 1/2y)(1/2y + z)$	$(z + 1/2y)^2$
		p^2	$2pq$	q^2

Las propiedades de la población con respecto a un solo locus, expresadas por medio de la ley de Hardy-Weinberg son las siguientes²⁹⁹:

- Las frecuencias génicas y genotípicas de una población son estables cuando se cumplen las condiciones de panmixia, tamaño de población y ausencia de migración, mutación y selección.

²⁹⁹ LACADENA, J. R., *Genética*, pág. 1016.

- En las condiciones anteriores las frecuencias genotípicas de la descendencia dependen sólo de las frecuencias génicas de la generación parental.
- Si por cualquier causa se alterara el equilibrio en una población, pero volvieran a reestablecerse las condiciones de Hardy-Weinberg, el equilibrio se alcanzaría en la siguiente generación.

Los principios del equilibrio Hardy-Weinberg no se complican demasiado cuando el número de alelos de un determinado sistema sea superior a dos, siempre que las condiciones anteriormente expuestas se mantenga.

Por tanto, a partir de las frecuencias fenotípicas observadas podemos llegar a conocer las frecuencias génicas correspondientes, y a partir de ellas, se puede conocer la frecuencia fenotípica esperada en la población estudiada. Por consiguiente, se puede averiguar la existencia o no de equilibrio Hardy-Weinberg, confrontando los valores de las frecuencias fenotípicas absolutas empíricas con las frecuencias fenotípicas absolutas teóricas. Para comparar estos valores observados y teóricos se emplea el parámetro de χ^2 (ji-cuadrado).

El valor obtenido para el estadístico χ^2 se obtiene mediante la siguiente expresión:

$$\chi^2 = \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

siendo O_i las frecuencias absolutas empíricas, E_i las frecuencias absolutas teóricas, y siendo el número de grados de libertad igual al número de fenotipos menos el número de alelos. El nivel de significación que hemos considerado sistemáticamente en nuestro trabajo es $= 0,05$.

El test exige ciertas condiciones de validez. Suele admitirse que ninguna frecuencia esperada sea menor que 1 y no más del 20% de ellas sean inferiores o iguales que 5³⁰⁰.

También se hace precisa una corrección por continuidad cuando el número de clases sea igual o menor que 4.

Para los sistema ABO, MNSs, Gc, Pi y Acp no fue precisa la corrección por continuidad.

³⁰⁰ MARTIN ANDRES, A., LUNA DEL CASTILLO, J. D., *Bioestadística para las ciencias de la salud*, pág. 325.

5.4.5. INDICE DE HETEROCIGOSIDAD

Este índice, o proporción de heterocigotos, es un parámetro indicativo de la cuantía del polimorfismo estudiado en una determinada población. Además, indica la eficacia del sistema, siendo tanto mayor cuanto más repartidos estén los fenotipos para cada sistema.

En una población en equilibrio Hardy-Weinberg se puede estimar la heterocigosidad media, examinando la proporción de heterocigotos por locus³⁰¹.

El cálculo de la frecuencia de heterocigotos en un locus determinado se realiza mediante la expresión³⁰²:

$$h = \frac{n_{uv}}{N}$$

siendo n_{uv} el número de A_uA_v individuos en ese locus y N el número de individuos estudiados.

³⁰¹ LACADENA, J. R., *Genética*, pág. 1082.

³⁰² RODRIGUEZ CALVO, M. S., MUÑOZ BARUS, J. I., "Parámetros estadísticos de eficacia a priori". En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, pág. 65.

5.4.6. COMPARACION DE POBLACIONES

Resulta interesante verificar la existencia o no de heterogeneidad entre la población estudiada y otras de características similares. Para ello se comparan los valores de las frecuencias alélicas para cada uno de los sistemas de marcadores genéticos considerados en este trabajo.

Con este fin se utiliza el estadístico χ^2 en tablas de contingencia. Si la hipótesis nula es cierta, las frecuencias observadas difieren de las esperadas solamente por variación muestral y no porque el modelo sea falso.

La corrección por continuidad, en este trabajo, no es preciso realizarla pues el número de casillas es siempre superior a 4.

Para determinar el número de grados de libertad para el contraste de tablas de contingencia, se atiende a la proporción fila-columnas. Así:

$$g. l. = [(filas - 1) \times (columnas - 1)]$$

5.4.7. PROBABILIDAD DE PATERNIDAD

Clásicamente se ha considerado a la exclusión de paternidad una prueba segura y a la afirmación de la paternidad una imposibilidad técnica. En la

actualidad, no es admisible no excluir una paternidad e ignorar simultáneamente la prueba positiva, que en muchos casos puede tener un valor como evidencia tan alto o más que una exclusión, es decir la probabilidad de paternidad debe calcularse siempre que no se logre excluir al supuesto padre³⁰³.

Aunque existen varios métodos para calcular la probabilidad de paternidad, todos ellos se basan en el teorema de Bayes, que define el cálculo de las probabilidades condicionadas.

El teorema de Bayes dice que si A_1, A_2, \dots, A_k son k sucesos incompatibles dos a dos y exhaustivos (la unión de todos ellos es el suceso seguro) y B es un suceso cualquiera, entonces³⁰⁴:

$$P(A_r/B) = \frac{P(A_r) \times P(B/A_r)}{\sum_{i=1}^k P(A_i) \times P(B/A_i)}$$

fórmula válida para $r = 1, 2, \dots, k$.

A las cantidades $P(A_i)$ se les denomina probabilidades “a priori”, a las cantidades $P(A_i/B)$ se les llama probabilidades a posteriori y a las cantidades $P(B/A_i)$ se las llama verosimilitudes.

³⁰³ HUGUET, E., CARRACEDO, A., “Investigación de la paternidad”. En: GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, pág. 1039.

³⁰⁴ MARTIN ANDRES, A., LUNA DEL CASTILLO, J. D., *Bioestadística para las ciencias de la salud*, pág. 62.

Consideremos el supuesto más sencillo: un solo hombre involucrado y un sistema dialéctico codominante. Para aplicar este teorema a este caso, es necesario establecer dos hipótesis mutuamente excluyentes:

- La hipótesis H_1 según la cual el presunto padre es realmente el padre biológico del niño.
- La hipótesis H_2 según la cual el presunto padre no puede ser el padre biológico del niño.

A estas dos hipótesis podemos otorgarles unas probabilidades “a priori”, P_o para H_1 y $1-P_o$ para H_2 . La suma de ambas probabilidades es 1, ya que alguna necesariamente tiene que suceder.

Se puede calcular la probabilidad condicional de observar los tres fenotipos, P del padre, M de la madre y N del hijo, bajo las dos hipótesis antes consideradas³⁰⁵.

Si la hipótesis H_1 es cierta, basta calcular la probabilidad de observar esos tres fenotipos (P, M y N) conjuntamente. Se supone, por definición, que los

³⁰⁵ SALMON, CH, SALMON, D., MULLER, J. Y., SEGER, J., “Groupes sanguins, groupes de protéines et groupes tissulaires dans la recherche de paternité”. En: DEROBERT, L., *Medecine Legale*, págs. 785-786.

padres no tienen ningún grado de parentesco y sus fenotipos son, por consiguiente, independientes. Según esto la probabilidad del trío (P, M y N) cuando el presunto padre es el padre biológico del niño, después de analizados los distintos marcadores genético-moleculares heredables, se puede expresar de la forma siguiente:

$$\Pr(P, M, \text{ y } N/H_1) = \Pr(P) \times \Pr(M) \times \Pr(N/P \times M)$$

Es decir, la probabilidad del trío cuando el presunto padre es el padre biológico, es igual a la probabilidad de que ese padre (P) sea así, por la probabilidad de que esa madre (M) sea así (son dos individuos independientes uno del otro) por la probabilidad de que ese hijo provenga de esa pareja.

La probabilidad condicional de los fenotipos bajo la hipótesis H_2 es igual al producto de la probabilidad de observar una pareja fenotípica madre-hijo MN por la probabilidad de observar al azar el fenotipo P del hombre falsamente acusado de paternidad. En efecto, el fenotipo de este hombre es independiente, bajo la hipótesis H_2 , de los de la pareja madre-hijo.

$$\Pr(P, M, \text{ y } N/H_2) = \Pr(P) \times \Pr(M) \times \Pr(N/M)$$

Es decir, la probabilidad del trío cuando el presunto padre no es el padre biológico, es igual a la probabilidad de que ese padre (P) sea así, por la probabilidad de que esa madre (M) sea así (son dos individuos independientes

uno del otro) por la probabilidad de que ese hijo (N) provenga de esa madre (M) (el padre es independiente del hijo en esa situación).

A partir de las probabilidades “a priori” (P_o) y a partir de las probabilidades condicionales determinadas para las dos hipótesis H_1 y H_2 según las fórmulas precedentes, es posible aplicar el teorema de Bayes, que nos dará la probabilidad a posteriori de paternidad del presunto padre:

$$P(W) = \frac{P_o \times \Pr(H_1)}{P_o \times \Pr(H_1) + (1 - P_o) \times \Pr(H_2)}$$

Sustituyendo $p(H_1)$ y $p(H_2)$ por las fórmulas obtenidas anteriormente:

$$P(W) = \frac{P_o \times \Pr(P) \times \Pr(M) \times \Pr(N/P \times M)}{P_o \times \Pr(P) \times \Pr(M) \times \Pr(N/P \times M) + (1 - P_o) \times \Pr(P) \times \Pr(M) \times \Pr(N/M)}$$

Considerando que P_o tiene un valor de 0,5, es decir, concediendo “a priori” al supuesto padre la misma probabilidad de ser el padre como de no serlo, la fórmula anterior se puede simplificar:

$$P(W) = \frac{\Pr(N/P \times M)}{\Pr(N/P \times M) + \Pr(N/M)}$$

Esta expresión denominada ecuación de Essen-Möller, se expresa habitualmente como:

$$W = \frac{X}{X + Y}$$

e indica la probabilidad que tiene ese individuo de ser el padre (X), comparado con un hombre tomado al azar de la población (Y). El valor X depende exclusivamente de los resultados de los análisis realizados al trío, mientras el valor Y corresponde a la frecuencia en la población del alelo del hijo que obligadamente ha recibido del padre. Por ello, para poder realizar la prueba de paternidad es necesario realizar un estudio previo de las frecuencias de los marcadores estudiados en la población.

Además del valor W se usan, a menudo, otros parámetros para presentar la probabilidad de paternidad, como es el índice de paternidad (IP) que es el cociente X/Y y relaciona la probabilidad del supuesto padre X con la probabilidad de paternidad de un hombre tomado al azar Y.

También se utiliza el llamado valor Essen-Möller (EM) que es el $\log Y/X+10$.

La ecuación de Essen-Möller se puede expresar:

$$W = \frac{X}{X + Y} = \frac{\frac{X/Y}{Y}}{\frac{X/Y}{Y} + 1} = \frac{X/Y}{X/Y + 1} = \frac{IP}{IP + 1}$$

De donde: $IP = \frac{W}{(1 - W)}$

El valor obtenido para la probabilidad de paternidad está entre 0 y 1, o expresado en porcentaje entre 0 y 100%. El valor matemático obtenido se suele expresar, de forma más fácilmente inteligible, en forma de los llamados predicados verbales de Hummel, a los que ya se hizo referencia en el apartado 2.3 de esta memoria.

Para sistemas codominantes la aplicación del teorema de Bayes y de la fórmula de Esen-Moller es muy sencilla, ya que es fácil de deducir que el valor de X será de 1 para los homocigotos y de 0,5 para los heterocigotos e Y la frecuencia génica del alelo que el padre transmite al niño. Se exceptúan las combinaciones en las que madre y niño, ambos heterocigotos, tienen el mismo fenotipo. En este caso, cuando el presunto padre posee algún alelo no presente en madre y niño, la probabilidad de paternidad (W) vendrá dada por la expresión:

$$W = \frac{1/2}{1/2 + a + b}$$

siendo a y b las frecuencias génicas de los alelos presentes en madre y niño.

Si los alelos que el padre posee están presentes en la madre y en el niño, la probabilidad de paternidad (W) vendrá dada por la fórmula:

$$W = \frac{1}{1 + a + b}$$

siendo a y b las frecuencias génicas de los alelos presentes en madre y niño.

Para sistemas con fenómenos de dominancia y recesividad los cálculos se complican y en este caso hemos aplicado para el cálculo de las probabilidades de paternidad el método Logic II, también denominado “Barrido de genotipos” aprobado por la AABB (The American Associations of Blood Banks) en 1982, basado en la aplicación directa del teorema de Bayes.

También es relativamente común utilizar tablas como las de Hummel en las que para determinados marcadores de cálculo difícil está indicada la probabilidad de paternidad para cada combinación. Su problema es que utilizan frecuencias génicas de la población alemana y aplicadas a nuestra población producen un error de más o menos un predicado verbal³⁰⁶.

Una vez se conocen los valores W o los valores X e Y para cada

³⁰⁶ CARRACEDO, A., HUGUET, E., BARROS, F., “Parámetros estadísticos en la investigación biológica de la paternidad. Exclusión y prueba positiva de paternidad”. En : HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, págs. 182-183.

marcador, el cálculo de la probabilidad de paternidad global o acumulada es muy sencillo pues el valor X global es el producto de todos los valores X parciales y el valor Y global el producto de todos los Y parciales, de modo que:

$$W \text{ acumulativa} = \frac{X_a \cdot X_b \dots X_n}{X_a \cdot X_b \dots X_n + Y_a \cdot Y_b \dots Y_n}$$

5.5. METODOLOGIA ANALITICA

5.5.1. TOMA Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Las extracciones fueron realizadas por personal sanitario, colaborador habitual de nuestro Departamento y fue necesario desplazarse a los domicilios de los distintos voluntarios seleccionados.

La muestra de sangre de cada individuo se obtuvo mediante punción venosa, utilizando el sistema de extracción VenoJect, obteniéndose aproximadamente 8 ml de sangre.

Las muestras, una vez extraídas en cada municipio, se sometieron a refrigeración a 4°C y cada día, al terminar, mediante una nevera portátil fueron trasladadas a nuestro laboratorio donde se conservaron en refrigeración a 4°C.

A continuación y, en todo caso, antes de transcurrir 24 horas desde la toma de la muestra, se procedió a la separación del plasma, la interfase que contiene las células nucleadas y los hematíes mediante centrifugación a 1500 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Se recogieron dos alícuotas, aproximadamente 2 ml cada una, de plasma en tubos eppendorf, convenientemente etiquetados, que se almacenaron a -20°C hasta el momento de su fenotipado.

Se recogió la interfase y se procedió a la extracción del ADN³⁰⁷. Estas muestras de ADN han sido almacenadas a -20°C .

Los hematíes se lavaron con solución salina isotónica al menos dos veces. El paquete eritrocitario fue repartido en tres alícuotas en tubos convenientemente etiquetados, dos de las cuales (de aproximadamente 2 ml) se almacenaron a -20°C hasta el momento de su fenotipado y otra fue utilizada para realizar el tipaje de los sistemas sanguíneos.

Dada la importancia de la muestra de población tomada para la realización de este estudio se estimó conveniente conservar en perfecto estado alícuotas de plasma, hematíes lavados y ADN para posteriores estudios.

5.5.2. METODOS DE AGLUTINACION

Con la alícuota reservada al efecto, se preparó una suspensión de

³⁰⁷ SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, vol. 2, pág. 9.14.

hematíes al 5% en solución salina isotónica para la determinación de los sistemas ABO, Rh y MNSs.

Estas determinaciones están basadas en los principios de aglutinación, directa o indirecta. Los hematíes humanos provistos de un determinado antígeno aglutinarán en presencia del correspondiente reactivo con el anticuerpo específico, mientras que los desprovistos de dicho antígeno no aglutinarán. Este sería el caso de la técnica de aglutinación directa. En la indirecta es necesario la adición de un suero antiglobulina humana para hacer visible la aglutinación tras la incubación de los eritrocitos que posean los antígenos con los anticuerpos correspondientes.

En ningún caso debe ser visible una hemólisis.

Todas las muestras deben ser manipuladas como si potencialmente fueran capaces de transmitir enfermedades infecciosas.

5.5.2.1. Sistema ABO

El tipaje ABO debe ser realizado simultáneamente sobre los hematíes (prueba globular) y sobre el suero o plasma (prueba sérica).

Para la prueba sérica se utilizó plasma de una de las alícuotas antes de su congelación.

Las reactivos anti-A, anti-B y anti-AB aglutinarán los hematíes provistos de Ag A o/y B, mientras que no aglutinarán para los hematíes del grupo O. Los resultados de la prueba globular deberán ser confirmados por la prueba sérica realizada ensayando el suero con los hematíes de los grupos conocidos A₁, A₂, B y O.

El método fue desarrollado sobre placa (15-25°C) y el modo operativo es el siguiente:

1. Sobre una placa de opalina depositar 20 µl de reactivo anti-A₁, 20 µl de reactivo anti-A₂, 20 µl de reactivo anti-B y 20 µl de reactivo anti-AB.
2. Añadir 20 µl de la suspensión de hematíes a cada una de las gotas de reactivo.
3. Para cada test, mezclar reactivo y hematíes con la ayuda de una varilla de vidrio de manera que se obtenga un círculo de 2 cm de diámetro. Cambiar la varilla de vidrio entre cada reacción.
4. Agitar suavemente la placa con movimientos de oscilación y observar aglutinación en 3 min.

Interpretación:

Una reacción de aglutinación de los hematíes en presencia del reactivo es un resultado positivo e indica la presencia del Ag correspondiente.

La ausencia de una reacción de aglutinación de los hematíes es un resultado negativo e indica que el Ag correspondiente no está presente.

Las reacciones esperadas con los reactivos anti-A, anti-B y anti-AB, y los hematíes test A₁, A₂, B y O con su interpretación son detalladas en la tabla 30.

Tabla 30. Reacciones esperadas con los reactivos Anti-A, anti-B y anti-Ab

GRUPOS	Prueba globular: reactivos			Prueba sérica: hematíes			
	Anti-A _(1 y/o 2)	Anti-B	Anti-AB	A ₁	A ₂	B	O
A	+	0	+	0	0	+	0
B	0	+	+	+	+	0	0
AB	+	+	+	0	0	0	0
O	0	0	0	+	+	+	0

La prueba globular y la prueba sérica efectuadas simultáneamente deben ser concordantes.

En la siguiente tabla 31 se indican los genotipos, fenotipos, Ag de membrana y Ac séricos correspondientes en este sistema.

Tabla 31. Genotipos, fenotipos, Ag de membrana y Ac séricos del sistema ABO

GENOTIPO		FENOTIPO	Ag hematíes	Ac suero
AA	AO	A	A	anti-B
BB	BO	B	B	anti-A
	AB	AB	A y B	
	OO	O		anti-A y anti-B

5.5.2.2. Sistema Rh

La determinación de los antígenos del sistema Rh está basado en el principio de aglutinación directa.

