

55
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ANALISIS DE LA DISTRIBUCION DE LAS
FRECUENCIAS ALElicas Y GENOTIPICAS EN EL
LOCUS DIS80 EN UNA MUESTRA DE LA ZONA
METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MEXICO.

T E S I S

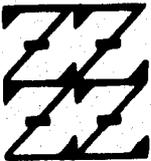
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

GABRIELA SAAVEDRA CORTES

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUBIERO DADO
DE NUESTRA REFLEXION

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Esta tesis fue realizada de forma mancomunada con la
C. Rita Adriana Licea Cadena de la Universidad
Veracruzana en el Laboratorio de Genética Forense de
la Procuraduría General de Justicia del Distrito
Federal.**

**Bajo la asesoría de:
M en C. Alfonso Luna Vasquez
QFB: Ma. Lourdes Vega Navarrete**



JURADO

Presidente: QFB: José Ponce Guerrero.

Vocal: M en C. Alfonso Luna Vasquez.

Secretario: QFB. Ma. Lourdes Vega Navarrete.

Suplente: QFB. Francisco Javier Parada Garcia.

Suplente: QFB. Enriqueta Castrejon Rodriguez.

A mis padres: Higinia y Ricardo

**Fuente de amor, vida y esperanza como
tributo que compense su bondad y sacrificios.**

Agradecimientos.

Al M en C. Alfonso Luna Vásquez.

Jefe del laboratorio de Genética Forense.

Por brindarme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por compartir los inicios y observar los avances del laboratorio de Genética Forense como parte importante dentro de los Servicios Periciales, por el apoyo brindado en el del trabajo de tesis.

Al Dr. Eduardo Gonzalez Mata.

**Director General de Servicios Periciales de la
Procuraduría General de Justicia del D. F.**

Por permitirnos realizar el trabajo dentro de dicha institución.

Al Jurado.

Por la revisión de la tesis y por la aportación de sus conocimientos a mi formación profesional.

Al Dr. Bruce Budowle.

Profesor de la academia del FBI.

Por la asesoría otorgada en el análisis estadístico.

**A mis hermanos:
Ma. Elena, Isaac y Ricardo**
con inmenso cariño.

A Antonio.
Por tu confianza, comprensión, ternura y cariño,
por madurar junto a mí, y por compartir este logro
que también es tuyo.

A Rodrigo y Rita:
Por la entrañable amistad que compartimos y quienes
me impulsaron a seguir adelante.

A mis compañeros y amigos de los Servicios Periciales.
Por la paciencia, comprensión, ayuda y sugerencias
que hicieron sobre el presente trabajo.

A las Sras. Emilia Ramírez y Mariana Moreno.
Por la confianza depositada en mí y constante aliento
para alcanzar una de mis metas.

INDICE

	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
SISTEMA JURISDICCIONAL	6
CRITERIOS PARA LA SELECCION DE UN POSIBLE MARCADOR GENETICO	
CON PROPOSITOS DE IDENTIFICACION	11
MARCADORES TRADICIONALES APLICADOS EN EL AREA FORENSE	15
ANTECEDENTES HISTORICOS SOBRE EL ADN	18
ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ADN	29
CONSECUENCIAS BIOLOGICAS DE LA ESTRUCTURA DEL ADN	34
PROPIEDADES DEL ADN	35
BASES GENETICAS PARA LA IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS	
CON PROPOSITOS FORENSES	38
METODOLOGIAS PARA EL ANALISIS DEL ADN EN EL AREA FORENSE	
POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DEL FRAGMENTO DE RESTRICCION (RFLP)	43
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	46
TIPIFICACION DEL ADN CON PROPOSITOS DE	
IDENTIFICACION LEGAL Y FORENSE	51
COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD REGION HLA DQA1	52
POLYMARKER	54
D1S80	56
VENTAJAS DE LA TIPIFICACION DEL ADN DE MATERIAL	
FORENSE BASADOS EN PCR	58
APLICACIONES DE LA TIPIFICACION DEL ADN	59
LIMITACIONES DE LA TIPIFICACION DEL ADN	61

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	62
OBJETIVOS	65
HIPOTESIS	67
DISEÑO DE LA INVESTIGACION	68
METODOLOGIA	70
DIAGRAMA DE FLUJO	72
RESULTADOS	73
CONCLUSIONES	102
SUGERENCIAS	104
ANEXO A	105
ANEXO B	108
ANEXO C	112
ANEXO D	125
GLOSARIO	128
BIBLIOGRAFIA	137

RESUMEN.

La meta del científico forense durante largo tiempo ha sido la de poder identificar con absoluta certeza si un indicio biológico recolectado del lugar de los hechos pertenece a la víctima o al presunto sospechoso.

Al igual que las huellas digitales son marcadores específicos y únicos en un individuo, la secuencia de la sustancia llamada ácido desoxirribonucleico (ADN) determina a nivel molecular la individualidad de cada persona pero su análisis es mucho más extenso y aplicable en todo tipo de muestras de naturaleza biológica (cabello, manchas de sangre y semen, diente, tejido, ect). En conjunto esta técnica se conoce como Huellas digitales del ADN y la prioridad principal de esta tecnología, es la de encontrar pequeños fragmentos de ADN conocidos como unidades repetitivas en tandem (VNTR), que sean diferentes de un individuo a otro, la aplicación de esta tecnología en problemas de identificación forense ha sido utilizada cada vez más en E.U. e Inglaterra; sin embargo en nuestro país esta tecnología se ha adoptado recientemente, por lo cual no hay un banco de datos de las frecuencias alélicas de los marcadores genéticos, y por lo tanto se desconoce la probabilidad de que dos individuos de nuestro país, tomados al azar tengan el mismo patrón genético.

Uno de los fragmentos de ADN (VNTR) y que actualmente se ha utilizado con propósitos de identificación en varios países es el locus D1S80. Este VNTR es muy discriminativo y adecuado para la caracterización genética de cada individuo.

En el presente trabajo se obtuvo las frecuencias alélicas y genotípicas para el locus D1S80 en una muestra de la zona metropolitana de la Ciudad de México, utilizando diferentes protocolos de extracción del ADN específicos para cada tipo de muestra, después el ADN del locus D1S80 fue amplificado por medio de

la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y analizado por electroforesis en gel vertical de poliacrilamida de alta resolución (PAGE), seguido por una tinción con bromuro de etidio, procedimiento llamado polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado (AMP-FLP).

En 116 individuos no relacionados de nuestra población se observaron 18 alelos y 48 genotipos. El locus D1S80 demostró una heterocigocidad del 0.78 y el poder de discriminación fue de 0.96.

La distribución de las frecuencias genotípicas observadas cumplen las expectativas conforme al equilibrio Hardy-Weinberg.

INTRODUCCION.

El problema de la identificación es tan antiguo, como el origen de la sociedad; el hombre para identificarse socialmente tuvo la necesidad de un nombre, éste es completamente mutable, ya que puede cambiarse en un momento dado, siendo esto muy frecuente en aquellas personas que constantemente se encuentran al margen de la ley.(1)

En el campo de la administración y procuración de justicia la peligrosidad de los reincidentes creó la necesidad de reconocerlos; es decir identificarlos. Por otra parte sabedores éstos de que eran acreedores de la imposición de penas mayores por la concurrencias de las circunstancias, procuraban por todos los medios de ocultar su verdadera identidad, entablándose de esta manera una lucha de inteligencias entre el delincuente por un lado y los representantes de la ley por el otro.(1).

En todos los tiempos el científico forense ha experimentado la necesidad de contar con procedimientos confiables que le permitan identificar al delincuente con absoluta confianza. Ahora bien, éstos han variado a través del tiempo, siendo clasificados en la antigüedad de naturaleza "bárbara" (marcas, mutilaciones); en la Edad Media "superficiales"; en los siglos XVIII y XIX "empírica" que se distingue fundamentalmente en la descripción de los signos fisonómicos y particularidades que ofrece el ser humano (corpulencia, color de los ojos, pelo) y a finales del siglo pasado y principios del siglo XX, "científica" en donde los sistemas antropométrico, de retrato hablado y dactiloscópico jugaron un importante papel.(1).