La incubación de los eritrocitos humanos a determinar con el reactivo (suero anti-D, anti-C, anti-c, anti-E y/o anti-e) dará como resultado una reacción específica Ag-Ac si el antígeno correspondiente está presente en los eritrocitos. La detección de esta reacción será por visualización de la aglutinación. La no aglutinación indica la ausencia del antígeno Rh correspondiente en los eritrocitos.

Para confirmar la ausencia de aglutinación inespecífica asociada a constituyentes del medio de reacción ha de realizarse en paralelo un test control.

El método fue desarrollado en tubo y el modo operativo es el siguiente:

1. Poner 20 μ l del reactivo apropiado en un tubo marcado.
2. Poner 20 μ l del suero control Rh-hr en un segundo tubo marcado.
3. Adicionar 20 μ l de la suspensión de hematíes en cada tubo.
4. Mezclar cada tubo cuidadosamente.
5. Centrifugar 30 s a 3200-3400 rpm.
6. Resuspender el botón celular del fondo de cada tubo y observar macroscópicamente la aglutinación.
7. Incubar los test negativos y los controles 15 min. a 37°C.
8. Repetir los pasos 6 y 7.

Interpretación:

Según la teoría génica de Fisher-Race, el sistema Rh se hereda como consecuencia de 3 locus muy próximos y cada uno de ellos con dos alelos alternativos. La herencia se da como haplotipo de tres, tal y como se muestra en la tabla 32.

Tabla 32. Genes, alelos y haplotipos del sistema Rh

Genes	Alelos	Haplotipos
D	D, d	DCE
C	D, c	DCe
E	E, e	DcE
		Dce
	d: amorfo	dCE
		dCe
		dcE
		dce

La aglutinación indica la presencia del antígeno correspondiente en los eritrocitos, y por tanto la prueba se considera positiva. La ausencia del antígeno en los eritrocitos se manifiesta por ausencia de aglutinación, y con ello la prueba sería negativa.

A partir de los resultados obtenidos en estas pruebas los fenotipos correspondientes son los que aparecen en la tabla 33.

Tabla 33. Fenotipos Rh según la aglutinación Ag-Ac

Anti-C	Anti-c	Anti-D	Anti-E	Anti-e	FENOTIPO
+	+	+	+	+	CcDdEe
+	+	+	+	-	CcDdE
+	+	+	-	+	CcDde
+	+	-	+	+	CcdEe
+	+	-	+	-	CcdE
+	+	-	-	+	Ccde
+	-	+	+	+	CDdEe
+	-	+	+	-	CDdE
+	-	+	-	+	CDde
+	-	-	+	+	CdEe
+	-	-	+	-	CdE
+	-	-	-	+	Cde
-	+	+	+	+	cDdEe
-	+	+	+	-	cDdE
-	+	+	-	+	cDde
-	+	-	+	+	cdEe
-	+	-	+	-	cdE
-	+	-	-	+	cde

5.5.2.3. Sistema MNSs

La determinación de los antígenos MN está basado en el principio de aglutinación directa.

Los eritrocitos humanos que poseen el antígeno M en presencia de anticuerpos anti-M aglutinan y serán clasificados como M positivos, mientras que los que carecen de antígeno M no aglutinan en presencia de anticuerpos

anti-M y entonces serán clasificados M negativos. De manera análoga la presencia o ausencia de antígeno N se determina con anticuerpos anti-N, tal que la aglutinación indica la presencia de dicho antígeno y la no aglutinación su ausencia.

Este par de antígenos está en estrecha relación con los antígenos S y s.

La determinación de los antígenos S y s está basada en el principio de aglutinación indirecta. Tras incubación con el anticuerpo correspondiente, los eritrocitos que posean el antígeno S y/o s aglutinarán cuando sean determinados por el método de la antiglobulina indirecto.

Se deben realizar controles positivos y negativos: eritrocitos humanos conocidos por poseer o por carecer del antígeno M o N, son tratados simultáneamente junto a eritrocitos humanos de los individuos estudiados para controlar la actividad de los reactivos anti-M y anti-N.

El método fue desarrollado en tubo y el modo operativo es el siguiente:

A. Para determinar la presencia de antígenos M o N:

1. En un tubo añadir 40 µl del reactivo apropiado (suero anti-M o anti-N).
2. Añadir 20 µl de la suspensión de hematíes en cada tubo.

3. Mezclar el contenido del tubo e incubar 15 min. a 4°C, en el tubo con suero anti-M, y a 37°C, en el tubo con suero anti-N.

4. Centrifugar durante 15 s a 3200-3400 rpm.

5. Resuspender suave y rápidamente el botón celular del fondo del tubo y observar macroscópicamente la aglutinación

B. Para determinar la presencia de antígeno S:

1. En un tubo añadir 20 µl del reactivo.

2. Añadir 20 µl de la suspensión de hematíes en cada tubo.

3. Mezclar el contenido del tubo e incubar 15-20 min a 37°C.

4. Lavar las células al menos tres veces en solución salina isotónica. Hay que decantar completamente la solución salina y resuspender el botón celular antes de adicionar la solución salina para el siguiente lavado.

5. Adicionar 40 µl de suero antiglobulina humana polivalente.

6. Mezclar bien antes de centrifugar durante 1 min. a 1000 rpm.

7. Resuspender suavemente el botón celular del fondo del tubo y observar macroscópicamente la aglutinación.

8. Si la aglutinación no es visible, adicionar una gota de células control de Coombs y repetir los pasos 7 y 8; ahora la reacción debe ser positiva.

C. Para determinar la presencia de antígenos:

1. En un tubo añadir 20 µl del reactivo.
2. Añadir 20 µl de la suspensión de hematíes en cada tubo.
3. Mezclar el contenido del tubo e incubar 15 min a 37°C.
4. Lavar las células al menos tres veces en solución salina isotónica. Hay que decantar completamente la solución salina y resuspender el botón celular antes de adicionar la solución salina para el siguiente lavado.
5. Adicionar 40 µl de suero antiglobulina humana polivalente.
6. Mezclar bien antes de centrifugar durante 1 min. a 1000 rpm.
7. Resuspender suavemente el botón celular del fondo del tubo y observar macroscópicamente la aglutinación.

Interpretación:

La aglutinación de los hematíes en presencia del reactivo es un resultado positivo e indica la presencia del antígeno correspondiente. En caso contrario el resultado de la prueba sería negativo.

En la tabla 34 aparecen los genotipos, fenotipos y los antígeno presentes en la membrana del eritrocito, para los distintos grupos de este sistema.

Tabla 34. Genotipos, fenotipos y antígenos MNSs

GENOTIPO	FENOTIPO	Ag hematíes
MS MS	MS	M y S
MS Ms	MSs	M, S y s
Ms Ms	Ms	M y s
NS NS	NS	N y S
NS Ns	NSs	N, S y s
Ns Ns	Ns	N y s
MS NS	MNS	M, N y S
MS Ns	MNSs	M, N, S y s
Ms NS		
Ms Ns	MNs	M, N y s

En la siguiente tabla 35 se recogen los fenotipos correspondientes a los resultados obtenidos.

Tabla 35. Fenotipos MNSs obtenidos según Ag-Ac

Anti-M	Anti-N	Anti-S	Anti-s	FENOTIPO
+	0	+	0	MS
+	0	0	+	Ms
+	0	+	+	MSs
0	+	+	0	NS
0	+	0	+	Ns
0	+	+	+	NSs
+	+	+	0	MNS
+	+	0	+	MNs
+	+	+	+	MNSs

5.5.3. METODOS ELECTROFORETICOS

5.5.3.1. Sistema Gc

La separación de los subtipos de los grupos Gc se llevó a cabo mediante técnicas de isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (PAGIF) siguiendo la técnica descrita en 1979 por Hoste³⁰⁸.

La preparación de la solución de polímero de poliacrilamida se efectuó con 6 g de acrilamida, 0,2 g bisacrilamida, 12 de sacarosa y 100 ml de agua ultrapura.

La fabricación de cada gel de poliacrilamida se realizó tomando 11 ml de la solución de polímero de poliacrilamida a la que, previa desgasificación, se añadía 0,7 ml de Ampholine de rango 4-6, 0,15 ml de Pharmalyte de rango 4-6,5 y 0,3 ml de Pharmalyte de rango 4,5-5,4. La polimerización del gel se realizó añadiendo a la mezcla 0,6 ml de solución de persulfato de amonio al 1% y, después de una suave agitación, 20 µl de Temed.

Los geles se prepararon con un espesor de 0,3 mm. Para ello, la solución penetró por capilaridad entre el molde BIO-RAD y una placa de cristal tratada previamente con silano para que el gel se adhiriera a la misma (se había

³⁰⁸ HOSTE, B, "Group-specific component (Gc) and transferrin (Tf) subtypes ascertained by isoelectric focusing. A simple nonimmunological staining procedure for Gc", *Hum. Genet.*, vol. 50, págs. 75-79.

sumergido la placa de cristal, durante una hora, en una solución de 0,4 ml de silano en un litro de agua ultrapura llevado a pH 3,5 con ácido acético glacial y secada a temperatura ambiente).

La polimerización se realizó durante una hora.

Los geles, una vez fabricados, fueron inmediatamente utilizados o bien se conservaron en cámara húmeda a 4°C hasta su utilización en un periodo máximo de 24 horas.

Las soluciones utilizadas para los electrodos fueron ácido acético al 1% para el ánodo y etanolamina al 1% para el cátodo. Se aplicaron sobre el gel mediante tiras electródicas.

Las muestras fueron aplicadas (sin diluir) sobre el gel a 2 cm, aproximadamente, del extremo catódico mediante papel Whatman.

Las condiciones de la focalización fueron:

1° Prerun durante 45 minutos (sin muestras) a: 8 W, 151 mA y 1500 V.

2° Focalización durante 3 horas y 30 minutos a: 5 W, 151 mA y 1500 V.

Los papeles Whatman que contenían las muestras se retiraron a los 30 minutos de iniciada la migración.

La visualización de las bandas Gc se llevó a cabo por simple

precipitación. Al concluir el isoelectroenfoque, se sumergía la placa en una solución preparada con 1 g de ácido tricloroacético, 4 g de ácido sulfosalicílico, 110 ml de metanol y 220 ml de agua ultrapura.

A los pocos minutos, unos 15, tenía lugar la visualización de la bandas de precipitación (fig.13).

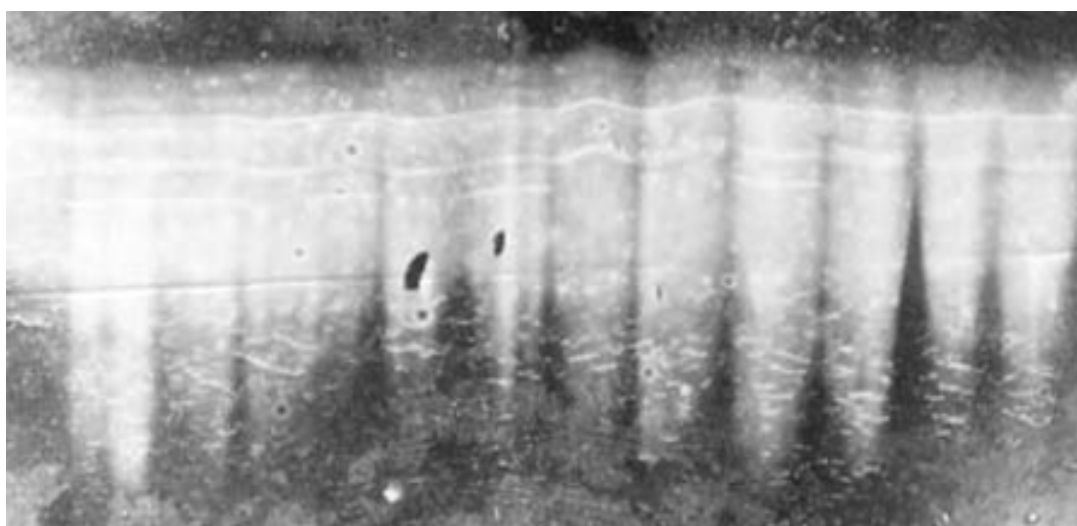


Fig. 13. Bandas Gc obtenidas mediante PAGIF

Este proceso debe ser realizado en una cubeta con fondo oscuro ya que facilita la visualización de las bandas de Gc. Estas se distinguen con facilidad haciendo incidir una luz lateral sobre el gel en inmersión. Las bandas proteicas de Gc aparecen de color blanco sobre el fondo transparente del gel.

Las bandas fijadas quedan permanentes, pero al secarse la placa a temperatura ambiente, las bandas van desapareciendo de la vista. Pueden volver a visualizarse, por simple rehidratación del gel, siempre que se vuelva a sumergir la placa en agua ultrapura.

Estas bandas con el tiempo se deterioran, por lo tanto la lectura debe realizarse una vez que ha tenido lugar la precipitación de las bandas Gc.

5.5.3.2. Alfa-1-antitripsina

La separación de los subtipos de la α_1 -antitripsina se llevó a cabo mediante isoelentroenfoque en geles de poliacrilamida (PAGIF)³⁰⁹.

Los geles de 0,3 mm fueron realizados con el molde BIO-RAD sobre placa de cristal tratada previamente con silano para que el gel se adhiriera a la misma (se había sumergido la placa de cristal, durante una hora, en una solución de 0,4 ml de silano en un litro de agua ultrapura llevado a pH 3,5 con ácido acético glacial).

³⁰⁹ ALLEN, R. C., HARLEY, R. A., TALAMO, R. C., "A new method for determination of alpha-1-antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrilamide gel slabs", *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 62, págs. 732-739.

La solución de polímero estuvo constituida por 6 g de acrilamida, 0,2 g de bisacrilamida, 12 g de sacarosa y 100 ml de agua ultrapura.

Para su fabricación se tomaron 11 ml de la solución de polímero a la que previa desgasificación se añadía 0,5 ml de Ampholine 3,5-5, 0,2 ml de Pharmalyte 2,5-5, 0,2 ml de Ampholine 4-6, 0,2 ml de Pharmalyte 4,2-4,9, 6 ml de solución de persulfato amónico al 1% y 20 μ l de Temed.

La polimerización se realizó durante una hora.

Los geles fabricados fueron inmediatamente utilizados o bien se conservaron en cámara húmeda a 4°C hasta su utilización en un periodo máximo de 24 horas.

Las soluciones utilizadas para los electrodos fueron ácido acético al 1% para el ánodo y etanolamina al 1% para el cátodo. Se aplicaron sobre el gel mediante tiras electródicas.

Las muestras fueron aplicadas (sin diluir) sobre el gel a 2 cm, aproximadamente, del extremo catódico mediante papel Whatman.

Las condiciones de la focalización fueron:

1° Prerun durante 45 minutos (sin muestras) a: 8 W, 151 mA y 3000 V.

2° Focalización durante 2 horas y 30 minutos:

- Durante 30 minutos a 7 W, 151 mA y 3000 V.
- Durante 2 horas a 12 W, 151 mA y 3000 V.

Los papeles Whatman que contenían las muestras se retiraron a los 30 minutos de iniciada la migración.

Terminada la migración la placa se sumergió en una solución de fijado constituida por ácido tricloroacético al 12% durante 30 minutos.

Posteriormente se introdujo durante 30 minutos en una solución constituida por 250 ml de etanol, 80 ml de ácido acético y un litro de agua ultrapura.

La coloración de las bandas se realizó a una temperatura de 65°C. Para el teñido se preparó una dilución de 500 ml de azul de Comassie en 400 ml de la solución que se había preparado de etanol, ácido acético y agua, se calentó hasta 65°C y se introdujo la placa manteniéndose en estufa a 65°C durante 30 minutos.

Después se retiró el exceso de colorante mediante varios lavados, cada 30 minutos, con la solución de etanol, ácido acético y agua hasta alcanzar el contraste deseado.

En la figura 14 se observa un placa de alfa-1-antitripsina.

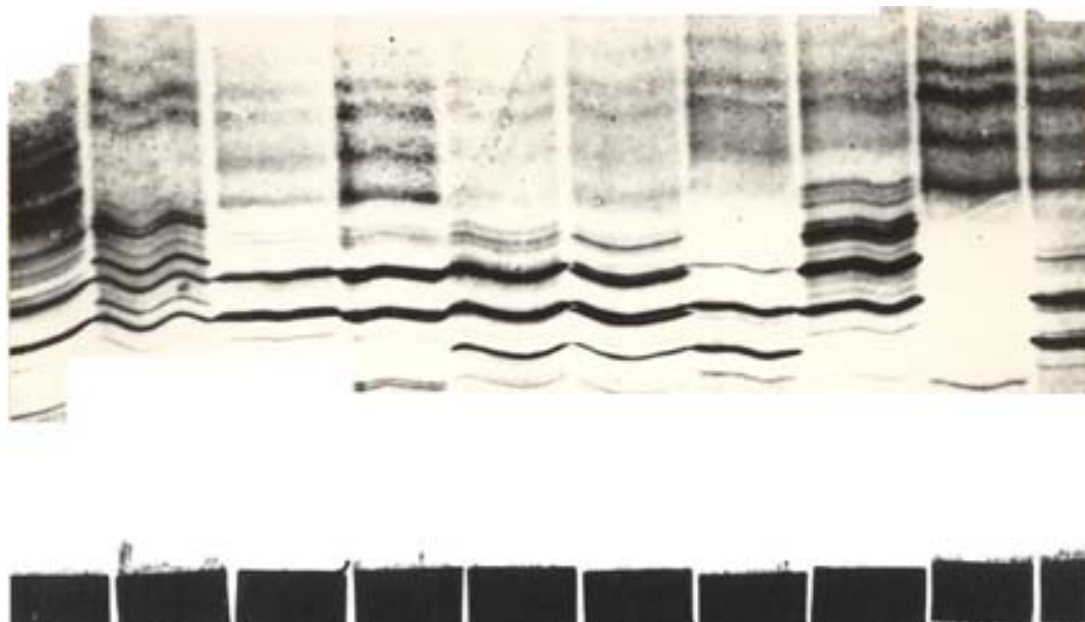


Fig. 14. Patrones de bandas α_1 -antitripsina mediante técnicas de PAGIF

5.5.3.3. Fosfatasa Acida Eritrocitaria

La separación de los tipos de AcP₁ se realizó mediante isoelectroenfoque en geles de poliacrilamida (PAGIF) siguiendo la técnica descrita en 1977 por Burdett y Whitehead ³¹⁰.

La focalización isoelectrica fue realizada sobre un gel de poliacrilamida. Los geles de 0,3 mm fueron realizados con el molde BIO-RAD sobre placa de cristal tratada previamente con silano para que el gel se adhiriera a la misma (se

³¹⁰ BURDETT, P. E., WHITEHEAD, P. H., "The separation of the phenotypes of fosphoglucomutase, erythrocyte acid phosphatase and some haemoglobin variants by isoelectric focusing", *Anal. Biochem.*, vol. 77, págs. 419-428.

había sumergido la placa de cristal, durante una hora, en una solución de 0,4 ml de silano en un litro de agua ultrapura llevado a pH 3,5 con ácido acético glacial).

La solución de polímero estuvo constituida por 6 g de acrilamida, 0,2 g de bisacrilamida, 12 g de sacarosa y 100 ml de agua destilada.