Las huellas digitales son el ejemplo de identificación más utilizado y más difundido hasta hoy. (1,2,3). Sin embargo, las circunstancias bajo las cuales las huellas digitales se encuentran y se recobran en buenas condiciones es limitada, ocupando las evidencias biológicas un sobresaliente papel en la identificación del responsable de un presunto hecho delictuoso.(2,4,5,6,7).

Al igual que las huellas digitales son marcadores específicos y únicos en un individuo, la secuencia de la sustancia llamada ácido desoxirribonucleico (ADN) determina a nivel molecular la individualidad de cada persona.(4,5,6,7). La tipificación del ADN se ha convertido en una herramienta muy útil ya que su análisis es mucho más extenso y aplicable sobre todo en las muestras de naturaleza biológica. (4,5,6,7).

Con excepción de los gemelos idénticos, los seres humanos no tienen la misma secuencia de ADN. De los 3, 000 millones de nucleótidos que heredamos de cada uno de nuestros padres, aproximadamente 1 en 1, 000 nucleótidos es un sitio de variación o polimorfismo.(8).

Actualmente la aplicación de la tecnología de la tipificación del ADN que en conjunto se llaman "DNA Fingerprinting" (huellas digitales del ADN) a investigaciones criminales, es el progreso más significativo del siglo. (5,7). Cuando se utiliza adecuadamente, tiene el potencial para identificar rápidamente al responsable y claramente determina a personas inocentes quienes habían sido consideradas como sospechosos en un delito (10). Ahora bien, su aplicación no solamente abarca el área forense, sino también otras áreas de investigación como medicina, antropología y legal por mencionar algunas.

Dos principios, el de la individualidad genética y que todas las células nucleadas de un mismo individuo poseen la misma información genética, son la base para los estudios de tipificación del ADN.(4,5,6,7).

La prioridad de esta tecnología es la de encontrar pequeños fragmentos del ADN que difieran de un individuo a otro de manera que pueda ser determinado rápidamente con una alta reproducibilidad, y costo mínimo por técnicas simples.(2). Una forma de tipificar el ADN que recientemente se ha expandido, es la utilización de unidades repetitivas en tándem (VNTR). El número de repeticiones en tándem son fragmentos de ADN en los cuales una secuencia corta de nucleótidos se encuentran repetidas de 20 a 100 veces. Los "alelos" VNTR están compuestos de un número diferente de repeticiones.(5,8,11,12,13,14).

Al combinar varios VNTR de distintos lugares del genoma, un individuo puede ser caracterizado en término de sus genotipos en loci VNTR. (2,4,5, 6,7,15).

La aplicación de esta tecnología en problemas de identificación forense ha sido utilizada cada vez más en Estados Unidos e Inglaterra, sin embargo en nuestro país esta tecnología se ha adoptado recientemente, por lo cual no hay suficientes estudios sobre la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en estos loci VNTR en nuestra población, por lo tanto se desconoce la probabilidad de que dos individuos en nuestra población tomados al azar, tengan la misma caracterización genética. Este es el principal problema en casos legales y su resolución requiere la aplicación de este tipo de estudios.

SISTEMA JURISDICCIONAL

La investigación de un probable hecho delictuoso (homicidio, suicidio, violación, robo, etc.) es una de las actividades que realiza el **Órgano Jurisdiccional** (Ministerio Público, Policía Judicial y autoridades jurisdiccionales) con la finalidad de proporcionar una adecuada administración y procuración de justicia, para ésto requiere el apoyo de tres disciplinas científicas que son:

La criminalística, que se encarga del análisis de los indicios, denominados así a todo objeto, huella o elemento íntimamente relacionado con un presunto hecho delictuoso, cuyo estudio permite reconstruirlo, identificar a su(s) autor(es) y establecer su participación.(16,17).

La policilogía, que incluye técnicas, métodos y conocimientos aplicados en la localización, persecución y detención de los presuntos responsables del hecho delictuoso.(16,17).