Para su fabricación se tomaron 11 ml de la solución de polímero a la que, previa desgasificación, se añadía 0,1 ml de Ampholine 5-8, 6 ml de solución de persulfato amónico al 1% y 20 μ l de Temed.

La polimerización se realizó durante una hora.

Los geles fabricados fueron inmediatamente utilizados o bien se conservaron en cámara húmeda a 4°C hasta su utilización sin que transcurrieran 24 horas.

Las soluciones utilizadas para los electrodos fueron ácido fosfórico 1N para el ánodo y etanolamina al 1% para el cátodo. Se aplicaron sobre el gel mediante tiras electródicas.

Las muestras (hemolizados puros) previa dilución 1:1 con DTT (dithiotreitol 0,05M), durante 30 minutos con objeto de anular los cambios oxidativos que se hubieran podido producir en la muestra, fueron aplicadas sobre el gel a 2 cm, aproximadamente, del extremo catódico mediante papel

Whatman.

Las condiciones de la focalización fueron:

1° Prerun durante 45 minutos (sin muestras) a: 5 W, 151 mA y 1600 V.

2° Focalización durante 2 horas a: 5 W, 151 mA y 1600 V.

Los papeles Whatman que contenían las muestras se retiraron a los 60 minutos de iniciada la migración.

Para la tinción se preparó una solución de 20 mg de 4-metil-umbeliferil-fosfato en 15 ml de un tampón de ácido cítrico 0,05M ajustado de un pH de 5 con NaOH. Con esta solución se empapó papel Whatman 3MM (de iguales dimensiones que la placa de gel) y se aplicó cuidadosamente sobre éste, evitando la formación de burbujas.

Después se procedió a una incubación a 37°C en cámara húmeda y las bandas fueron leídas con luz ultravioleta.

La reacción que tiene lugar entre la 4-metil-umbeliferil-fosfato y la fosfatasa ácida da lugar a la formación de fosfato y 4-metil-umbeliferona que tiene la propiedad de ser fluorescente.

En la figura 15 pueden observarse las bandas de AcP₁ obtenidas mediante PAGIF.

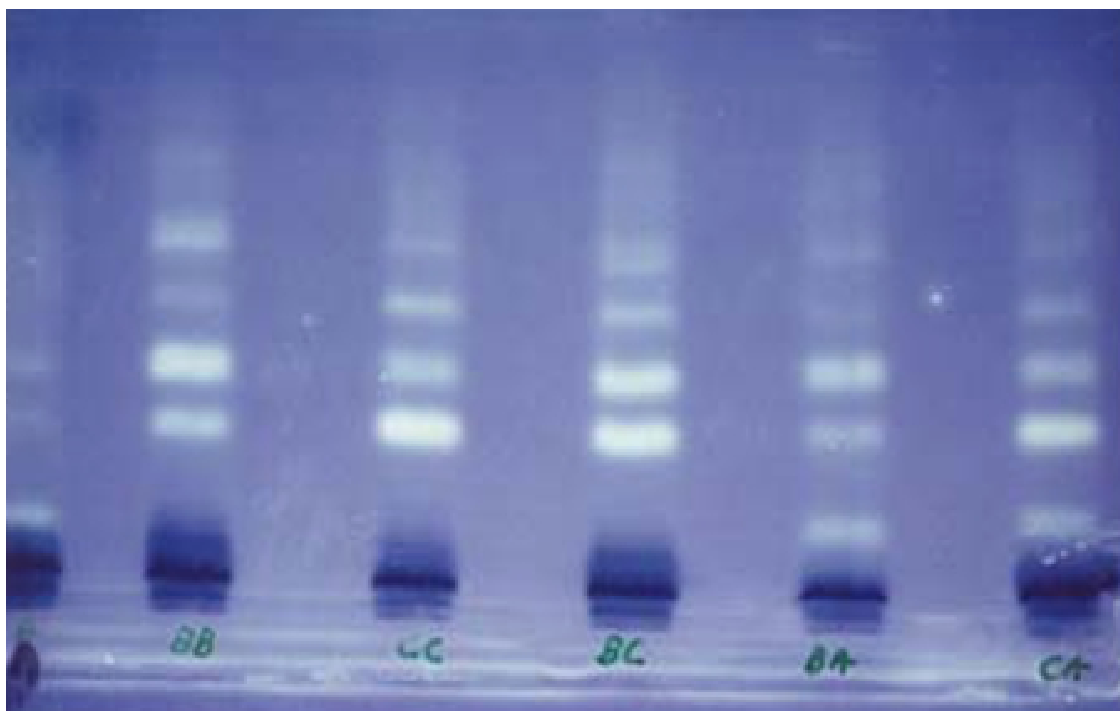


Fig. 15. Patrones de bandas ACP_1 obtenidas por PAGIF

6. RESULTADOS

6.1. FRECUENCIAS FENOTIPICAS Y GENICAS

6.1.1. SISTEMA ABO

Las frecuencias obtenidas se expresan en la tabla 36.

Tabla 36. Frecuencias fenotípicas y génicas del sistema ABO

Fenotipos	Nº observado	%
A ₁	165	40,84
A ₂	32	7,92
B	38	9,41
O	149	36,88
A ₁ B	14	3,47
A ₂ B	6	1,49
Total	404	100,01

A ₁ : 0,2561
A ₂ : 0,0620
B: 0,0730
O: 0,6073

6.1.2. SISTEMA Rh

Las frecuencias obtenidas se expresan en la tabla 37.

Tabla 37. Frecuencias fenotípicas y génicas del sistema Rh

Fenotipos	Nº observado	%
CcDEe	53	13,12
CcDE	7	1,73
CcDe	140	34,65
CcdEe	0	0,00
CcdE	0	0,00
Ccde	3	0,74
CDEe	0	0,00
CDE	0	0,00
CDe	112	27,72
CdEe	0	0,00
CdE	0	0,00
Cde	0	0,00
cDEe	26	6,44
cDE	11	2,72
cDe	10	2,48
cdEe	4	0,99
cdE	0	0,00
cde	38	9,41
Total	404	100,00

CDE: 0,0000
CDe: 0,5164
CdE: 0,0000
Cde: 0,0121
cDE: 0,1330
cDe: 0,0357
cdE: 0,0143
cde: 0,2884

6.1.3. SISTEMA MNSs

Las frecuencias obtenidas se expresan en la tabla 38.

Tabla 38. Frecuencias fenotípicas y génicas del sistema MNSs

Fenotipos	Nº observado	%
MS	27	6,68
Ms	29	7,18
MSs	38	9,41
NS	8	1,98
Ns	74	18,32
NSs	32	7,92
MNS	21	5,20
MNs	90	22,28
MNSs	85	21,04
Total	404	100,01
<hr/>		
MS: 0,1925		
Ms: 0,2828		
NS: 0,1380		
Ns: 0,3868		

6.1.4. SISTEMA Gc

Las frecuencias obtenidas se expresan en la tabla 39.

Tabla 39. Frecuencias fenotípicas y génicas de la Gc

Fenotipos	Nº observado	%
1S-1S	119	29,46
1S-1F	61	15,10
1S-2	156	38,61
1F-1F	3	0,74
1F-2	31	7,67
2-2	34	8,42
Total	404	100,00

1S: 0,5631
1F: 0,1213
2: 0,3156

6.1.5. ALFA-1-ANTITRIPSINA

Las frecuencias obtenidas se expresan en la tabla 40.

Tabla 40. Frecuencias fenotípicas y génicas de la Pi

Fenotipos	Nº observado	%
M1-M1	240	59,41
M1-M2	87	21,53
M1-S	47	11,63
M1-Z	2	0,50
M1-F	1	0,25
M2-M2	15	3,71
M2-S	10	2,48
M2-Z	0	0
M2-F	0	0
S-S	2	0,50
S-Z	0	0
S-F	0	0
Z-Z	0	0
Z-F	0	0
F-F	0	0
Total	404	100,01

M1: 0,7636
M2: 0,1572
S: 0,0755
Z: 0,0025
F: 0,0012

6.1.6. FOSFATASA ACIDA ERITROCITARIA

Las frecuencias obtenidas se expresan en la tabla 41.

Tabla 41. Frecuencias fenotípicas y génicas de la AcP₁

Fenotipos	Nº observado	%
AA	22	5,44
AB	153	37,88
AC	12	2,97
BB	192	47,53
BC	22	5,44
CC	3	0,74
Total	404	100,00

A: 0,2586
B: 0,6918
C: 0,0495

6.2. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

6.2.1. SISTEMA ABO

Las frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema ABO se hallan recogidas en la tabla 42.

Tabla 42. Frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema ABO

Fenotipos	Nº observado	%	Nº esperado	%
A ₁	165	40,84	165	40,96
A ²	32	7,92	32	7,94
B	38	9,41	38	9,43
O	149	36,88	149	36,99
A ₁ B	14	3,47	15,12	3,75
A ₂ B	6	1,49	3,66	0,91
Total	404	100,01	402,78	99,98

$$\chi^2 = 1,5750$$

$$\text{g. l.} = 3$$

$$p = 0,6651$$

6.2.2. SISTEMA Rh

Las frecuencias fenotípicas esperadas para el sistema Rh se hallan recogidas en la tabla 43.

Tabla 43. Frecuencias fenotípicas esperadas para el sistema Rh

Fenotipos	Nº observado	%	Nº esperado	%
CcDEe	53	13,12	62,76	15,54
CcDE	7	1,73	0,00	0,00
CcDe	140	34,65	135,58	33,57
CcdEe	0	0,00	0,14	0,00
CcdE	0	0,00	0,00	0,00
Ccde	3	0,74	2,82	0,01
CDEe	0	0,00	0,00	0,00
CDE	0	0,00	0,00	0,00
CDe	112	27,72	112,78	27,92
CdEe	0	0,00	0,00	0,00
CdE	0	0,00	0,00	0,00
Cde	0	0,00	0,06	0,00
cDEe	26	6,44	35,24	8,72
cDE	11	2,72	8,68	2,15
cDe	10	2,48	8,83	2,19
cdEe	4	0,99	3,33	0,83
cdE	0	0,00	0,08	0,00
cde	38	9,41	33,60	8,32
Total	404	100,00	403,84	99,25

El estudio de equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema Rh se halla recogido en la tabla 44.

Tabla 44. Frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema Rh

Fenotipos	Nº observado	%	Nº esperado	%
CcDEe	53	13,12	62,76	15,54
CcDe	140	34,65	135,58	33,57
CcdEe	0	0,00	0,14	0,00
Ccde	3	0,74	2,82	0,01
CDe	112	27,72	112,78	27,92
Cde	0	0,00	0,06	0,00
cDEe	26	6,44	35,24	8,72
cDE	11	2,72	8,68	2,15
cDe	10	2,48	8,83	2,19
cdEe	4	0,99	3,33	0,83
cdE	0	0,00	0,08	0,00
cde	38	9,41	33,60	8,32
Total	397	98,27	403,84	99,25

$$\chi^2 = 5,8676$$

$$\text{g. l.} = 4$$

$$p = 0,2093$$

6.2.3. SISTEMA MNSs

Las frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema MNSs se hallan recogidas en la tabla 45.

Tabla 45. Frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema MNSs

Fenotipos	Nº observado	%	Nº esperado	%
MS	27	6,68	14,96	3,70
Ms	29	7,18	32,31	8,00
MSs	38	9,41	43,97	10,88
NS	8	1,98	7,69	1,90
Ns	74	18,32	60,43	14,96
NSs	32	7,92	43,12	10,67
MNS	21	5,20	21,46	5,31
MNs	90	22,28	88,37	21,87
MNSs	85	21,04	91,67	22,69
Total	404	100,01	403,98	99,98

$$\chi^2 = 17,2876$$

$$\text{g. l.} = 5$$

$$p = 0,0040$$

6.2.4. GRUPOS Gc

Las frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para el sistema Gc se hallan recogidas en la tabla 46.

Tabla 46. Frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg de la Gc

Fenotipos	Nº observado	%	Nº esperado	%
1S-1S	119	29,46	128,11	31,71
1S-1F	61	15,10	55,19	13,66
1S-2	156	38,61	143,60	35,54
1F-1F	3	0,74	5,94	1,47
1F-2	31	7,67	30,93	7,66
2-2	34	8,42	40,24	9,96
Total	404	100,00	404,00	100,00

$$\chi^2 = 4,7567$$

$$\text{g. l.} = 3$$

$$p = 0,1905$$

6.2.5. ALFA-1-ANTRITRIPSINA

Las frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para la alfa-1-antitripsina se hallan recogidas en la tabla 47.

Tabla 47. Frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg de la alfa-1-antitripsina

Fenotipos	Nº observado	%	Nº esperado	%
M1-M1	240	59,41	235,57	58,31
M1-M2	87	21,53	96,98	24,00
M1-S	47	11,63	46,58	11,53
M1-Z	2	0,50	1,53	0,38
M1-F	2	0,25	0,76	0,19
M2-M2	15	3,71	9,98	2,47
M2-S	10	2,48	9,59	2,37
M2-Z	0	0,00	0,31	0,08
M2-F	0	0,00	0,16	0,04
S-S	2	0,50	2,30	0,57
S-Z	0	0,00	0,15	0,04
S-F	0	0,00	0,08	0,02
Z-Z	0	0,00	0,00	0,00
Z-F	0	0,00	0,00	0,00
F-F	0	0,00	0,00	0,00
Total	404	100,01	404,00	100,00

$$\chi^2 = 4,6184$$

$$\text{g. l.} = 10$$

$$p = 0,9152$$

6.2.6. FOSFATASA ACIDA ERITROCITARIA

Las frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg para la fosfatasa ácida eritrocitaria se hallan recogidas en la tabla 48.

Tabla 48. Frecuencias fenotípicas esperadas y equilibrio Hardy-Weinberg de la AcP₁

Fenotipos	Nº observado	%	Nº esperado	%
AA	22	5,44	27,03	6,69
AB	153	37,88	144,59	35,79
AC	12	2,97	10,35	2,56
BB	192	47,53	193,37	47,86
BC	22	5,44	27,67	6,85
CC	3	0,74	0,99	0,25
Total	404	100,00	404,00	100,00

$$\chi^2 = 6,9420$$

$$\text{g. l.} = 3$$

$$p = 0,0738$$

6.3. INDICE DE HETEROCIGOSIDAD

Los índices de heterocigosidad obtenidos para cada uno de los sistemas estudiados se recogen en la tabla 49.

Tabla 49. Índice de heterocigosidad (h) de los sistemas estudiados en la población de Las Arribes

Sistema	h
ABO	0,4084
Rh	0,7389
MNSs	0,6584
Gc	0,6139
Pi	0,3639
AcP ₁	0,4629

6.4. COMPARACION DE POBLACIONES

6.4.1. SISTEMA ABO

La comparación de las frecuencias génicas del sistema ABO obtenidas en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas (tabla 16) se recogen en la tabla 50.

Tabla 50. Comparación de las frecuencias génicas del sistema ABO en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas

POBLACION	χ^2 (ABO)	P
<i>Andalucía</i>		
Andaluces	7,546	0,0564
<i>Aragón</i>		
Aragoneses	17,718	0,0005
<i>Cantabria</i>		
Residentes	13,223	0,0042
Autóctona	9,412	0,0243
<i>Castilla</i>		
León	26,812	< 0,0001
Astorga (Maragatos)	49,055	< 0,0001
<i>Cataluña</i>		
Barcelona	4,075	0,2535
<i>Galicia</i>		
Gallegos (a)	1,233	0,7450
Gallegos (b)	1,883	0,5969
Gallegos (c)	26,958	< 0,0001
Gallegos (d)	1,393	0,7073
g. l. = 3		

(a), (b), (c) y (d) son distintas poblaciones estudiadas en Galicia

6.4.2. SISTEMA Rh

La comparación de las frecuencias génicas del sistema Rh obtenidas en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas (tabla 19) se recogen en la tabla 51.

Tabla 51. Comparación de las frecuencias génicas del sistema Rh en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas

POBLACION	² (Rh)	P
<i>Andalucía</i>		
Andaluces	38,700	< 0,0001
Cádiz	24,721	< 0,0001
<i>Aragón</i>		
Aragoneses (a)	38,235	< 0,0001
Aragoneses (b)	884,492	< 0,0001
Zaragoza	212,582	< 0,0001
<i>Cantabria</i>		
Residentes	5,741	< 0,0001
Autóctona	65,307	< 0,0001
<i>Cataluña</i>		
Barcelona (a)	33,794	< 0,0001
Barcelona (b)	119,922	< 0,0001
Catalanes	48,469	< 0,0001
<i>Galicia</i>		
Gallegos (a)	2,874	0,4114
Gallegos (b)	35,551	< 0,0001
g. l. = 3		

(a) y (b) son distintas poblaciones estudiadas en la misma zona geográfica

6.4.3. SISTEMA MNSs

La comparación de las frecuencias génicas del sistema MNSs obtenidas en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas (tabla 21) se recogen en la tabla 52.

Tabla 52. Comparación de las frecuencias génicas del sistema MNSs en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas

POBLACION	² (MNSs)	P
<i>Cantabria</i>		
Residentes	16,454	0,0009
Autóctona	11,820	0,0080
<i>Cataluña</i>		
Barcelona (a)	24,460	< 0,0001
Barcelona (b)	20,319	0,0001
<i>Galicia</i>		
Gallegos	26,580	< 0,0001
Lugo	8,322	0,0398
g. l. = 3		

(a) y (b) son distintas poblaciones estudiadas en Barcelona

6.4.4. SISTEMA Gc

La comparación de las frecuencias génicas del sistema Gc obtenidas en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas (tabla 22) se recogen en la tabla 53.

Tabla 53. Comparación de las frecuencias génicas del sistema Gc en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas

POBLACION	² (Gc)	P
<i>Andalucía</i>		
A. Orientales	7,737	0,0209
<i>Aragón</i>		
Aragoneses	6,442	0,0399
<i>Baleares</i>		
Baleares	10,247	0,0060
Ibiza y Formentera	8,380	0,0151
Mallorca	10,254	0,0059
Menorca	5,486	0,0644
<i>Castilla</i>		
Toledo	105,493	< 0,0001
<i>Cataluña</i>		
Barcelona	0,712	0,7004
<i>Galicia</i>		
Gallegos	0,142	0,9317
<i>Madrid</i>		
Residentes	0,160	0,9230
<i>Navarra</i>		
Navarros	7,680	0,0215
<i>País Vasco</i>		
Vizcainos	3,005	0,2225
Residentes	0,115	0,9442
Foráneos	2,018	0,3645

g. 1. = 2

6.4.5. ALFA-1-ANTITRIPSINA

La comparación de las frecuencias génicas de la alfa-1-antitripsina obtenidas en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas (tabla 23) se recogen en la tabla 54.

Tabla 54. Comparación de las frecuencias génicas del sistema Pi en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas

POBLACION	² (Pi)	P
<i>Andalucía</i>		
A. Orientales	0,211	0,9000
<i>Cataluña</i>		
Barcelona	11,615	0,0030
<i>Galicia</i>		
Gallegos	27,494	< 0,0001
<i>Madrid</i>		
Residentes	5,104	0,0779
<i>País Vasco</i>		
<i>Vizcaya</i>		
Arratia (nativos)	2,237	0,3267
Vizcaya	5,980	0,0503
Vizcaya (mixtos)	12,418	0,0020
Residentes (a)	5,697	0,0579
Residentes (b)	3,461	0,1762
<i>Guipuzcoa</i>		
Residentes	7,000	0,0302
<i>Alava</i>		
Residentes	5,869	0,0532
g. l. = 2		

6.4.6. FOSFATASA ACIDA ERITROCITARIA

La comparación de las frecuencias génicas de la fosfatasa ácida eritrocitaria obtenidas en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas (tabla 24) se recogen en la tabla 55.

Tabla 55. Comparación de las frecuencias génicas del sistema AcP₁ en la población de Las Arribes con las de otras poblaciones españolas

POBLACION	² (Pi)	P
<i>Andalucía</i>		
A. Orientales	7,132	0,0283
Sevilla	20,870	< 0,001
<i>Aragón</i>		
Zaragoza	14,148	0,0008
<i>Baleares</i>		
Ibiza	3,531	0,1711
<i>Canarias</i>		
Gran Canaria		
Noroeste	14,723	0,0006
Noreste	12,618	0,0018
Sur	16,529	0,0003
<i>Castilla</i>		
León	1,334	0,5133
Burgos	2,749	0,2530
Palencia	2,275	0,3206
Valladolid	2,944	0,2294
<i>Cataluña</i>		
Barcelona	7,902	0,0192
<i>Galicia</i>		
Gallegos	3,591	0,1660
Lugo	3,467	0,1766
<i>Madrid</i>		
Madrileños	5,751	0,0564
Residentes	0,824	0,6625
<i>Navarra</i>		
Navarros	2,234	0,3273
Pamplona	4,966	0,0835
<i>País Vasco</i>		
Vizcaya		
Arratia	5,219	0,0736
Guernika	4,460	0,1075
Uribe	2,315	0,3143
Vizcainos	11,543	0,0031

g. l. = 2

7. DISCUSSION

7.1. CONSIDERACIONES SOBRE EL MUESTREO

La primera consideración que es preciso realizar al efectuar un muestreo con validez antropológica es el tamaño óptimo de la muestra. En nuestro caso se ha trabajado con una muestra de 404 individuos, número superior al tamaño calculado para la misma (385). La muestra total recogida está constituida por la suma de muestras parciales proporcionales al número de habitantes de cada municipio, procurando que el total muestreado refleje la situación real de la comarca.

En este trabajo la muestra fue seleccionada mediante un proceso aleatorio simple solicitando su colaboración a cada persona elegida. Para las posibles negativas a colaborar y para los casos de fallecimiento se estableció por el mismo proceso aleatorio un grupo de suplentes.

No se ha tenido en cuenta ni el sexo ni la edad de los donantes ya que los polimorfismos estudiados están localizados en locus autosómicos y son fenotípicamente estables a lo largo de la vida.

Cuando se plantea un muestreo para un estudio de las frecuencias génicas de un grupo de sistemas con el fin de ser aplicadas en la investigación biológica de la paternidad, el enfoque es diferente a cuando el muestreo tiene como finalidad el estudio genético de poblaciones. En el primer caso la

muestra debe representar a la población dada y, en el segundo, es imprescindible conocer el origen de cada individuo.

Cuando se estudia la probabilidad de paternidad en un caso concreto, se está comparando la probabilidad de que un individuo determinado sea el padre con la probabilidad de que lo sea un hombre tomado al azar de una población determinada con independencia de su origen o procedencia.

En este trabajo, el muestreo se realizó con el fin de poder aplicar los resultados obtenidos a la investigación biológica de la paternidad, sin olvidar que, al mismo tiempo, podían servir para obtener una información genética poblacional de la comarca.

Los datos recogidos de cada individuo están descritos en la figura 12 del apartado 5.1 de esta memoria.

Se ha tenido un cuidado especial en no recoger muestras sanguíneas de individuos con relación de parentesco próxima y sólo se incluyeron en la muestra individuos sanos en el momento de la extracción sanguínea.

Además las personas aceptadas en el estudio tienen padres y abuelos nacidos en la comarca de Las Arribes.

7.2. CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS GENETICO-POBLACIONALES

Las tablas expresan con claridad los resultados genético-poblacionales obtenidos para cada marcador, por lo que en este capítulo nos vamos a limitar a exponer los aspectos mas relevantes obtenidos.

Se han analizado parámetros tales como la frecuencia fenotípica, génica, equilibrio Hardy-Weinberg, índice de heterocigosidad y comparación de poblaciones mediante tablas de contingencia.

Aunque existen otros tipos de parámetros estadísticos de notable interés genético-poblacional, como el análisis multivariante, procesos de emigración, selección y mutación, tasa de endogamia, desviación dominante, varianza genética y ambiental, etc., no han sido estudiados en este trabajo por no constituir el objeto principal de esta tesis.

7.2.1. SISTEMA ABO

Las frecuencias fenotípicas y génicas obtenidas en nuestra población están indicadas en la tabla 36 y determinan un índice de heterocigosidad de

0,4084 que significa que dicho locus se presenta en un alto grado de polimorfismo genético (tabla 49).

El estudio de la distribución de los fenotipos observados y el cálculo de los esperados determinan un valor $\chi^2 = 1,5750$, con un valor $p = 0,6651$, lo que demuestra que la población de Las Arribes se halla en equilibrio para este sistema (tabla 42).

En cuanto al estudio comparativo entre los resultados obtenidos en nuestra población y distintas poblaciones españolas (tabla 16), en líneas generales, indica que las frecuencias de los distintos alelos se encuentran dentro de los intervalos de variabilidad de la población española, con la notable excepción de la población de León y Astorga que, a la vez, difieren del resto de poblaciones españolas estudiadas.

En la tabla 50 pueden apreciarse las diferencias muy significativas con gran parte de las poblaciones comparadas. Se aprecia una total diferencia con la población de León, Astorga, Aragón, residentes de Cantabria y una de las poblaciones gallegas estudiadas por Mourant y cols. Se observan ligeras diferencias con la población autoctona de Cantabria. Las mayores similitudes se observan con las poblaciones de Galicia y Barcelona.

Es de destacar el hecho de que el habla de la población de Las Arribes, como ya se ha indicado, se presenta como una modalidad del leonés occidental aunque muy influenciado por el castellano y, sin embargo, se observa una

gran diferencia en cuanto a las frecuencias alélicas del sistema ABO. No resulta fácil establecer una explicación a esta peculiaridad, ya que son varios los factores que dan lugar a la uniformización del lenguaje.

7.2.2. SISTEMA Rh

Las frecuencias fenotípicas y génicas halladas para la población de Las Arribes están detalladas en la tabla 37.

El índice de heterocigosidad alcanzado es de 0,7389, lo que indica un elevado polimorfismo para la distribución de los alelos en la población estudiada (tabla 49).

Las frecuencias fenotípicas esperadas, calculadas de acuerdo con las frecuencias de los haplotipos correspondientes, se expresan en la tabla 43. Para la comparación de estas frecuencias esperadas con las observadas, aplicando la prueba estadística de χ^2 no se han considerado los haplotipos cuyas frecuencias esperadas eran cero. Además tampoco se ha considerado, en esta comparación, el haplotipo CcDE cuyo valor esperado es cero y los fenotipos hallados fueron siete, correspondiendo a individuos de distintos municipios sin ningún tipo de relación familiar. A la vista de este resultado, pensamos que la población de Las Arribes es diferente en cuanto a la presentación de este haplotipo, debiéndose confirmar este hecho mediante estudios posteriores realizados en las familias de estos individuos.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, el valor obtenido para el estadístico χ^2 es de 5,8676, con $p = 0,2093$ lo que indica que la población se halla en equilibrio Hardy-Weinberg para los haplotipos comparados (tabla 44).

Para la comparación de las frecuencias encontradas en nuestra población con los resultados de estudios similares en población española (tabla 19), se ha prescindido de los haplotipos menos frecuentes dado que existe una gran variabilidad de los mismos entre las distintas poblaciones. La comparación se ha efectuado con los haplotipos más frecuentes: CDe, cde, cDE y cDe. Es de notar que todas las poblaciones españolas tienen una frecuencia génica de CDe inferior a 0,5, siendo la de nuestra población superior a ese valor. La frecuencia del haplotipo cde en nuestra población es de 0,2884 siendo muy inferior al resto de poblaciones españolas. Los haplotipos cDE y cDe se encuentran dentro del rango de frecuencias para otras poblaciones.

En la tabla 51 se señalan los resultados del análisis comparativo con diversas poblaciones españolas. No existen diferencias significativas con la población Gallega (a). Existen diferencias muy significativas con el resto de poblaciones españolas.

7.2.3. SISTEMA MNSs

En la tabla 38 se hallan reflejadas las frecuencias fenotípicas y génicas del sistema MNSs en nuestra población.

El índice de heterocigosidad obtenido ($h = 0,6584$) indica un alto grado de polimorfismo genético (tabla 49).

En la tabla 45 se hallan indicadas las frecuencias fenotípicas encontradas y esperadas y su comparación aplicando la prueba estadística de χ^2 , obteniéndose un valor de 17,2876 con $p = 0,0040$. Estos valores evidencian una diferencia significativa y, por tanto, podemos deducir que la muestra de población estudiada no se encuentra en equilibrio genético para este sistema. Este hecho puede ser debido bien a la migración, bien a la selección o bien a la mutación de la población analizada. Lo más probable es que el factor que influya en este desequilibrio genético sea la migración.

La tabla 21 muestra la distribución de frecuencias de los alelos del sistema MNSs en población española y comparando con nuestros resultados es de notar que las frecuencias de los alelos Ms y Ns están dentro del intervalo obtenido por diferentes autores. La frecuencia del alelo MS en nuestra población es inferior a todas las demás poblaciones españolas y la frecuencia del alelo NS es superior a todas ellas.

Estas consideraciones son confirmadas al valorar estadísticamente las diferencias de las frecuencias alélicas entre la población estudiada con el resto

de poblaciones españolas, por aplicación del estadístico χ^2 . Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 52. La gran similitud de los valores observados de χ^2 indican que los resultados obtenidos son concordantes en cuanto a las diferencias respecto a estas poblaciones españolas.

7.2.4. SISTEMA Gc

Las frecuencias fenotípicas y génicas halladas para la población de la comarca de Las Arribes están detalladas en la tabla 39.

El índice de heterocigosidad alcanzado para el locus Gc es de 0,6139 (tabla 49). Es un índice elevado con respecto a los hallados para los sistemas ABO, AcP₁ y Pi e inferior a los hallados para los sistemas Rh y MNSs.

La distribución de los fenotipos observados y el cálculo de los fenotipos esperados da lugar a un valor $\chi^2 = 4,7567$, con un valor $p = 0,1905$ (tabla 46). La población, por tanto, se halla en equilibrio Hardy-Weinberg para el locus Gc.

La tabla 22 muestra los datos referentes a la distribución de frecuencias alélicas en diversas poblaciones españolas y se puede observar que el alelo Gc1S presenta los valores mas elevados, en tanto que el alelo Gc1F es el menos frecuente. Los valores obtenidos en nuestra población se hallan dentro del intervalo de variabilidad general para población española. La tabla 53

muestra los datos referentes a comparación de la población de Las Arribes con otras poblaciones españolas. En términos globales existe buena similitud, obteniéndose los valores de p mas elevados frente a poblaciones de Cataluña, Galicia, Madrid y País Vasco. Se observan diferencias muy significativas entre nuestra población y las de Toledo, Baleares y Mallorca. Las diferencias son algo menores frente a las poblaciones de Andalucía Oriental, Navarra y Aragón.

7.2.5. ALFA-1-ANTITRIPSINA

La distribución de las frecuencias fenotípicas y génicas en nuestra población están detalladas en la tabla 40.

La clase alélica M1, en la que se ha incluido el alelo M3, destaca de forma clara sobre las demás.

El índice de heterocigosidad obtenido para el locus Pi es de 0,3639 (tabla 49). Aunque es el índice mas bajo de los hallados indica un grado elevado de polimorfismo genético, debido fundamentalmente al alelomorfismo múltiple que se presenta en este locus.

La tabla 47 muestra la distribución de los fenotipos observados y esperados. La comparación estadística de ambos proporciona un valor $\chi^2 =$

4,6184, con un valor $p = 0,9152$, que indica que la población se halla en equilibrio Hardy-Weinberg para este locus.

En la tabla 23 se indica la distribución de frecuencias del locus Pi en diferentes poblaciones españolas. El valor obtenido para el alelo S es uno de los mas bajos en lo que se refiere a la población española. En cuanto a la distribución de frecuencias del alelo M2 los valores oscilan entre 0,115 y 0,196, encontrándose en este intervalo el valor obtenido en nuestro estudio.

En el análisis comparativo hemos prescindido de las variantes raras y del alelo Z ya que al encontrarse en muy baja frecuencia, las estimas obtenidas pueden estar sesgadas debido al muestreo estadístico. Tras la aplicación del test estadístico χ^2 para este sistema (para los alelos M1, M2 y S), encontramos las mayores semejanzas con la población de Andalucía Oriental, Arratia (nativos) de Vizcaya y Residentes (b) de Vizcaya, mientras que las mayores diferencias significativas se registran frente a la población gallega, de Barcelona y de Vizcaya (mixtos) (tabla 54).

7.2.6. FOSFATASA ACIDA ERITROCITARIA

La distribución las frecuencias fenotípicas y alélicas de la AcP_1 en la población estudiada se muestran en la tabla 41.

Los valores de las frecuencias determinan un índice de heterocigosidad de 0,4629, que es indicativo de un alto grado de polimorfismo genético (tabla 49).

Para verificar si la población estudiada se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para el locus AcP₁ se aplicó el estadístico χ^2 a la distribución de fenotipos observados y esperados, encontrándose un valor $\chi^2 = 6,9420$ y $p = 0,0738$, que indican que existe equilibrio genético (tabla 48).

El análisis comparativo con otras poblaciones españolas (tabla 24) muestra que los valores de las frecuencias alélicas de la población estudiada se encuentran incluidas en el rango de las frecuencias en estas poblaciones españolas. La mayor variabilidad se registra para el alelo C, lo que puede ser debido a un mayor error típico al ser un alelo de baja frecuencia, además de las posibles diferencias genéticas entre las poblaciones.

Cuando comparamos cuantitativamente las frecuencias alélicas con otras poblaciones españolas se encuentra que las diferencias más significativas se dan frente a la población de Sevilla, Zaragoza y Gran Canaria. La mayor semejanza se obtiene con las poblaciones geográficamente más próximas: Castilla y León, Madrid y Galicia (tabla 55).

7.3. APLICACION DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS ESTUDIADOS AL CALCULO DE LA PROBABILIDAD DE PATERNIDAD

A modo de ejemplo y para plasmar de forma práctica los resultados obtenidos (frecuencias génicas), se han calculado la probabilidad de paternidad y el índice paternidad para una combinación fenotípica determinada del trío madre-hijo-presunto padre en cada uno de los sistemas tratados.

El cálculo de la probabilidad de paternidad se basa, como ya se ha dicho, en el Teorema de Bayes.

Si el marcador genético posee alelos codominantes (MNSs, Gc, Pi, AcP₁) el cálculo de la probabilidad de paternidad se simplifica, suponiendo un valor de P_o (probabilidad a priori) de 0,5.

Para sistemas con fenómenos de dominancia y recesividad (ABO y Rh) los cálculos son más complicados y en este caso hemos utilizado el método Logic II para el cálculo de las probabilidades de paternidad.

7.3.1. SISTEMA ABO

Presunto Padre: B

Madre: B

Hijo: B

Frecuencias génicas: $A_1 = 0,2561$, $A_2 = 0,0620$, B: 0,0730, O= 0,6073

Examinando el fenotipo del presunto padre y los de la pareja madre-hijo resulta que no es posible la exclusión de paternidad.

La frecuencia de los gametos maternos se deducen por la ley de Hardy-Weinberg.

Del análisis de la madre resulta:

Genotipos posibles	Frecuencia de los gametos	Frecuencias Absolutas	Frecuencias Relativas
BB	$0,0730^2$	0,0053	0,0564
BO	$2(0,0730)(0,6073)$	0,0887	0,9436
		0,0940	1,0000

Gametos producidos	Genotipos	Frecuencias relativas	Probabilidad	Frecuencia gametos producidos
B	BB	0,0564	1	0,0564
	BO	0,9436	0,5	0,4718
				0,5282
O	BO	0,9436	0,5	0,4718
				1,0000

Probabilidad de transmitir B = 0,5282 y O = 0,4718

Del análisis del presunto padre resulta:

Genotipos posibles	Frecuencia de los gametos	Frecuencias Absolutas	Frecuencias Relativas
BB	$0,0730^2$	0,0053	0,0564
BO	$2(0,0730)(0,6073)$	0,0887	0,9436
		0,0940	1,0000

Gametos producidos	Genotipos	Frecuencias relativas	Probabilidad	Frecuencia gametos producidos
B	BB	0,0564	1	0,0564
	BO	0,9436	0,5	0,4718
				0,5282
O	BO	0,9436	0,5	0,4718
				1,0000

Probabilidad de transmitir B = 0,5282 y O = 0,4718

Valor de X

Si la madre transmite		El padre transmite		Probabilidad del suceso
Gen	Probabilidad de transmitir	Gen	Probabilidad de transmitir	
B	0,5282	B	0,5282	0,2790
B	0,5282	O	0,4718	0,2492
O	0,4718	B	0,5282	0,2492
				0,7774

Valor de Y

Si la madre transmite		Un hombre al azar transmitirá		Probabilidad del suceso
Gen	Probabilidad de transmitir	Gen	Probabilidad de transmitir	
B	0,5282	B	0,0730	0,0385
B	0,5282	O	0,6073	0,3208
O	0,4718	B	0,0730	0,0344
				0,3937

Indice de paternidad: $IP = X / Y = 0,7774 / 0,3937 = 1,975$

Probabilidad relativa de paternidad: $W = X / (X+Y) = 66,38\%$

7.3.2. SISTEMA Rh

Presunto Padre: CDe	Madre: cDEe	Hijo: CcDEe
Frecuencias haplotípicas:	CDE = 0,0000	cDE = 0,1330
	CDe = 0,5164	cDe = 0,0357
	CdE = 0,0000	cdE = 0,0143
	Cde = 0,0121	cde = 0,2884

Examinando el fenotipo del presunto padre y los de la pareja madre-hijo resulta que no es posible la exclusión de paternidad.

La madre y el presunto padre deben ser tratados como individuos al azar debiendo deducirse:

- Sus posibilidades genotípicas por la ley de Hardy-Weinberg.
- Sus probabilidades de transmisión de los distintos haplotipos al niño.

La probabilidad de transmisión de un hombre al azar de los haplotipos viene dado por las frecuencias haplotípicas halladas.