La criminología que se encarga del estudio del delito como conducta humana y social, de investigar las causas de la delincuencia, de la prevención del delito y del tratamiento del delincuente.(16).

La criminalística con sus disciplinas científicas (balística, hematología, dactiloscopia, genética, química) auxilia al órgano jurisdiccional a efecto de darles elementos probatorios identificadores y reconstructores a través de los resultados de la aplicación científica de sus conocimientos, metodología, tecnología emitidos en los dictámenes periciales, ampliaciones de dictámenes, intervención de peritos terciarios en discordia y otras aplicaciones.(16).

Los encargados del cumplimiento de la ley recurren cada vez más a los resultados del laboratorio para conseguir información que por otro medios es imposible de obtener. Al examinar el indicio se trata de obtener información útil y científicamente veraz para ilustrar al juzgador, con el fin de que éste llegue a la verdad histórica de los hechos.(16,17).

La ley reconoce como medios de prueba;

I. La confesión judicial

II. Los documentos públicos y privados

III. Los dictámenes de peritos

IV. La inspección judicial

V. La declaración de testigos, y

VI. Las presunciones. (Art. 135 del Código de procedimientos penales (CPP))

Las presunciones o indicios son las circunstancias o antecedentes que, teniendo relación con el delito, pueden razonablemente fundar una opinión sobre la existencia de los hechos determinados. (Art 245. Código de procedimientos penales).

Uno de los principios básicos de la criminalística emitido por E. Locard (1877-1966), estableció que existe un intercambio dinámico entre la víctima, victimario y lugar de hechos. Esto es, que no existe crimen perfecto, y por lo tanto el criminal, por muy inteligente que sea siempre deja en el lugar del delito algo, que de algún modo revela su presencia allí, identificar ese "algo" es el objetivo de la criminalística.(16,17,18).

En la investigación pericial de un indicio se recorren tres grandes etapas:

1.- Búsqueda en el lugar de los hechos y la identificación de los indicios (ubicación y presentación morfológica).

2.- Recolección, levantamiento, protección, y embalaje para un adecuado transporte al laboratorio.

3.- Los exámenes analíticos y su interpretación.(16,17,18)

Cuando se habla de búsqueda e identificación criminal de inmediato se piensa en las huellas dactilares, que son las más populares y conocidas por todo el mundo.(3).

En efecto desde hace más de 40 años, la identificación por huellas dactilares, ha sido un factor determinante en las investigaciones, sin embargo conviene notar que este indicio representa sólo el 15%, siendo los indicios de naturaleza biológica, los que con mayor frecuencia se encuentran en la escena del delito.(3).

Las muestras biológicas son elementos clave en la investigación de muchas clases de presuntos hechos delictuosos. En casos de violación, el (los) violador(es) pueden dejar semen ya sea en la víctima o en su ropa. En casos de homicidio, la sangre de la víctima puede ser encontrada en la ropa del sospechoso etc.(2,4,5, 6,7,16).

Una vez que la evidencia biológica ha sido suministrada al laboratorio se aplica la siguiente metodología de rutina:

- (a) Examen visual (manchas)
- (b) Pruebas presuntivas
- (c) Pruebas confirmatorias
- (d) Pruebas de individualización.(17,19,20).

Las tres primeras etapas (a,b,c) permiten una clasificación previa de la evidencia antes de llevar a cabo una clasificación más detallada (d).(17,19,20).

Cada una de estas etapas permite colocar a la evidencia dentro de un grupo más restringido, lo cual va generando información sobre las características propias y que la hacen diferente a las demás, lo que más tarde conduce a la identidad única y específica de la evidencia, este procedimiento se denomina individualización.(17,19,20).

De la misma manera que las características físicas de una persona por ejemplo peso, altura color de ojos etc., integran la apariencia individual, los marcadores genéticos reúnen esta individualidad.(2,4,5,6,7,15,21).

La meta del científico forense es determinar a través del análisis genético, si el indicio biológico pertenece a un individuo particular, ya sea de la víctima o del sospechoso. Si un marcador genético obtenido del indicio no tiene semejanza con el de la muestra del sospechoso, entonces éste puede ser excluido con absoluta certeza. Por otro lado, si el tipo del marcador genético del individuo concuerda con todos aquellos obtenidos del indicio, entonces un origen común entre ellas es posible.(6,10,15).