Examen de la madre (fenotipo cDEe):

Genotipos posibles	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas
cDE/cde	0,0767	0,8795
cDE/cDe	0,0095	0,1089
cdE/cDe	0,0010	0,0115
	0,0872	0,9999

Gametos producidos	Genotipos	Frecuencias relativas	Probabilidad	Frecuencias de los gametos producidos
cDE	cDE/cde	0,8795	0,5	0,4397
	cDE/cDe	0,1089	0,5	0,0544
				0,4911
cde	CDE/cde	0,8795	0,5	0,4397
cDe	cDE/cDe	0,1089	0,5	0,0544
	cdE/cDe	0,0115	0,5	0,0057
				0,0601
cdE	cdE/cDe	0,0115	0,5	0,0057

Análisis del presunto padre (fenotipo CDe):

Genotipos posibles	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas
CDe/CDe	0,2666	0,9555
CDe/Cde	0,0124	0,0444
	0,2790	0,9999

Gametos producidos	Genotipos	Frecuencias relativas	Probabilidad	Frecuencias de los gametos producidos
CDe	CDe/CDe	0,9555	1,0	0,9555
	CDe/Cde	0,0124	0,5	0,0062
				0,9617
Cde	CDe/Cde	0,0124	0,5	0,0062

Valor de X

Si la madre transmite		El padre transmitirá		Probabilidad del suceso
Haplotipo	Probabilidad de transmisión	Haplotipo	Probabilidad de transmisión	
cDE	0,4911	CDe	0,9617	0,4723
cDE	0,4911	Cde	0,0062	0,0030
cde	0,4397	CDE	0,0	0,0000
cDe	0,0544	CDE	0,0	0,0000
cdE	0,0057	CDe	0,9617	0,0055
				0,4808

Valor de Y

Si la madre transmite		Un hombre al azar transmitirá		Probabilidad del suceso
Haplotipo	Probabilidad de transmisión	Haplotipo	Probabilidad de transmisión	
cDE	0,4911	CDe	0,5164	0,2536
cDE	0,4911	Cde	0,0121	0,0059
cde	0,4397	CDE	0,0	0,0000
cDe	0,0544	CDE	0,0	0,0000
cdE	0,0057	CDe	0,5164	0,0029
				0,2624

Indice de paternidad: $IP = X / Y = 0,4808 / 0,2624 = 1,832$

Probabilidad relativa de paternidad: $W = X / (X + Y) = 64,69\%$

7.3.3. SISTEMA MNSs

Presunto Padre: MS Madre: NS Hijo: MNS

Frecuencias génicas: MS = 0,1925 NS = 0,1380

Ms = 0,2828 Ns = 0,3868

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa pareja es 1.

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa madre es la frecuencia de MS en la población.

Luego $X = 1$ e $Y = 0,1925$

Indice de paternidad: $X / Y = 5,195$

Probabilidad relativa de paternidad: $W = X / (X + Y) = 83,85 \%$

7.3.4. SISTEMA Gc

Presunto Padre: 1S-2 Madre: 1S-1F Hijo: 1S-1F

Frecuencias génicas: 1S = 0,5631, 1F = 0,1213, 2 = 0,3156

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa pareja es 0,25.

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa madre es $1/2$ de la frecuencia de 1F mas $1/2$ de la frecuencias de 1S en la población.

Luego $X = 0,25$ e $Y = 0,3421$

Indice de paternidad: $X / Y = 0,731$

Probabilidad relativa de paternidad: $W = X / (X + Y) = 42,22\%$

7.3.5. ALFA-1-ANTITRIPSINA

Presunto Padre: M1-M2 Madre: M1-M2 Hijo: M1-M2

Frecuencias génicas: M1 = 0,7636 Z = 0.0025
 M2 = 0,1572 F = 0,0012
 S = 0,0755

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa pareja es $1/2$.

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa madre es $1/2$ por la frecuencia de M1 mas $1/2$ por la frecuencia de M2 en la población.

Luego $X = 0,50$ e $Y = 0,4604$

Indice de paternidad: $X / Y = 1,086$

Probabilidad relativa de paternidad: $W = X / (X + Y) = 52,06\%$

7.3.6. FOSFATASA ACIDA ERITROCITARIA

Presunto Padre: AC Madre: BC Hijo: BC

Frecuencias génicas: A = 0,2586, B = 0,6918, C = 0,0495

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa pareja es 0,25.

La probabilidad de que ese hijo provenga de esa madre es $1/2$ por la frecuencia de B mas $1/2$ por la frecuencia del alelo C en la población.

Luego $X = 0,25$ e $Y = 0,3706$

Indice de paternidad: $X / Y = 0,675$

Probabilidad relativa de paternidad: $W = X / (X + Y) = 40,28\%$

8. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1ª. En el sistema ABO los valores de las frecuencias alélicas obtenidos en la población de Las Arribes son: $A_1 = 0,2561$, $A_2 = 0,0620$, $B = 0,0730$ y $O = 0,6073$.

El índice de heterocigosidad es de $h = 0,4084$.

El análisis estadístico de la distribución de las frecuencias fenotípicas teóricas y de las observadas permite establecer que en la población de Las Arribes existe equilibrio Hardy-Weinberg para el locus ABO.

La comparación de poblaciones permite establecer que las frecuencias alélicas del locus ABO se encuentran dentro de los intervalos de variabilidad definidos para las poblaciones españolas, no obstante, en el análisis estadístico se detectan diferencias significativas con la mayoría de las poblaciones españolas aunque también hay similitudes con la población de Galicia y de Barcelona.

2ª. En el sistema Rh los valores de las frecuencias alélicas obtenidos en la población de Las Arribes son:

$$\begin{array}{lll}
 CDE = 0,0000 & Cde = 0,0121 & cdE = 0,0143 \\
 CDe = 0,5164 & cDE = 0,1330 & cde = 0,2884 \\
 CdE = 0,0000 & cDe = 0,0357 &
 \end{array}$$

El índice de heterocigosidad es de $h = 0,7389$.

El estudio de la distribución de las frecuencias fenotípicas teóricas y de las observadas muestra que la población de Las Arribes se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para este marcador.

La comparación de poblaciones permite establecer que las frecuencias de los haplotipos Rh hallados difieren del resto de poblaciones españolas, presentando el haplotipo CDe el valor mas alto de las poblaciones españolas estudiadas mientras que la frecuencia del haplotipo cde es muy inferior al de dichas poblaciones. El análisis estadístico del sistema Rh muestra diferencias muy significativas con el resto de poblaciones españolas excepto con la gallega.

3ª. En el sistema MNSs los valores de las frecuencias alélicas obtenidos en la población de Las Arribes son: MS= 0,1925, Ms= 0,2828, NS= 0,1380 y Ns= 0,3868.

El índice de heterocigosidad es de $h = 0,6584$.

El estudio las frecuencias fenotípicas teóricas y de las observadas demuestra que la población de Las Arribes no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para el loci MNSs.

Los alelos NS y MS presentan los valores mas elevados y mas bajos, respectivamente, de las poblaciones españolas estudiadas. El estudio estadístico comparativo confirma que existen diferencias significativas con el resto de poblaciones españolas.

4ª. En el sistema Gc los valores de las frecuencias alélicas obtenidos en la población de Las Arribes son: $1S = 0,5631$, $1F = 0,1572$ y $2 = 0,3156$.

El índice de heterocigosidad es de $h = 0,6139$.

El análisis estadístico de la distribución de las frecuencias fenotípicas teóricas y de las observadas permite establecer que la población de Las Arribes está en equilibrio Hardy-Weinberg para el locus Gc.

El alelo 1S presenta los valores mas elevados en tanto que el alelo 1F es el menos frecuente con respecto a las poblaciones españolas analizadas. El estudio comparativo permite afirmar que existen diferencias muy significativas con las poblaciones de Toledo, Baleares y Mallorca, mientras

que las mayores similitudes se dan con las poblaciones de Cataluña, Galicia, Madrid y País Vasco.

5ª. En el estudio de la alfa-1-antitripsina en la población de Las Arribes los valores de las frecuencias alélicas obtenidos son:

$$\begin{array}{lll} M1 = 0,7636 & S = 0,0755 & F = 0,0012 \\ M2 = 0,1572 & Z = 0,0025 & \end{array}$$

El índice de heterocigosidad es de $h = 0,3639$.

El análisis estadístico de la distribución de las frecuencias fenotípicas teóricas y de las observadas permite establecer que en la población de Las Arribes existe equilibrio Hardy-Weinberg para el locus Pi.

El alelo S presenta uno de los valores mas bajos de las poblaciones españolas consideradas. El análisis estadístico permite establecer diferencias significativas frente a la población gallega, de Barcelona y Vizcaya (mixtos) mientras que las mayores semejanzas se registran frente a otras poblaciones vascas y de Andalucía oriental.

6^a. En el estudio de la fosfatasa ácida eritrocitaria los valores de las frecuencias alélicas obtenidos en la población de Las Arribes son: A= 0,2586, B= 0,6918 y C= 0,0495.

El índice de heterocigosidad es de $h= 0,4629$.

El análisis estadístico de la distribución de las frecuencias fenotípicas teóricas y de las observadas permite establecer que en la población de Las Arribes hay equilibrio Hardy-Weinberg para el locus AcP₁.

La comparación de poblaciones permite establecer que los valores de las frecuencias alélicas del locus AcP₁ se hallan en el rango de las frecuencias de las poblaciones españolas. El análisis estadístico evidencia diferencias significativas frente a las poblaciones de Sevilla, Zaragoza y Gran Canaria y la mayor semejanza existe con las poblaciones de Castilla y León, Madrid y Galicia.

7^a. La consideración conjunta de los sistemas de marcadores genéticos estudiados nos permite adelantar, estimándose necesarias investigaciones posteriores, que la población de Las Arribes, muy posiblemente, posee características genotípicas suficientemente diferenciadas del resto de la población española y, concretamente, son los sistemas Rh, MNSs y Gc los que contribuyen en mayor medida a las características propias de esta comarca.

9. BIBLIOGRAFIA

AGERO, J. (ed.), *Salamanca, Castilla y León*, 1ª edición, Editorial Mediterráneo, 232 págs., Madrid, 1990.

ALLEN, R. C., HARLEY, R. A., TALAMO, R. C., “A new method for determination of alpha-1-antitrypsin phenotypes using isoelectric focusing on polyacrilamide gel slabs”, *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 62, págs. 732-739, (1974).

ALONSO AVILA, A., “En torno a la visigotización de la Provincia de Salamanca”, *Revista Provincial de Estudios (Diputación Provincial de Salamanca)*, vol. 18-19, págs. 169-222, (1986).

Antígenos y anticuerpos de los grupos sanguíneos en los sistemas ABO Y Rh, 1ª edición, Editorial Ortho Diagnostics, 83 págs., Raritan, Nueva Jersey, Estados Unidos de Norteamérica, 1976.

ASANO, M., MINAKATA, K., HATTORI, H., “Calculation of likelihood ratio Y/X in diagnosis of paternity using computer methods”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 82, págs. 263-269, (1979).

ASANO, M., MINAKATA, K., HATTORI, H., “General formulas of the estimated likelihood ratio Y/X in the diagnosis of paternity of a deceased putative father”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 84, págs. 125-133, (1980).

ASANO, M., MINAKATA, K., HATTORI, H., “Diagnosis of paternity for cases without mother and without both mother and putative father based on blood group findings from the relatives”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 84, págs. 135-144, (1980).

BALLESTEROS PEREZ, J. F., RUIZ DE LA CUESTA, J. M., BANDRES MOYA, F., GARCIA GOMEZ, F. A., “Estudio comparativo entre el H.L.A. y los grupos sanguíneos en la investigación de la paternidad”, *Revista Española de Medicina Legal*, vol. 28-29, págs. 35-40, (1981).

BÄR, W., FIORI, A., ROSSI, U. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 5*, 1ª edición, Springer-Verlag, 661 págs., Berlin Heidelberg, 1994.

BARGAGNA, M., “Polymorphism of the red cell acid-phosphatase in Tuscany by starch-gel thin layer electrophoresis and fluorogenic substrate”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 81, págs. 163-165, (1978).

BARGAGNA, M., SELVAGGIO, G., CAVE BONDI, G., “Applicabilità del sistemi Gc, Gm, PGM e della variante Pc₅ della pseudocolinesterasi sierica ai fini della esclusione della paternità”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 10, págs. 225-233, (1974).

BARRIOS GARCIA, A., “Historia I”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca, Castilla y León*, 1ª edición, Editorial Mediterráneo, págs. 57-72, Madrid, 1990.

BARROS, F., SALAS, A., “Comprobación del equilibrio Hardy-Weinberg”. En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, 1ª edición, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur, págs. 41-53, Santiago de Compostela, 1996.

BECKER, P. E. (ed.), *Genética humana*, 1ª edición, Ediciones Toray S. A., 4 volúmenes, Barcelona, 1976.

BELL, O. F., CARRELL, R. W., “Basis of the defect in α_1 -antitrypsin deficiency”, *Nature*, vol. 243, págs. 410-411, (1973).

BENCIOLINI, P., CORTIVO, P., “Problemi dell'indagine ematologica medico-legale in tema di paternita”, *Zacchia*, vol. 8, págs. 570-594, (1972).

BERG, S., LADIGES, M. L., LADIGE, O., “Der EinflugB von Blutproben- und Spurenalterung auf das PGM- und Gc-Subtypenmuster”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 87, Págs. 85-94, (1981).

BERNARD, J., BESSIS, M., *Hematología fundamental*, 1ª edición, Editorial Toray-Masson, 282 págs., París, 1965.

BIEDERMANN, V., BÄR, W., “Determination of transferrin (Tf) and group-specific component (Gc) subtypes on a single polyacrylamide gel with

and immobilized pH gradient". En: BRINKMANN, B., HENNINGSE, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 116-118, Berlin Heilderberg, 1986.

BLAKE, N. M., KIRK, R. L., BARNES, K. R., THOMPSON, J. M., "Expresion of human red cell acid phosphatase activity in placenta and other tissues", *Jiurui Idengaku Zasshi*, vol. 18, págs. 10-23, (1973).

BOONLAYANGOOR, P. W., "True paternity or exclusion: analysis in the case of a deceased party", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 34, págs. 703-707, (1989).

BOWMAN, B. H., BEARN, A. G., "The presence of subunits in the inherited groups-specific proteins of human serum", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 53, págs. 722-729, (1965).

BOYD, W. C., "Shortened maximum likelihood estimation of Rh gene frequencies", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 6, págs. 303-318, (1954).

BOYD, W. C., "Maximum likelihood calculation of Rh gene frequencies in Pacific populations", *Nature, London*, vol. 176, págs. 648, (1955).

BRINKMAN, B., HENNINGSE, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, 505 págs., Berlin Heilderberg, 1986.

BRINKMANN, B., HOPPE, H. H., SACHS, H. W., WEBER, W., HEIDE, K. G., "Uber das vorkommen des stummen allels P° in 10 deutschen familien", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 75, págs. 25-32, (1974).

BURDETT, P. E., WHITEHEAD, P. H., "The separation of the phenotypes of phosphoglucomutase, erythrocyte acid phosphatase, and some haemoglobin variants by isoelectric focusing", *Analytical Biochemistry*, vol. 77, págs. 419-428, (1977).

CAEIRO, J. L. B., CANABAL, O., "Aspectos genético-poblacionales". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, 1ª edición,

Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., págs. 52-65, Barcelona, 1988.

CARBAJO GONZALEZ, J., “Tratamiento jurisprudencial de las acciones de filiación”, En: *Civil (Recopilación de Ponencias y Comunicaciones de 1996)*, 1ª edición, Editado por el Consejo General del Poder Judicial, págs. 7-40, Madrid, 1997.

CARRACEDO, A., ANDRADE-VIDE, C., RODRIQUEZ-CALVO, M. S., MONTIEL, M. D., LAREAU, M. V., “Fast Isoelectric Focusing of Some Polymorphic Proteins and Enzymes in Miniaturized Gels Using an Automated System”, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 33, págs. 1379-1384, (1988).

CARRACEDO, A., BARROS, F., “Principales problemas forenses en la prueba positiva de paternidad. El cálculo de probabilidad en casos de paternidad complejos”. En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, 1ª edición, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur, págs. 101-114, Santiago de Compostela, 1996.

CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, 1ª edición, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur, 140 págs., Santiago de Compostela, 1996.

CARRACEDO, A., CONCHEIRO, L., “Distribution of the Pi, TfC, and Gc Subtypes in Galicia (North West Spain)”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 90, págs. 153-158, (1983).

CARRACEDO, A., CONCHEIRO, L., “Polymorphism of erythrocyte acid phosphatase and adenosindesaminase in Galicia (N.W. Spain) by AGIF and PAGIF”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 88, págs. 143-145, (1982).

CARRACEDO, A., CONCHEIRO, L., “The typing of alpha-1-antitrypsin in human bloodstains by isoelectric focusing”, *Forensic Science International*, vol. 19, págs. 181-184, (1982).

CARRACEDO, A., CONCHEIRO, L., REQUENA, I., “Alpha-1-Antritrypsin, Transferrin C and Gc subtypes in bloodstains. The use of a new silver stain method”, *1er Congreso International de Medicina Legal de Porto*, Porto (Portugal), 1983.

CARRACEDO, A., CONCHEIRO, L., RODRIGUEZ CALVO, M. S., MONTIEL, M. D., "Plasma protein and red cell enzyme groups in Galicia (North West Spain)", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 98, págs. 133-140, (1987).

CARRACEDO, A., HUGUET, E., BARROS, F., "Parámetros estadísticos en la investigación biológica de la paternidad. Exclusión y prueba positiva de paternidad". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADEA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, 1ª edición, Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., págs.171-188, Barcelona, 1988.

CARRACEDO, A., LAREU, M. V., "El cálculo de probabilidad de paternidad. Concepto y cálculo de sistemas codominantes". En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, 1ª edición, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur, págs. 69-82, Santiago de Compostela, 1996.

CARRACEDO, A., LAREU, M. V., BARROS, F., "Polimorfismos enzimáticos del eritrocito". En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, 1ª edición, Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., págs. 113-141, Barcelona, 1988.

CASTELLANO ARROYO, M., MARTINEZ JARRETA, M. B., *Distribución de frecuencias de marcadores genético-moleculares en población española*, 1ª edición, Cooperativa de Artes Gráficas Librería General, 64 págs., Zaragoza, 1991.

CAVALLI-SFORZA, L. L., BODMER, W. F., *Genética de las poblaciones humanas*, 1ª edic., Editorial Omega, 942 págs., Barcelona, 1981.

Civil (Recopilación de Ponencias y Comunicaciones de 1996), 1ª edición, Editado por el Consejo General del Poder Judicial, 533 págs., Madrid, 1997.

CLEVE, H., BEARN, A. G., "The group specific component of serum: genetic and chemical considerations", *Progress in Medical Genetics*, vol. 2, págs. 64-82, (1962).

CLEVE, H. S., GORDON, S., BOWMAN, B. H., BEARN, A. G., "Comparison of the tryptic peptides and aminoacid composition of the beta polypeptide", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 19, págs. 713-721, (1967).

CLEVE, H., PATUTSCHNICK, W., STRECKER, K., NEVO, S., "Inheritance of Pi M subtypes", *Human Heredity*, vol. 29, págs. 351-354, (1979).

Código Civil, 4ª edición, Editorial Tecnos S. A., 643 págs., Madrid, 1985.

COMBRADO, A., "Los vecinos conocieron de cerca el proyecto del futuro parque natural de Las Arribes", *La Gaceta*, pág. 17, 21 de enero de 1996.

CONCHEIRO, L., CARRACEDO, A., "Blood markers in the Galician Population. Their usefulness in paternity testing", *1er Congreso Internacional de Medicina Legal de Porto*, Porto (Portugal), 1983.

CONSTANS, J., "Group-Specific Component. Report on the first International Workshop in Paris. France 1978", *Human Genetics*, vol. 48, págs. 143-149, (1979).

CONSTANS, J., CLEVE, H., "Identification of group specific component/vitamin D-binding protein (Gc/DBP) mutants by isoelectric focusing immobilized pH gradients", *Electrophoresis*, vol. 9, págs. 599-602, (1988).

CONSTANS, J., VIAU, M., CLEVE, M., JAEGER, G., QUILICI, J. C., PALISSON, M. J., "Analysis of the Gc polymorphism in human populations by isoelectric focusing on polyacrylamide gels: demonstration of subtypes and Gc¹ alleles and of additional Gc variants", *Human Genetics*, vol. 41, págs. 53-60, (1978).

Constitución Española, 7ª edición, Departamento de Programación Editorial del BOE, 153 págs., Madrid, 1987.

COOK, P. J. L., "The genetics of alpha-1-antitrypsin: a family study in England and Scotland", *Annals of Human Genetics*, vol. 38, págs. 275-287, (1975).

COOKE, N. E., WILLARD, H. F., DAVID, E. V., GEORGE, D. L., "Direct regional assignment of the gene for vitamin D binding protein (Gc-globulin) to human chromosome 4q11-q13 and identification of an associated DNA polymorphism", *Human Genetics*, vol. 73, págs. 225-229, (1986).

CORTIVO, P., BIASIOLO, M., CAENAZZO, L., SCORRETTI, C., BENCIOLINI, P., ONGARO, G., "Gc Subtypes Determined by Ultrathin-Layer Isoelectric Focusing. Distribution in the Veneto Population (Italy)", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 93, págs. 311-315, (1984).

COX, D. W., "Genetic variation of alpha-1-antitrypsin", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 30, págs. 660-662, (1978).

COX, D. W., JOHNSON, A. M., FAGERGHOL, M. K., "Report of nomenclature meeting for alpha-1-antitrypsin", *Human Genetics*, vol. 53, págs. 429-433, (1980).

CRAWFORD, I. P., "Purification and properties of normal human α_1 -antitrypsin", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 156, págs. 215-222, (1973).

CRUZ SAGREDO, D., "Las Arribes del Duero", *La Gaceta*, pág. 4, 2 de febrero de 1995.

CULLIFORD, B. J., *The examination and typing of bloodstains in the home laboratory*, 1ª edición, Editorial Government Printing Office, 219 págs., Washington D.C. USA, 1971.

DAIGER, S. P., SCHANFIELD, M. S., CAVALLI-SFORZA, L. L., "Group-specific component (Gc) proteins bind vitamin D and 25-hydroxyvitamin D", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 72, págs. 2076-2080, (1975).

DEROBERG, L., "Medecine Legale", 1ª edición, Flammarion Medecine-Sciences, 1191 págs., Paris, 1974.

DISSING, J., "Genetic and molecular aspects of the human red cell acid phosphatase polymorphism". En: RITTNER, C., SCHNEIDER, P. M. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 4*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 303-305, Berlin Heidelberg, 1992.

DISSING, J., "Red cell acid phosphatase: only two different enzymes - the "slow" and the "fast" enzyme- determine different biochemical properties of the six common phenotypes". En: BRINKMANN, B., K. HENNINGSE, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 127-131, Berlin Heilderberg, 1986.

DITTES, O., HEIDE, K. G., JAINZ, M., "Bestimmungen der Genotypenfrequenzen im MNSs-System in Scheleswig-Holstein nach der Maximum-Likelihood-Methode", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 73, págs. 123-129, (1973).

DOUGLAS, R., STAVELEY, J. M., "Rh and Kell typings of dried blood-stains", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 14, págs. 255-262, (1969).

DYKES, D., COPOULS, B., POLESKY, H., "Description of six new Gc variants", *Human Genetics*, vol. 63, págs. 35-37, (1983).

DYKES, D., POLESKY, H., COX, E., "Isoelectric focusing of Gc (vit D bindind globulin) in parentage testing", *Human Genetics*, vol. 58, págs. 174-175, (1981).

EALLES, L. S., "Association of different allelic forms group specific component with susceptibility to and clinical manifestation of human immunodeficiency virus infection", *Lancet*, vol. 1 (8540), págs. 999-1002, (1987), (Published erratum appears in *Lancet*, vol. 1 (8591), pág. 936, (1988)).

FAGERHOL, M. K., "The Pi system. Genetic variants of serum alpha-1-antitrypsin", *Series Haematologica*, vol. 1, págs. 153-161, (1968).

FAGERHOL, M. K., BRAEND, M., "Classification of human serum prealbumins after starch gel electrophoresis", *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, vol. 68, págs. 434-438, (1966).

FAGERHOL, M. K., GEDDE-DAHL, T., "Genetics of the Pi serum types. Family studies of the inherited variants of serum alpha-1-antitrypsin", *Human Heredity*, vol. 19, págs. 354-359, (1969).

FAGERHOL, M. K., LAURELL, C. B., "The polymorphisms of "prealbumins" and alpha-1-antitrypsin in human sera", *Clinica Chimica Acta*, vol. 16, págs. 199-203, (1967).

FALCONER, D. S., *Introducción a la genética cuantitativa*, 1ª edición, Cia. Editorial Continental S.A., 429 págs., México, 1983.

FARRERAS-ROZMAN, *Medicina Interna*, 8ª edición, Editorial Marín, S. A., 2 volúmenes, Barcelona, 1974.

FARRERAS-ROZMAN, *Medicina Interna*, 13ª edición, Editorial Mosby/Doyma Libros, 2 volúmenes, Madrid, 1998.

FERNANDEZ ALVAREZ, M. (ed.), "La Universidad de Salamanca", 1ª edición, Ediciones Universidad de Salamanca, 3 volúmenes, Salamanca, 1989.

FERSTL, F., HOPPE, H. H., "Alpha-1-antitrypsin (Pi) polymorphisms. Improved Pi-M-subtyping by PAGIF with immobilized gradients". En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, H. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 102-106, Berlin Heidelberg, 1986.

FERTAKIS, A., MIHAS, B., ANGELOPOULOS, B., "Distribution of the group-specific components in Greece", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 8, págs. 589-591, (1971).

FIORI, A., "L'agglutinazione mista nella identificazione degli antigeni ABO in tracce di sangue", *Medicina Legale e Assicuraz.*, vol. 9, pág. 205, (1961).

FIORI, A., ALQUATI, P., "La distribuzione dei gruppi serici Gc nella popolazione di Padova", *Medicina Legale e Assicuraz.*, vol. 13, págs. 3-4, (1965).

FIORI, A., BENCIOLINI, P., "The ABO grouping of stains from body fluids", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 70, págs. 214-222, (1972).

FIORI, A., GENTILE, V., FUCCI, N., "Absorption-elution on microplates (AEMP): an improved method for identification of the ABH major glycoproteins in saliva and semen of secretors". En: MAYR, W. R. (de.), *Advances in Forensic Haemogenetics* 2, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 429-432, Berlin Heidelberg, 1988.

FIORI, A., MARIGO, M., BENCIOLINI, P., "Modified absorption-elution method of siracusa for ABO and MN grouping of bloodstains", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 8, págs. 419-445, (1963).

FIORI, A., MARIGO, M., BENCIOLINI, P., "Modified absorption-elution method of siracusa for ABO and MN grouping of bloodstains", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 8, págs. 535-567, (1963).

FLORIS-MASALA, R., GRUPPIONI, G., LUNESU, M., MAMELI, G. E., PORCELLA, P., RISTALDI, M. S., SUCCA, V., VONA, G., "Gc and C₃ polymorphisms in South Sardinia", *Human Heredity*, vol. 37, págs. 127-128, (1987).

FRANK, W. E., STOLOROW, M. D., "The use of ultrathin-layer agarose gels for phenotyping erythrocyte acid phosphatase by isoelectric focusing", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 31, págs. 1089-1094, (1986).

FRANTS, R. R., ERIKSSON, A. W., "Alpha-1-antitrypsin: common subtypes of Pi M", *Human Heredity*, vol. 26, págs. 435-440, (1976).

Fuero de Salamanca, 1ª edición, Editorial Ayuntamiento y Diputación de Salamanca, 98 págs., Salamanca, 1985.

GAENSSLEN, R. E., BELL, S. C., LEE, H. C., "Distributions of Genetic Markers in United States Populations: I. Blood Group and Secretor Systems", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 32, págs. 1016-1058, (1987).

GAENSSLEN, R. E., BELL, S. C., LEE, H. C., "Distributions of Genetic Markers in United States Populations: II. Isoenzyme Systems", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 32, págs. 1248-1381, (1987).

GARBER, R. A., DELAPOINTE, L., MORRIS, J. W., "PGM₁ and Gc subtype gene frequencies in a California hispanic population", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 35, págs. 773-776, (1983).

GARCIA GARCIA, A., “Los difíciles inicios (siglos XIII-XIV)”. En: FERNANDEZ ALVAREZ, M. (ed.), *La Universidad de Salamanca*, 1ª edición, Ediciones Universidad de Salamanca, vol. 1, págs. 13-34, Salamanca, 1989.

GARCIA MARTIN, B., *El proceso histórico de despoblamiento en la provincia de Salamanca*, 1ª edición, Ediciones Universidad de Salamanca, 163 págs., Salamanca, 1982.

GARCIA ZARZA, E., “La penillanura salmantina”. En: SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, 1ª edición, Salvat, S. A. de Ediciones, vol. 8, págs. 60-78, Pamplona, 1973.

GARCIA ZARZA, E., *Origen histórico del latifundismo salmantino*, 2ª edición, Editorial Centro de Estudios Salmantinos. Confederación Española de Centros de Estudios Locales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 162 págs., Salamanca, 1986.

GARCIA ZARZA, E., “Pueblos y paisajes”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, 1ª edición, Editorial Mediterraneo, págs. 9-32, Madrid, 1990.

GARCIA ZARZA, E., “Geografía”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, 1ª edición, Editorial Mediterraneo, págs. 33-56, Madrid, 1990.

GENE, M., HUGUET, E., CARRACEDO, A., ERCILLA, G., CORBELLA, J., “Frequency and distribution of Pi, Gc, Tf and PLG subtypes by isoelectric focusing in Barcelona”. En: BRINKMANN, B., K. HENNINGSSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 235-239, Berlin Heidelberg, 1986.

GENE, M., HUGUET, E., “Proteínas plasmáticas”. En: HUGUET RAMIA, E, CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, 1ª edición, Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., págs. 88-112, Barcelona, 1988.

GIBLETT, E. R., “Genetics polymorphisms in human blood”, *Annual Review of Genetics*, vol. 11, págs. 13-28, (1977).

GIBLETT, E. R., "Antígenos eritrocitarios y anticuerpos". En: WILLIAMS, W. I., BEUTLER, E., ERSLEV, A. J., RUNDLES, R. W., *Hematología*, 2ª edición, Editorial Salvat Editores, S. A., vol. 2, págs. 1591-1606, Barcelona, 1983.

GIBLETT, E. R., SCOTT, N. M., "Red cell acid phosphatase: racial distribution and report of a new phenotype", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 17, págs. 425-432, (1965).

GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, 4ª edición, Salvat Editores, S. A., 1058 págs., Barcelona, 1991.

GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, 5ª edición, Masson, S.A., 1214 págs., Barcelona, 1998.

GOLDEN, V. L., SENSABAUGH, G. F., "Characterization of the phosphotransferase activity of red cell acid phosphatase (AcP₁)". En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs.123-126, Berlin Heilderberg, 1986.

GOLDEN, V. L., SENSABAUG, G. F., "Phenotypic variation in the phosphotransferase activity of human red cell acid phosphatase (AcP₁)", *Human Genetics*, vol. 72, págs. 340-343, (1986).

GONZALEZ GARCIA, M., *Salamanca: La repoblación y la ciudad en la baja Edad Media*, 2ª edición, Editorial Centro de Estudios Salmantinos. Patronato "José Mª Quadrado". Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 150 págs., Salamanca, 1988.

GRUMBAUM, B. W., *Handbook for forensic individualization of human blood and blodstains*, 1ª edición, Göttingen, 1981.

GUBMANN, S., "Beitrag zur genetik der sauren phosphatase der erythpcyten des menschen (E.C.:3.1.3.2): A variant of the phenotype BC?", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 71, págs. 289-292, (1973).

HADDAD, J. G., WALGATE, J., "25-hydroxy vitamin D transport in human plasma. Isolation and partial characterization of calcifodiol binding protein", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 251, págs. 4803-4809, (1976).

HADDAD, J. G., HILLMAN, L., ROJANASATHIS, S., "Human serum binding capacity and affinity for 25-hydroxy-cholecalciferol", *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 43, págs. 86-91, (1976).

HARRIS, H., HOPKINSON, D. A., LUFFMAN, J. E., RAPLEY, S., "Electrophoretic variation in erythrocyte enzymes". En: BEUTLER, E. (ed.), *Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism*, 1ª edición, págs.1-20, New York, 1968.

HARRISON, *Principios de Medicina Interna*, 13ª edición, Interamericana. MacGraw-Hill, 2 volúmenes, Madrid, 1994.

HECK, L. W., KAPLAN, A. P., "A role for α_1 -antitrypsin in the regulation of coagulation", *Federation Proceedings*, vol. 33, págs. 642-647, (1974).

HECK, L. W., KAPLAN, A. P., "Substrates of Hageman factor. I. Isolation and characterization of human factor XI (PiA) and inhibition of the activated enzyme by alpha-1-antitrypsin", *Journal of Experimental Medicine*, vol. 140, págs. 1615-1630, (1974).

HEIDE, H. G., PETERSEN, N., BRINKMANN, B., "Forensischer beweiswert quantitativer untersuchungen der isoenzyme saure Erythrocytenphosphatase (SEP) und glutamat-pyruvat-transaminase (GPT) beiderklärung strittiger abstammungs-verhältnisse", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 74, págs. 177-180, (1974).

HENKE, J., BASLER, M., "On recent observations in the Rhesus blood group system. I. A weak expressions of the Rh antigen e. II. Finding of the rare Rh antigen C^x", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 86, págs. 255-259, (1981).

HERBICH, J., FISHER, R. A., HOPKINSON, D. A., "Atypical segregation of human red cell acid phosphatase phenotypes evidence for a rare "silent" allele P⁰", *Annals of Human Genetics*, vol. 34, págs. 145-151, (1970).

HIRSCHFELD, J., "The Gc system. Immuno-electrophoretic studies of normal human sera with special reference to a new genetically determined serum system (Gc)", *Progress in Allergy*, vol. 6, págs. 155-186, (1962).

HODGES, L. C., LAINE, R. , CHAN, S. K., “Structure of the oligosaccharide chains in human alpha-1-protease inhibitor”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 254, págs. 8208-8212, (1979).

HOPKINSON, D. A., SPENCER, N., HARRIS, H., “Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism”, *Nature*, vol. 199, págs. 969-971, (1963).

HOPKINSON, D. A., SPENCER, N., HARRIS, H., “Genetical studies on human red cell acid phosphatase”, *The American Journal of Human Genetics*, vol. 16, págs. 141-154, (1964).

HÖHN, P., WALTHER, G., LEITHOFF, H., “Discelektrophoretische differenzierung saurer phosphatase verschiedener herkunft”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 68, págs. 129-137, (1971).

HOSTE, B., Group-specific (Gc) and transferrin (Tf) subtypes ascertained by isoelectric focusing. A simple nonimmunological staining procedure for Gc, *Human Genetics*, vol. 50, págs. 75-79, (1979).

HUGUET, E., GENE, M., ERCILLA, G., CARRACEDO, A., CASTILLO, R., CORBELLA, J., “Study of the polymorphic variants of AcP, PGM₁, and GLO in the population of Barcelona (Spain)”. En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 228-231, Berlin Heidelberg, 1986.

HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, 1ª edición, Editorial Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., 205 págs., Barcelona, 1988.

HUGUET RAMIA, E., GENE BADIA, M., “Marcadores genéticos eritrocitarios”. En: HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., GENE BADIA, M., *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*, 1ª edición, Editorial Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., págs. 78-87, Barcelona, 1988.

HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., “Investigación de la paternidad”. En: GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y*

Toxicología, 4ª edición, Salvat Editores, S. A., págs. 1033-1043, Barcelona, 1991.

HUGUET RAMIA, E., CARRACEDO ALVAREZ, A., “Investigación biológica de la paternidad”. En: GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, 5ª edición, Masson, S.A., págs. 1167-1176, Barcelona, 1998.

HUMMEL, K., “Nachweis außerehelicher Abkunft und Ermittlung des wahren Vaters nach 70 Jahren”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 98, págs. 75-79, (1987).

HUMMEL, K., “Nutzen der Ausschlußwahrscheinlichkeit im Blutgruppengutachten”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 95, págs. 175-183, (1985).

HUMMEL, K., “The Essen-Möller method”. En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 453-458, Berlin Heidelberg, 1986.

HUMMEL, K., “Zum “Utilitäts”-Prinzip in Rahmen der gerichtlichen Feststellung von Blutsverwandtschaft mittels serostatistik”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 98, págs. 111-118, (1987).

HUMMEL, K., “Zur beweislage in fällen strittiger abstammung aus der sicht des blutgruppengutachters”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 90, págs. 211-218, (1983).

HUMMEL, K., CONRADT, J., “Calculation of percentage of cases on file with an unnamed father in 100 one-man and 100 two-man cases (Filiation cases) from South-West Germany in 1976-1981”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 88, págs. 277-284, (1982).

HUMMEL, K., IHM, P., SCHMIDT, V., “Beurteilung einer nach der Formel von Esen-Möller gefundenen Vaterschaftswahrscheinlichkeit in Hinblick auf die gegebene Mutter-Kind- Konstellation”, *Deutsche Zeitschrift für die Gesamte Gerichtliche Medizin*, vol. 66, págs. 97-122, (1969).

HUMMEL, K., IHM, P., SCHMIDT, U., *Biostatistical Opinion of Parentage: Table-Part 1*, 1ª edición, Editorial Fischer, 184 págs., Stuttgart, 1971.

HUMMEL, K., NALLISER, G., *Biostatistical Opinion of Parentage: Table-Part 2*, 1ª edición, Editorial Fischer, 395 págs., Stuttgart, 1973.

JANOFF, A., BASCH, R. S., “Further studies on elastasa-like esterases in human leukocyte granules”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 136, págs. 1045-1049, (1971).