Sin embargo lo mismo que el tamaño de los ojos o una cresta en una huella digital no llegan a la identificación positiva de un individuo, un marcador no reúne esta individualidad, por lo tanto es necesario obtener varios marcadores genéticos para lograr este fin.(19,21).

Una tipificación genética concordante no constituye una identificación, ya que una parte de la población general puede mostrar los mismos tipos de

marcadores genéticos. Entre mayor sea la población que se excluya, mayor es el valor de la evidencia. (2,7,15).

Los resultados de las pruebas de tipificación junto con la apropiada interpretación estadística se presentan al juez para que éste pueda rendir su veredicto (6).

CRITERIOS PARA LA SELECCION DE UN POSIBLE MARCADOR GENETICO CON PROPOSITOS DE IDENTIFICACION.

Cada individuo puede distinguirse por el perfil de sus marcadores genéticos. Mientras más marcadores se comparen, mayor es la probabilidad de encontrar diferencias entre la población. (7,15).

Se ha estimado que existen más de 1 500 locus polimórficos en el genoma humano, de los cuales sólo se han caracterizado 200. (2,4). Sin embargo, no todos los marcadores genéticos son convenientes para la aplicaciones forenses y deberán ser cuidadosamente seleccionados. Los criterios por los cuales los marcadores genéticos son evaluados para uso forense son los siguientes: (5,6).

Método de análisis

- ★ Fiable, rápido, simple.
- ★ Detección sin ambigüedad.
- ★ Determinación de diferencias cualitativas.
- ★ Consumo de pequeñas cantidades de material.

Naturaleza del marcador

- ★ Heredado independientemente de otros marcadores.
- ★ Polimórfico (varios alelos).
- ★ Alto grado de heterocigocidad.
- ★ Datos de frecuencia de la población.

Los marcadores genéticos que pueden ser útiles en el área forense deben ser muy polimórficos, tener una frecuencia alélica y genotípica muy baja y

tener un gran poder de discriminación (PD) o capacidad de distinguir dos individuos. Entre más alelos tenga un marcador genético (mayor polimorfismo) y entre más uniforme sea su distribución entre la población (mayor heterocigocidad), mayor es su poder de discriminación. (5,8).

Los criterios relacionados con la naturaleza de un marcador genético útil están basados en la información que puede ser obtenida de estudios de genética y análisis estadísticos de las frecuencias del gen (alelos). (5).

Una simple ley matemática para estudiar el comportamiento de los genes en una población fue formulada independientemente por el matemático G.H. Hardy y el físico W. Weinberg en 1908. La ley llamada Hardy-Weinberg describe un estado de equilibrio para la conservación de frecuencias de genes seleccionados dentro de un conjunto de genes. Esta ley responde la pregunta básica de por qué las frecuencias de las características dominantes no se incrementan continuamente sobre las recesivas. Esto se basa en la suposición de que existe igual variabilidad entre los genotipos en el conjunto de genes. (5,6,19,22,23).

Una manera para evaluar a los marcadores genéticos es la capacidad para distinguir entre individuos; esto es, su poder de discriminación. Si las frecuencias de los genotipos de los marcadores en una población definida son conocidos, entonces la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar de esa población que posean el mismo genotipo (P_i) puede ser calculada, si además la población esta en equilibrio Hardy-Weinberg para este marcador, entonces las frecuencias genotípicas esperadas pueden ser calculadas de las frecuencias alélicas observadas. El valor indicador, conocido como el poder de discriminación (PD), es igual a $1-P_i$, y es la probabilidad de que dos individuos al azar puedan poseer diferentes tipos genéticos para el marcador que ha sido probado. Un valor alto de PD indica un potencial de individualización grande a

causa de que una gran porción de la población puede ser excluida. El poder de discriminación aumenta, conforme aumenta la heterocigocidad (distribución de los alelos) y el polimorfismo (varios alelos). (5,6).

Los datos de las frecuencias alélicas han permitido a los científicos seleccionar los marcadores apropiados para propósitos de identificación y exclusión de paternidad, así mismo permiten calcular la probabilidad de encontrar a dos individuos con el mismo perfil genético. (5,6,19,22).

La probabilidad de encontrar una combinación de dos alelos (genotipo) en un individuo involucre la multiplicación de las frecuencias alélicas observadas, aquí la ley de Hardy-Weinberg es utilizada:

$$\text{genotipo homocigoto} = (\text{frecuencia del alelo A})^2$$

$$\text{genotipo heterocigoto} = 2 \times (\text{frecuencia de A})(\text{frecuencia de B}).$$

Esto asume que la frecuencia de los alelos son independientes en la población. (5,6,15,19,24).

Los eventos independientes pueden ser definidos como aquellos eventos en los cuales la presencia o ausencia de un evento no tiene efecto sobre otro. Si dos eventos son independientes la probabilidad de que ambos se presenten es el producto de la frecuencia de cada evento. (19).

La independencia estadística dentro de un locus es referida como el equilibrio Hardy Weinberg (HW) mientras que la independencia estadística a través de loci cercanos es llamada Equilibrio de Enlace (LE). (24).

El objetivo real de los cálculos es estimar que tan probable es que un perfil de ADN pueda ser encontrado en una población. El encontrar a dos individuos al azar con la misma combinación de genotipos o perfil genético después del análisis de varios loci polimórficos, puede ser calculado al multiplicar la frecuencia de cada uno de los genotipos en cada locus, esta etapa asume el equilibrio de enlace (LE). (5,15,24).

El poder de discriminación para combinaciones de los sistemas de marcadores es igual a $1 - (\text{el valor del producto de } P_i \text{ para cada sistema de marcadores})$. Como se adiciona más valor de marcador, el valor acumulativo de PD se aproxima a la unidad. Los marcadores deberán heredarse independientemente (presentes sobre cromosomas separados para que este PD sea válido). (6). Si los datos experimentales u observados difieren significativamente de los resultados esperados quizás existan ciertos factores que influyan en la distribución del genotipo. Este tipo de información es útil para señalar posibles marcadores genéticos en una población y las técnicas a utilizar para su detección. (8).

Las frecuencias genotípicas para un marcador particular puede variar de población a población. Por lo tanto es importante recolectar los datos de las frecuencias alélicas de poblaciones reproductivas para que pueda realizarse una apropiada evaluación estadística de los resultados de la tipificación. (5,6,15).

MARCADORES TRADICIONALES APLICADOS EN EL AREA FORENSE.

Por más de dos décadas las metodologías tradicionales para establecer la identidad a través del análisis de las muestras biológicas por los científicos forenses, involucraron la separaciones de proteínas y/o identificación de los grupos sanguíneos, basándose en la detección de polimorfismos (variaciones bioquímicas) en los productos del gen (proteínas, enzimas), lo que se traduce en cambios a nivel de la secuencia de aminoácidos, afectando la carga total de la proteína y por consiguiente su movilidad electroforética, mientras otros cambios alteran al determinante antigénico y que afectan las interacciones anticuerpo-proteína. (5,6).

Uno de los primeros intentos para resolver problemas con propósitos de identificación fue realizado en 1901 cuando Karl Lansteiner, biólogo austriaco, clasificó a la sangre en base a reacciones inmunológicas y dependiendo del antígeno en cuestión en cuatro grupos sanguíneos A, B, AB y O. (5,6).

El período entre 1931 a 1965 mostró el descubrimiento y expansión de información concerniente a los sistemas de grupo sanguíneos Rh, MN, Kell, Duffy, Kidd, estos marcadores son raramente utilizados en el análisis forense debido a que exhiben una inestabilidad en las manchas sanguíneas y no se encuentran en el semen, saliva u otras evidencias biológicas. (6).

Investigaciones en el período entre 1950-1975 dieron como resultado la introducción de análisis vía separaciones electroforéticas. Existe una gran variedad de técnicas electroforéticas (utilizando agarosa, poliacrilamida, acetato de celulosa entre otras), las cuales pueden ser aplicadas para distinguir las variedades de isoenzimas y proteínas de suero. (6).