JAYLE, M. F., GILLARD, P., “Prècipitation saline d’une proteine définie dans un mélange hetérogène”, *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique*, vol. 29, págs. 149-157, (1947).

JENKINS, T., CORFIELD, V., “The red cell acid phosphatase polymorphism in Southern Africa: population data and studies on the R, RA and RB phenotypes”, *Annals of Human Genetics*, vol. 35, págs. 379-391, (1972).

JÖRGENSEN, G., RITTER, H., VOGEL, F., “Polimorfismo Gc (“componente específico de grupo”)”. En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética humana*, 1ª edición, Ediciones Toray, S.A., vol. 3, págs.112-142, Barcelona, 1980.

KACZMAREK, M. J., “On the isoenzymes of human red cell acid phosphatase”, *Biochemical an Molecular Medicine*, vol. 16, págs. 173-176 (1976).

KAMBOH, M. I., FERRELL, R. E., “Ethnic variation in vitamin D-binding protein (Gc): a review of isoelectric focusing studies in human populations”, *Human Genetics*, vol. 72, págs. 281-293, (1986).

KAPLANOGLON, L. B., TRIANTAPHYLLIDIS, C. D., “Genetic polymorphisms in a North-Greek population”, *Human Heredity*, vol. 32, págs. 124-129, (1982).

KARP, G. W., SUTTON, H. E., “Some new phenotypes of human red cell acid phosphatase”, *The American Journal of Human Genetics*, vol. 19, págs. 54-62, (1967).

KATSUMATA, Y., SATO, M., “A simple method for purification of anti-A and anti-B antibodies using glutaraldehyde-fixed human red blood cells”, *Zeitschrift fur Rechtsmedizin*, vol. 95, págs. 163-166, (1985).

KELLERMANN, G., VLEINMANN, E., WALTER, H., “Zur anwendbarkeit des Pi-systems in der vaterschaftsbegutachtung”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 71, págs. 24-26, (1972).

KIRK, R. L., MCDERMID, E. M., BLAKE, N. M., WIGHT, R. J., YAP, E. H., SIMONS, M. J., “The distribution of red cell enzyme and serum protein groups in a population of Dani (Pit River, West Irian)”, *Humangenetik*, vol. 17, págs. 345-350, (1973).

KLEIN, H. G., “Grupos sanguíneos y transfusión de sangre”, En: HARRISON, *Principios de Medicina Interna*, 13ª edición, Interamericana-McGraw-Hill, vol. 2, págs. 2059-2061, Madrid, 1994.

KLUG, W. S., CUMMINGS, M. R., *Conceptos de genética*, 1ª edición, Editorial Prentice Hall Iberia, S. R. L., 813 págs., Madrid, 1999.

KOCH, G., SCHWANITZ, G., “Cromosomas y paternidad”, *Folia Clínica Internacional*, vol. 3, págs. 182-186, (1975).

KOUVATSI, A., TRIANTAPHYLLIDIS, C. D., “Gc and Tf subtypes in Greece”, *Human Heredity*, vol. 37, págs. 62-64, (1987).

KUEPPERS, F., “ α_1 -antitrypsin”. En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética Humana*, 1ª edición, Ediciones Toray, S.A., vol. 3, págs. 38-54, Barcelona, 1980.

KUEPPERS, F., BEARN, A. G., “Inherited variations of human serum alpha-1-antitrypsin”, *Science*, vol. 154, págs. 407-408, (1966).

KUEPPERS, F., BRISCOE, W. A., BEARN, A. G., “Hereditary deficiency of serum alpha-1-antitrypsin”, *Science*, vol. 146, págs. 1678-1679, (1964).

KUEPPERS, F., CHRISTOPHERSON, M. J., “Alpha-1-antitrypsin: further genetic heterogeneity revealed by isoelectric focusing”, *The American Journal of Human Genetics*, vol. 30, págs. 359-365, (1978).

KUEPPERS, F., HARPER, B., "Group-specific component (Gc) "subtypes" of Gc1 by isoelectric focusing in US blacks and whites", *Human Heredity*, vol. 29, págs. 242-249, (1979).

KÜHNEL, P., "Isoelectric focusing in forensic serology". En: ALLEN, P. C., ARNAUD, P. (eds.), *Electrophoresis*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 145-149, Berlin, 1981.

KÜHNEL, P., SPIELMANN, W., "AcP1*K, ein neues allel im system der sauren erythrozyten-phosphatase". En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 132-135, Berlin Heidelberg, 1986.

LACADENA, J. R., *Genética*, 3ª edición, Editorial A.G.E.S.A, 1301 págs., Madrid, 1981.

LAI, L., NEVO, S., STEINBERG, A. G., "Acid phosphatase of human red cells predicted phenotype conforms to a genetic hypothesis", *Science*, vol. 145, págs. 1187-1188, (1964).

LANDSTEINER, K., "Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe", *Ab. Bakt. Y. Abt. Orig.*, vol. 27, págs. 357-362, (1900).

LANDSTEINER, K., WIERNER, A. S., "An agglutinable factor in human blood recognized immune sera for rhesus blood", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 43, págs. 223-224, (1940).

LANDSTEINER, K., WIERNER, A. S., "Studies on an agglutinogen (Rh) in human blood reacting with antirhesus sera and with human isoantibodies", *Journal of Experimental Medicine*, vol. 74, págs. 309-320, (1941).

LAURELL, C. B., ERICKSSON, S., "The electrophoretic α_1 -globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency", *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 15, págs. 132-140, (1963).

LE ROY, H. L., *ABC de la genética de poblaciones*, 1ª edición, Editorial Acribia, 167 págs., Zaragoza, 1970.

LEFRANC, M. P., CHIBANI, J., HELAL, A. N., BOUKEF, K., SEGER, M. J., LEFRANC, G., "Human transferrin (Tf) and group specific component (Gc) subtypes in Tunisia", *Human Genetics*, vol. 59, págs. 60-63, (1981).

LEHNINGER, A. L., *Bioquímica*, 2ª edición, Editorial Ediciones Omega, S.A., 1117 págs., Barcelona, 1985.

LEVINE, P., STETSON, R. E., "An unusual case of intragroup agglutination", *Journal of American Medical Association*, vol. 113, págs. 126-127, (1939).

LINDENBERG, P., BIONDI, G., "Distribution of Gc subtypes in four Albanian and three Serbo-Croatian Communities of Molise, Italy". En: BRINKMANN, B., HENNINGSSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 253-256, Berlin Heilderberg, 1986.

LLORENTE MALDONADO, A., "Tanto Los Arribes como Las Arribes son construcciones lícitas, pero.....", *La Gaceta*, pág. 4, 30 de enero de 1996.

LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Estudio sobre el habla de La Ribera*, 1ª edición, Editorial Publicaciones del Colegio Trilingüe de la Universidad de Salamanca (Del Consejo Superior de Investigaciones Científicas), 246 págs., Salamanca, 1947.

LLORENTE MALDONADO DE GUEVARA, A., *Las comarcas históricas y actuales de la provincia de Salamanca*, 3ª edición, Editorial Centro de Estudios Salmantinos. Confederación Española de Centros de Estudios Locales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 160 págs., Salamanca, 1990.

LORENTE ACOSTA, J. A., LORENTE ACOSTA, M., *El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica*, 1ª edición, Editorial Editorial Comares, 307 págs., Granada, 1995.

LORENZO, E., "Las/Los Arribes, valen los dos, pero....", *La Gaceta*, pág. 4, 20 de Enero de 1996.

LUFFMAN, J. E., HARRIS, H. A., "A comparison of some properties of human red cell acid phosphatase in different phenotypes", *Annals of Human Genetics*, vol. 30, págs. 387-401, (1967).

MALUQUER DE MOTES, J., *Carta arqueológica de España. Salamanca*, 1ª edición, Editorial Diputación Provincial de Salamanca, 130 págs., Salamanca, 1956.

MARCINKOWSKI, T., KRZYMANSKA, M., "Fréquence des exclusions de Paternité en relation avec les différents systèmes de groupes sanguins examinés", *Médecine legale et Dommage Corporel*, vol. 2, págs. 353-357, (1969).

MARCINKOWSKI, T., "Omozigotismo, eterozigotismo e frequenza genica nell'ambito dei fattori C, c, D, E, e del sistema Rh nella popolazione polacca", *Zacchia*, vol. 7, págs. 270-280, (1971).

MARCINKOWSKI, T., KRZYMANSKA, M., "Esclusioni convergenti di paternità nei risultati di ricerche sierologiche", *Zacchia*, vol. 7, págs. 119-125, (1971).

MARIN CASTAN, F., "La posición del Juez civil ante la negativa injustificada del demandado a la práctica de las pruebas biológicas tras la STC 7/1994, de 17 de enero", *Civil (Recopilacion de ponencias y comunicaciones)*, 1ª edición, Editado por el Consejo General del Poder Judicial, págs. 41-67, Madrid, 1997.

MARSH, W. L., CHAGANTI, R. S. K., GARDNER, F. H., MAYER, K., NOWELL, P. C., GERMAN, J., "Mapping Human autosomes: evidence supporting assignment of Rhesus to the short arm chromosome N° 1", *Science*, vol. 183, págs. 966-968, (1974).

MARTIN, W., SACHS, V., WEISE, W., "Einführung eines normierten "Paternity Index" bei der statistischen Auswertung von Blutgruppenbefunden in der Abstammungsbegutachtung", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 88, págs. 31-37, (1982).

MARTIN ANDRES, A., LUNA DEL CASTILLO, J. D., *Bioestadística para las ciencias de la Salud*, 2ª edición, Ediciones Norma S.A., 614 págs., Madrid, 1989.

MARTINEZ JARRETA, M., *La prueba del ADN en medicina forense*, 1ª edición, Editorial Masson, S. A., 342 págs., Barcelona, 1999.

MARTIN VEGA, C., “Grupos sanguíneos. Inmunohematología”. En: FARRERAS-ROZMAN, *Medicina Interna*, 13ª edición, Editorial Mosby/Doyma Libros, vol. 2, págs. 1805-1807, Madrid, 1998.

MARZIANO, E., “I fattori gruppo-specifici del sistema MNSs nella Sicilia orientale”, *Zacchia*, vol. 12, págs. 297-308, (1976).

MATA MARTIN, L., *Narraciones salmantinas de Las Arribes del Duero*, 1ª edición, Editorial Gráficas Cervantes, S.A., 211 págs., Salamanca, 1986.

MAYR, W. R. (de.), *Advances in Forensic Haemogenetics 2*, 1ª edición, Springer-Verlag, 654 págs, Berlin Heilderberg, 1988.

MERLI, S., UMANI RONCHI, G., COLESANTI, C., *Le indagini medico-legali su macchie di sangue*, 1ª edición, Edizioni Cepi, 150 págs., Roma, 1980.

MESSETER, L., LISOWSKA, E., LUNDBLAD, A., “Monoclon al antibodies against M and N antigens”. En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 8-12, Berlin Heilderberg, 1986.

MINAKATA, K. , ASANO, M., “Distribution od likelihood ratio in relation to the exlucion probability”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 85, págs. 189-197, (1980).

MORALEDA, J. M., CORRAL, M., “Grupos sanguíneos. A. hemolíticas por aloanticuerpos. Enfermedad hemolítica del recién nacido”. En: MORALEDA JIMENEZ, J. M. (ed.), *Hematología*, 1ª edición, Luzan 5 S.A. de Ediciones, págs. 131-142, Madrid, 1996.

MORALEDA JIMENEZ, J. M. (ed.), *Hematología*, 2ª edición, Luzan 5 S.A. de Ediciones, 557 págs., Madrid, 1996.

MOREAU, P., BROCTEUR, J., ANDRE, A., “Les possibilités et les limitations actuelles de l’expertise médico-légale dans l’investigation de

paternité”, *Actes XXXème Congrès Internationale de Médecine Légale et Sociale de Langue Française*, Coimbra, 1965.

MORENO BLANCO, M., *La Gudina*, 1ª edición, Editorial Imprenta Vitigudense, 284 págs., Vitigudino (Salamanca), 1977.

MOURANT, A. E., KOPEC, A. C., DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K., *The distribution of human blood groups and other polymorphisms*, 2ª edición, Editorial Oxford University Press, 1055 págs., London, 1976.

MOYA PUEYO, V., CAMPILLO, F., “Aspectos inmunohepatológicos en la exclusión de la paternidad”, *Revista Española de Medicina Legal*, vol. 26-27, págs. 30-49, (1981).

MOYA PUEYO, V., MUÑOZ TUERO, L. M., VILLALAIN BLANCO, J. D., “Comentarios sobre un informe de investigación de paternidad por los grupos sanguíneos emitidos por la Escuela de Medicina Legal”, *Revista Española de Medicina Legal*, vol. 8-9, págs. 56-61, (1976).

MUDD, J. L., ADAMS, D. E., “A modification of the Microp'late Method for Reverse ABO Typing of Bloodstains and Additional Validation Studies”, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 35, págs. 447-451, (1990).

MUÑOZ, J. I., RODRIGUEZ CALVO, M. S., “Estima de frecuencias génicas”. En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, 1ª edición, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur, págs. 11-28, Santiago de Compostela, 1996.

MURCH, R. S., BUDOWLE, B., “Applications of Isoelectric Focusing in Forensic Serology”, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 31, págs. 869-880, (1986).

NELSON, M. S., “A computer assisted population frequency study of fourteen polymorphic blood grouping systems in North Carolina”, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 29, págs. 762-763, (1984).

NELSON, M. S., SMITH, E. A., CARLTON, W. K., ANDRUS, R. H., REISNER, E. G., “Three new phenotypes of human red cell acid phosphatase:

AcP₁FA, AcP₁GA and AcP₁GB”, *Human Genetics*, vol. 67, págs. 367-371, (1984).

NEVO, S., “Gc subtypes in some population groups from Israel”, *Human Heredity*, vol. 37, págs. 161-169, (1987).

NIJENHUIS, L. E., “Mathematical aspects of the paternity index $I=X/Y$, especially in relation to the chance of non-exclusion of non fathers”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 89, págs. 1-20, (1982).

NOGALES DELICADO, D., *Historia de Ciudad Rodrigo*, 2ª edición, Editado por la Asociación de Amigos de Ciudad Rodrigo, 204 págs., Ciudad Rodrigo, 1982.

Nomenclator de los municipios de España, 1ª edición, Salvat S.A. de Ediciones, 260 págs., Pamplona, 1975.

Nomenclator Comercial de los Pueblos de España, 9ª edición, Editorial Imp. Hijos de E. Minuesa S.L., 860 págs., Madrid, 1982.

NYMAN, M., “On plasma proteins with heme or haemoglobin binding capacity”, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 11, págs. 39-43, (1960).

OCHANDO, D., *Genética Poblacional, Evolutiva, Cuantitativa. Problemas*, Editorial Eudema, S.A. (Ediciones de la Universidad Complutense, S.A.), 214 págs., Madrid, 1990.

OEPEN, I., “Fehlbestimmung der Faktoren MNSs, Fy(a) sowie der Rhesusfaktoren CcDEe an gealterten Blutproben”, *Deutsche Zeitschrift für die Gesamte Gerichtliche Medizin*, vol. 66, págs. 130-138, (1969).

OHLSSON, K., “Neutral leucocyte proteases and elastase inhibited by plasma alpha-1-antitrypsin”, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, vol. 28, págs. 251-253, (1971).

OHLSSON, K., OHLSSON, I., “The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenase”, *European Journal of Biochemistry*, vol. 36, págs. 473-481, (1973).

OHSHIMA, T., MAEDA, H., TANAKA, N., TAKAYASU, T., NAGANO, T., "Immunocytochemical study on the ultrastructural localization of human-type ABO (H)-blood group activities in a Macaque (*Macaca irus*)", *Zeitschrift fur Rechtsmedizin*, vol. 100, págs. 139-148, (1988).

OLSON, J., LAAS, T., "Isoelectric focusing in agarose under denaturing conditions", *Journal of Chromatographic Science*, vol. 215, págs. 373-378, (1981).

OTA, M., FUKUSHIMA, H., YONEMURA, I., HASEKURA, H., "Detection of ABO blood group-active glycolipids extracted from red cell membrane and heat hematoma using TLC-immunostaining", *Zeitschrift fur Rechtsmedizin*, vol. 100, págs. 215-221, (1988).

OWEN, M. C., CARRELL, R. W., BRENNAN, S. O., "The abnormality of the S variant of human alpha-1-antitrypsin", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 453, págs. 257-261, (1976).

PAPIHA, S. S., WHITE, I., SINGH, B. N., AGARWAL, S. S., SHAN, K. C., "Group-specific component (c) subtypes in the Indian subcontinent", *Human Heredity*, vol. 37, págs. 250-254, (1987).

PASCALI, V. L., PETRUCCI, R., AUCONI, P., "Group-specific Component Sutypes Along the Italian Peninsula", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 92, págs. 307-310, (1984).

PASCALI, V. L., CONTE, G., AUCONI, P., CARRACEDO, A., "Improved diagnosis of anritrypsin subtypes by ultranarrow immobilized pH gradients".En: BRINLMANN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 107-109, Berlin Heilderberg, 1986.

PATZELT, D., NAGAI, T., SCHRÖDER, H., HERMANN, H. J., "Die Gc-Subtypen: Darstellung mittels isoelektrischer Fokussierung", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 90, págs. 45-52, (1983).

PEDAL, I., KUHN, K., HÜLLE, J., "Immunhistochemische Bestimmung von mütterlicher und kindlicher Blutgruppe (ABO) an reifem Placentagewebe", *Zeitschrift fur Rechtsmedizin*, vol. 94, págs. 145-153, (1985).

POLESKY, H. F., DYKES, D., "Use of isoelectric focusing in parentage testing", *Forensic Science International*, vol. 18, pág. 276, (1981).

POLESKY, H. F., "The frequency of "null" genes calculated from trios in disputed parentage cases", *Forensic Science International*, vol. 23, pág. 69, (1983).

POLONOVSKI, M., JAYLE, M., "Existence dans le plasma sanguin d'une substance activant l'actiun peroxydasique de l'hémoglobine", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 128, págs. 457-460, (1938).

Población de los Municipios Españoles. Revisión del Padrón Municipal a 1 de Enero de 1998, 1ª edición, Editorial INE. Artes gráficas, 235 págs., Madrid, 1999.

Poblaciones de Derecho y de Hecho de los Municipios Españoles. Censo de Población de 1991, 1ª edición, Editorial INE. Artes gráficas, 255 págs., Madrid, 1992.

"Producción de las Centrales del Sistema Duero", *ABC - Castilla y León*, pág. 79, 11 de febrero de 1996.

PROKOP, O., *Los grupos sanguíneos humanos*, 2ª edición, Editorial Científico-Médica, 174 págs., Madrid, 1970.

RACE, R. R., MOURANT, A. E., MCFARLANE, M. N., "Travaux récents sur les antigènes et anticorps Rh avec une étude particulière de la théorie de Fisher", *Revue d'Hématologie*, vol. 1, págs. 9-21, (1946).

RACE, R. R., SANGER, R., *Les groupes sanguins chez l'homme*, 5ª edición, Editorial Masson et Cie, 590 págs., París, 1970.