Durante los años de 1970, las herramientas de tipificación genética se expandieron para incluir la detección electroforética de marcadores protéicos. (6).

Desafortunadamente, pocos marcadores proteicos están presentes en otras clases de evidencias biológicas tales como semen. Sin embargo aún con estos avances en la metodología y técnicas, el problema de identificación no podía ser completamente resuelto debido a varias dificultades que se presentaban durante el análisis de las evidencias sobre todo cuando se trata de manchas, ya sean de semen o bien de sangre. (5).

Estas dificultades son consecuencia principalmente a que los indicios recolectados del lugar de los hechos, frecuentemente se ven expuestos a cambios ambientales (temperatura, pH, contaminación con el sustrato, luz solar, humedad), lo que conduce a la modificación de las estructuras moleculares, además, el intercambio de sustancias biológicas durante actos delictivos involucra sólo trazas de estas muestras; es decir el indicio es pobre tanto en calidad como en cantidad. (7,15,25).

Cuando la evidencia es de buena calidad es necesario tomar en consideración cuáles y cuántos marcadores son posibles de analizar con el fin de obtener la máxima información y sobre todo que sea de utilidad, pues en ocasiones se lleva a cabo la tipificación de varios marcadores que no proveen información adecuada para poder incluirla o excluirla como perteneciente a la víctima o al victimario.

En general este tipo de marcadores poseen un poder de discriminación bajo, por lo que es necesario utilizar un número mayor de éstos para incrementar el poder de discriminación de la muestra biológica y por consiguiente mayor cantidad de muestra. (5,25).

Durante mucho tiempo se estudió al gen de manera indirecta; es decir estudiando sus productos. Actualmente se sabe que más del 90% de ADN no codifica para la síntesis de proteínas y por lo tanto este tipo de polimorfismos no se pueden determinar. (5,6).

La biología forense entró en la era del ADN en la mitad de 1980. Tres grupos de investigadores independientemente demostraron que el ADN podía ser extraído de todos los tipos de indicios biológicos, un ejemplo importante es en los casos de violación en donde las muestras que se toman a la víctima generalmente son una mezcla de células epiteliales y de células espermáticas, a través de estas técnicas el ADN de las células espermáticas del violador es separado por digestión diferencial (en base a su estructura morfológica de la membrana celular) del ADN de las células epiteliales de la víctima, este proceso diferencial no es aplicable en el caso de grupo sanguíneo y/o marcadores protéicos. (5,6,25).

En 1985, el profesor Alec Jeffreys de la Universidad de Leicester, estudiaba el gen de la mioglobina, la proteína que almacena oxígeno en el músculo, y observó una secuencia de 33 pares de bases (pb) repetidas 4 veces en tándem, en el intrón. Esta secuencia fue llamada minisatélite. (5).

Jeffreys purificó el minisatélite y ligó a su cabeza y cola varias veces. El resultado fue un polímero y posteriormente fue clonado dentro del plásmido PUC y se utilizó como sonda. Se obtuvieron numerosas clonas conteniendo la secuencia de ADN humano homólogo, de esas, 8 fueron elegidas al azar y secuenciadas. Todas diferían en la secuencia de bases, número de unidades repetidas y consecuentemente en longitud. Sin embargo en un análisis más cuidadoso de las secuencias se observó un fragmento "común" de 10 a 16 pb. Cuando una sonda de 26 repeticiones de la secuencia "común" fue clonada y utilizando Southern blotting e hibridización de ADN humano digerido con la enzima Hinf I, encontró que este minisatélite de mioglobina detectó muchos otros satélites humanos, todos de diferente longitud. Cada patrón de hibridización individual, fue diferente a los otros. Este patrón parecido a un código de barras fue llamado "huellas digitales del ADN". (5).

ANTECEDENTES HISTORICOS SOBRE EL ADN.