RAND, S., RITTER, P., KOHFAHL, A., BRINKMANN, B., "A Comparative Study of Immuno-blotting Techniques for the Detection of Gc-Subtypes after Isoelectric Focusing on Agarose and Polyacrylamide Gels", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 98, págs. 175-180, (1987).

RANZANI, G. N., ANTONINI, G., BERETTA, M., SANTACHIERA BENERECETTI, A. S., "A study of ten red cell enzymatic markers in the

Naples population”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 89, págs. 89-95, (1982).

RAPAPORT, S., *Introducción a la hematología*, 1ª edición, Salvat Editorial, 412 págs., Barcelona, 1974.

RENNINGER, W., SPIELMANN, W., “Beitrag zur Genetik der Erythrocyten-Phosphoglucomutase. Genfrequenzen un Familienuntersuchungen an hessischen Blutspendern”, *Humangenetik*, vol. 8, págs. 64-66, (1969).

RENNINGER, W., SINA, D., “Isoenzymmuster der Phosphoglucomutase der menschlichen Spermien (Sp-PGM₁)”, *Humangenetik*, vol. 10, págs. 85-87, (1970).

REX-KISS, B., “Rh-bestimmungen und ihre anwendung zur klärung strittiger vaterschaft in Ungarn”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 67, págs. 319-323, (1970).

REX-KISS, B., SZABO, L., “Erfahrungen mit MN-blutgruppenbestimmungen bei der Begutachtung strittiger Vaterschaft in Ungarn”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 69, págs. 135-138, (1971).

REX-KISS, B., SZABO, S., “ABO-Blutgruppenbestimmungen an Strafgefangenen”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 86, págs. 295-301, (1981).

RITTNER, C., “Serum groups in paternity testing: the contribution of the systems detected by PAGIF and of complement polymorphisms”, *Forensic Science International*, vol. 18, pág. 290, (1981).

RITTNER, C., SCHNEIDER, P. M. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 4*, 1ª edición, Springer-Verlag, 451 págs., Berlin Heilderberg, 1992.

RODRIGUEZ CALVO, M. S., MUÑOZ BARUS, J. I., “Parámetros estadísticos de eficacia *a priori*”. En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, 1ª edición, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur, págs. 55-67, Santiago de Compostela, 1996.

RODRÍGUEZ SANCHEZ, A., “Historia II”. En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, 1ª edición, Editorial Mediterraneo, 232 págs., Madrid, 1990.

ROMERO PALANCO, J. L., MESA VEA-MURGUIA, M. J., GAMERO LUCAS, J., GARCÍA GALLEGO, E., “Polimorfismos de la glioxalasa I y de la fosfatasa ácida eritrocitaria en la provincia de Cádiz”, *Jornadas mediterráneas de medicina legal y forense*, 1ª edición, págs. 372-373, 1986.

ROMERO PALANCO, J. L., GARCIA GALLEGO, E., SIBON OLANO, J. A., VIZCAYA ROJAS, M. A., MESA VEA-MURGUIA, M. J., DOMINGUEZ ROMERO, F., “Frecuencia de los sistemas ABO, Rh, MN, Ss y Kk en la población de la provincia de Cadiz”, *Jornadas mediterráneas de medicina legal y forense*, 1ª edición, págs. 368-371, 1986.

ROY, R., SCHMIDT, K., GAENSSLEN, R. E., “Distributions of Genetic Markers in a Nebraska Population”, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 35, págs. 1207-1210, (1990).

ROZMAN, C., “Enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos. Hematología”. En: FARRERAS-ROZMAN, *Medicina Interna*, 8ª edición, Editorial Marín, S. A., vol. 2, págs. 333-508, Barcelona, 1974.

RUDDLE, F., RICCIUTI, F., MCMORRIS, F. A., TISCHFIELD, J., CREAGAN, R., DARLINGTON, G., CHEN, T., “Somatic cell genetic assignment of peptidase C and the Rh linkage group to chromosome A-1 in man”, *Science*, vol. 176, págs. 1429-1431, (1972).

RUIZ DE LA CUESTA, J. M., BARASONA, P., GREMO, A., BANDRES, F., PEREZ CONESA, A. F., “Importancia del estudio de la proteína Gc en la investigación de paternidad”, *Revista Española de Medicina Legal*, vol. 46-47, págs. 25-27, (1986).

RUIZ DE LA CUESTA, J. M., “Cálculo de la probabilidad de paternidad en los sistema ABO y Rh”. En: CARRACEDO, A., BARROS, F., *Problemas bioestadísticos en genética forense*, 1ª edición, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur, págs. 83-89, Santiago de Compostela, 1996.

SACHS, V., SCHMAGE, N., "Tabelle der likelihood-quotienten Y/X (nach Essen-Möller) des Rh-blutgruppensystems in allgemeiner form", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 83, págs. 331-366, (1979).

SALMON, CH., SALMON, D., MULLER, J. Y., SEGER, J., "Groupes sanguins, groupes de proteines et groupes tissulaires dans la recherche de paternité". En: DEROBERT, L., *Medicine Legale*, Puesta a punto 1980, Flammarion Medecine-Sciences, págs. 751-791, Paris, 1980.

SALVAT, J. (ed.), *Conocer España*, 1ª edición, Salvat S. A. de Ediciones, 10 vol., Pamplona, 1973.

SALVAT, J. (ed.), *Historia de España*, 1ª edición, Salvat Editores S.A., 10 vol., Barcelona, 1986.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T., *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 volúmenes, New-York, 1989.

SANCHEZ CASCOS, A., *Manual de Genética Médica*, 1ª edición, Editorial Científico-Médica, 193 págs., Barcelona, 1980.

SANCHEZ-TEMBLEQUE PINEDA, A., "La investigación de la paternidad en las resoluciones del Tribunal Constitucional", *Actualidad Aranzadi*, vol. 143, págs. 1-3, (1994).

SANCHO SORIA, J. L., *Aportación a la prueba positiva de investigación de la Paternidad*, Editorial Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, 125 págs., Córdoba, 1985.

SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología Clínica*, 2º edición, Ediciones Doyma, S.A, 735 págs., Barcelona, 1988.

SANTOS GUTIERREZ, L., "Las/Los Arribes", *La Gaceta*, pág. 6, 23 de Enero de 1996.

SCHEIL, H. G., DRIESEL, A. J., RÖHRBORN, G., "Distribution of Gc-Subtypes in Western Germany (Düsseldorf Region)", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 84, págs. 95-97, (1980).

SCHROEDER, W. T., MILLER, M. F., WOO, S. L. C., SAUNDERS, F., "Chromosomal localization of the human alpha-1-antitrypsin gene (Pi) to 14q31-32", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 37, págs. 868-872, (1985).

SCHULTZE, H. E., HEIDE, K., HAUPT, H., "Alpha-1-antitrypsin aus Humanserum", *Wiener Klinische Wochenschrift*, vol. 40, págs. 427-429, (1962).

SCHWARZFISCHER, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Bases generales y genética morfológica", En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética Humana*, 1ª edición, Ed. Toray S.A., vol. 4, págs. 1-130, Barcelona, 1976.

SCHWERD, W., "Zum Beweiswert der MN-Differenzierung aus Blutspuren", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 80, págs. 293-298, (1978).

SEGALES, J. M., SAEZ, M., FRANCO, E., GRIFOLS, J., "Grupos sanguíneos. Inmunohematología". En: SANS SABRAFEN, J. (ed.), *Hematología Clínica*, 2ª edición, Ediciones Doyma, S.A., págs. 90-112, Barcelona, 1988.

SELVIN, S., "Statistical analysis of blood genetic evidence". En: GRUMBAUM, B. W. (ed.), *Handbook for Forensic Individualization of Human Blood and Bloodstains*, 1ª edición, págs. 177-211, Göttingen, 1981.

SENA, E., "Prólogo". En: AGERO, J. (ed.), *Salamanca*, 1ª edición, Editorial Mediterraneo, págs. 8-9, Madrid, 1990.

Sentencia del Tribunal Constitucional 7/1994, de 17 de enero. *Tribunal Constitucional. Jurisprudencia Sistematizada*, 1ª edición, Boletín de Jurisprudencia Constitucional. Publicaciones de las Cortes Generales, págs. 594-596, Madrid, 1996.

Sentencia del Tribunal Supremo de 7 de febrero de 1986. *Repertorio de Jurisprudencia*, 1ª edición, Editorial Aranzadi, tomo LIII, vol. 1, págs. 412-413 (Marginal 448), Pamplona, 1986.

Sentencia del Tribunal Supremo de 21 de abril de 1888. *Repertorio de Jurisprudencia*, 1ª edición, Editorial Aranzadi, tomo LV, vol. 2, págs. 2177-2178 (Marginal 2225), Pamplona, 1988.

Sentencia del Tribunal Supremo de 5 de abril de 1990. *Repertorio de Jurisprudencia*, 1ª edición, Editorial Aranzadi, tomo LVII, vol. 3, págs. 3608-3610 (Marginal 2701), Pamplona, 1990.

Sentencia del Tribunal Supremo de 1 de marzo de 1994. *Repertorio de Jurisprudencia*, 1ª edición, Editorial Aranzadi, tomo LXI, vol. 1, págs. 2183-2184, (Marginal 1634), Pamplona, 1994.

Sentencia del Tribunal Supremo de 29 de abril de 1994. *Repertorio de Jurisprudencia*, 1ª edición, Editorial Aranzadi, tomo LXI, vol. 2, págs. 3978-3979, (Marginal 2948), Pamplona, 1994.

Sentencia del Tribunal Supremo de 18 de mayo de 1994. *Repertorio de Jurisprudencia*, 1ª edición, Editorial Aranzadi, tomo LXI, vol. 3, págs. 5516-5517, (Marginal 4092), Pamplona, 1994.

Sentencia del Tribunal Supremo de 27 de mayo de 1994. *Repertorio de Jurisprudencia*, 1ª edición, Editorial Aranzadi, tomo LXI, vol. 2, págs. 5098-5099, (Marginal 13754), Pamplona, 1994.

SEPTIMIO, “Son “Los” Arribes”, *La Gaceta*, pág. 60, 22 de enero de 1996.

SILVEIRA, E., “Exclusion of Paternity by Rh-Hr and M-N-S Genotyping”, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 12, págs. 77-81, (1967).

SMERLING, M., “Saure erythrocytenphosphatase: Eine neue variante”, *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 73, págs. 17-21, (1973).

SMITH, T. A., MYERS, H. B., “The detection of group specific component (Gc) in the general population of West Virginia”, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 35, págs. 1436-1440, (1990).

SMITHIES, O., WALKER, N. F., “Notation for serum-protein groups and the genes controlling their inheritance”, *Nature*, vol. 176, págs. 1265-1266, (1955).

SORENSEN, S. A., “Report and characterization of a new variant, EB, of human red cell acid phosphatase”, *The American Journal of Human Genetics*, vol. 27, págs. 100-109, (1975).

SORGO, G., BRINKMANN, B., "Inheritance of the allele Pr of the red cell acid phosphatase (E. C. 3.1.3.2) in a caucasian family", *Human Genetics*, vol. 24, págs. 155-157, (1974).

SPENCER, N., HOPKINSON, D. A., HARRIS, H., "Quantitative differences and gene dosage in the human red cell acid phosphatase polymorphism", *Nature*, vol. 201, págs. 299-300, (1964).

SPIELMANN, W., KÜHNEL, P., "Das Blutgruppengutachten: Beziehungen zwischen Untersuchungsumfang und Zuverlässigkeit der Vaterchaftsfeststellung", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 90, págs. 35-40, (1983).

SUSSMAN, L. N., "Blood grouping tests for non-paternity", *Journal Forensic Sciences*, vol. 18, págs. 287-289, (1973).

SVASTI, J., KUROSKY, A., BENNET, A., BOWMAN, B. H., "Molecular Basis for the Three Major forms of human Serum Vitamin D Binding Protein (Group-Specific Component)", *American Chemical Society*, vol. 18, págs. 1611-1617, (1979).

SWALLON, D. M., POVEY, S., HARRIS, H., "Activity of the "red cell" acid phosphatase locus in other tissues", *Annals of Human Genetics*, vol. 37, págs. 31-38, (1973).

TAKAYASU, T., OHSHIMA, T., MAEDA, H., NAGANO, T., TSUJI, T., "Human-type blood group activities on chimpanzee erythrocytes with special reference to M and N", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 101, págs. 237-246, (1988).

TALAVERA FABUEL, A., "Investigación de la paternidad. Pruebas morfoantropológicas", *Revista Española de Medicina legal*, vol. 50-51, págs. 56-58, (1987).

TAMAKI, Y., NISHIMUKAI, H., KISHIDA, T., FUKUDA, M., "Simultaneous phenotyping of genetic markers for paternity testing", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 99, págs. 135-142, (1987).

THOMPSON, J., THOMPSON, M. W., *Genética médica*, 2ª edición, Salvat Editores, S.A., 401 págs., Barcelona, 1983.

THYMANN, M., "Gc subtypes determined by agarose isoelectric focusing. Distribution in Denmark and application to paternity cases", *Human Heredity*, vol. 31, págs. 214-221, (1981).

THYMANN, M., HJALMARSSON, K., SVENSSON, M., "Five new Gc variants detected by isoelectric focusing in agarose gel", *Human Heredity*, vol. 60, págs. 340-343, (1982).

TILLS, D., KOPEC, A. C., TILLS, R. E., *The distribution of the human blood groups and other polymorphisms*, 1ª edición, Editorial Oxford University Press, 343 págs., Oxford, 1983.

Tribunal Constitucional. Jurisprudencia Sistematizada, 1ª edición, Boletín de Jurisprudencia Constitucional. Publicaciones de las Cortes Generales, 808 págs., Madrid, 1996.

TUROWSKA, B., "Evidence of a "new" allele of red cell acid phosphatase AcP K", *Forensic Science International*, vol. 26, págs. 163-167, (1984).

VILLANUEVA, E., CASTELLANO, M., "La investigación de la paternidad ante la perspectiva constitucional", *Revista Española de Medicina Legal*, vol. 26-27, págs. 5-29, (1981).

VILLANUEVA CAÑADAS, E., LORENTE ACOSTA, J. A., "Aplicaciones del ácido desoxirribonucleico (DNA) en Medicina legal". En: GISBERT CALABUIG, J. A., *Medicina Legal y Toxicología*, 5ª edición, Editorial Masson, S. A., págs. 1177-1181, Barcelona, 1998.

VILLAR Y MACIAS, M., *Historia de Salamanca*, 1ª edición, Editorial Imprenta de Francisco Nuñez Izquierdo, 3 volúmenes, Salamanca, 1887.

VIZCAYA, M. A., "Group-specific component (Gc) polymorphism in Cádiz (southern Spain)", *International Journal of Legal Medicine*, vol. 104, págs. 365-366, (1992).

VOGEL, F., HELMBOLD, W., "Grupos sanguíneos. Genética y estadística demográfica". En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética humana*, 1ª edición, Editorial Toray S. A., vol. 4, págs. 131-388, Barcelona, 1976.

WAKITA, Y., NARAHARA, K., TAKAHASHI, Y., KIKKAWA, K., KIMURA, S., ODA, M., KIMOTO, H., "Duplication of 2p25: conformation of the assignment of soluble acid phosphatase (AcP₁) locus to 2p25", *Human Genetics*, vol. 36, págs. 50-53, (1985).

WALTER, H., ANANTHAKRISHNAN, R., "Sistemas fosfatasas". En: BECKER, P. E. (ed.), *Genética humana*, 1ª edición, Editorial Toray S.A., vol. 3, págs. 370-409, Barcelona, 1980.

WALTER, H., DANNEWITZ, A., "On the variability of Gc-subtypes in India". En: BRINKMANN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 248-252, Berlin Heilderberg, 1986.

WALTER, H., DANKER-HOPFE, H., LEMMERMANN, M., LORENZ, M., "Genetic markers (Hp, Tf, Gc, Pi) in two Polish samples Preliminary report". En: RITTNER, C., SCHEIDER, P. M. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 4*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 376-378, Berlin Heildelberg, 1992.

WEIDINGER, J. et al., "The Gc system in paternity examinations: applications of Gc subtyping by IEF", En: HUMMEL and GERCHOW, (eds.), *Biomathematical evidence of Paternity*, 1ª edición, Springer-Verlag, 356 págs., Berlin, 1981.

WEIDINGER, S., SCHWARZFISCHER, F., "Pi subtyping by isoelectric focusing: futher genetic studies and application to paternity examinations", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 86, págs. 1-7, (1980).

WEIDINGER, S., SCHWARZFISCHER, F., "Pi M5: An additional alpha-1-antitrypsin PiM subtype revealed by IEF with immobilized pH gradients". En: BRINKMAN, B., HENNINGSEN, K. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 1*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 97-101, Berlin Heilderberg, 1986.

WEIDINGER, S., FABER, J. P., BÄCKER, U., SCHWARZFISCHER, F., OLEK, K., "A de novo mutation in the alpha-1-antitrypsin gene detected in a case of disputed paternity by DNA sequence analysis". En: RITTNER, C., SCHNEIDER, P. M. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 4*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 306-308, Berlin Heilderberg, 1992.

WEISSMANN, J., OEPEN, B., PRIBILLA, O., "Frequenzen von Enzymmerkmalen der Systeme AcP, ADA, AK, EsD, 6-PGD und PGM₁ parallel ermittelt für Türken und Deutsche im Raum Lübeck", *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, vol. 85, págs. 55-61, (1980).

WETTERLING, G., "Intragenic recombination within the alpha-1-antitrypsin locus". En: RITTNER, C., SCHNEIDER, P. M. (eds.), *Advances in Forensic Haemogenetics 4*, 1ª edición, Springer-Verlag, págs. 317-319, Berlin Heidelberg, 1992.

WIENER, A. S., "Blood groups of chinese in New York City: Application to problems of disputed parentage", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 19, págs. 735-743, (1974).

WILLIAMS, B., WILSON, K., *Principios y técnicas de bioquímica experimental*, 1ª edición, Editorial Omega, 270 págs., Barcelona, 1981.

WILLIAMS, W. I., BEUTLER, E., ERSLEV, A. J., RUNDLES, R. W., *Hematología*, 2ª edición, Salvat Editores, S.A., 2 volúmenes, Barcelona, 1983.

YOSHIDA, A., EWING, C., WESSELS, M., LIEBERMAN, J., GAIDULIS, L., "Molecular abnormality of P_iS variant of human alpha-1-antitrypsin", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 31, págs. 233-239, (1977).

YOSHIDA, A., CHILLAR, R., TAYLOR, J. C., "An alpha-1-antitrypsin variant PiB Alhambra (Lys->Asp, Glu->Asp) with rapid anodal electrophoretic mobility", *The American Journal of Human Genetics*, vol. 31, págs. 555-563, (1979).

ZAIN, P. S., SMITH, T. A., MYERS, H. B., "Population Data of Casework in West Virginia on Six Genetic Marker Systems", *Journal of Forensic Sciences*, vol. 34, págs. 1007-1010, (1989).