Actualmente queda claro que el ADN es el portador de la información genética, sin embargo este hecho se derivó de investigaciones que ayudaron a dilucidar su estructura y función biológica entre las que destacan las realizadas por: un modesto fraile agustino llamado Gregorio Johann Mendel, quien en 1865, realizó una investigación sobre los mecanismos de la transmisión hereditaria. El primer paso en su investigación fue seleccionar la planta adecuada y se decidió por el chícharo o arveja de jardín, posteriormente obtuvo plantas de línea pura para una característica, por ejemplo color de las flores; lo que logró a través de una serie repetida de siembras reconociendo 7 pares de características reconocibles con facilidad. (26,27). Las dos características distintivas de cada una de estas 7 se muestran en la siguiente cuadro.

CARACTER	VARIEDADES
1.- Color de la semilla	amarilla, verde.
2.- Forma de la semilla	redonda, arrugada.
3.- Forma de la vaina	lisa, arrugada.
4.- Posición de la flor	axial, terminal.
5.- Longitud del tallo	largo, corto.
6.- Color de la vaina	amarilla, verde
7.- Color de la cubierta de la semilla	coloreada, blanca

Cuadro No 1. Tipos de chícharos utilizados por Mendel en sus estudios de entrecruzamientos. Modificado de Karp, 1987.

Cuando estuvo completamente seguro de que las semillas contenían el factor (que posteriormente recibiría el nombre de gen) para originar flores rojas, las clasificó como línea pura (**homocigoto**) y siguió el mismo procedimiento para obtener líneas puras de flores blancas o semillas lisas, por ejemplo. Mendel consideró la existencia de dos factores (uno materno y el otro paterno) para un

carácter. Cada progenitor sólo hereda un factor (gen) a su descendiente. Al unirse el factor de un progenitor con el del otro progenitor, el descendiente tendrá dos factores al igual que sus progenitores. Para comprobar lo anterior, cortó los estambres (granos de polen que encierran a los gametos masculinos) y dejó únicamente el pistilo (estructura donde se forman los gametos femeninos) tanto de las flores rojas como de las blancas, y realizó una polinización cruzada, es decir, en el pistilo de las flores blancas depositó granos de polen de las flores rojas y viceversa. Todas las plantas de este primer cultivo presentaron flores rojas y supuso que el factor para las flores blancas había quedado escondido (factor recesivo). A esta primera generación filial la clasificó como híbrida (heterocigota), posteriormente estas plantas híbridas se autofecundaron y de aquí se desprende el enunciado de la Primera Ley o Ley de la Segregación de Caracteres. (27):

"De la cruce de dos líneas puras, una dominante y otra recesiva, se originará una línea híbrida".

"De la cruce de los híbridos se originarán una cuarta parte de línea pura dominante, dos cuartas partes de híbridos y una cuarta parte de línea pura recesiva."

Esta ley encierra tres conceptos:

- a) Los caracteres heredados se controlan por genes, los cuales se presentan siempre en pares.
- b) Uno de los genes puede evitar que el otro se manifieste (dominancia y recesividad)
- c) Los genes que forman un par, se separan al formarse los gametos. Un progenitor sólo hereda uno de los genes al descendiente (segregación).

(23,26,27).

En el siguiente experimento planeó la cruce de plantas de línea pura para dos características dominantes, con plantas de línea pura para dos características recesivas, y al igual que en la cruce donde sólo había tomado en cuenta una característica, las plantas de la primera generación presentaron solamente características dominantes, flores rojas y tallos largos, las flores blancas y los tallos cortos no se manifestaron, comprobando nuevamente la dominancia y recesividad. (27).

Enunciado de la Segunda Ley o Ley de la Herencia Independiente. (27). "La herencia de un carácter es independiente de la herencia de otro carácter". Cuando la herencia es independiente se debe a que los genes que producen esas características se localizan en pares cromosómicos distintos, es decir en cromosomas no homólogos. (23,26,27).

En 1865, con el título "hibridación en las plantas", se publicó el trabajo de la investigación de Mendel en el periódico de la Sociedad de Historia Natural de Büm. Los científicos de aquel entonces que tuvieron a su alcance esta publicación no la comprendieron. Fue 35 años más tarde cuando otros científicos valoraron la importancia de esta investigación; para entonces, ya se conocía que todos los seres vivos estamos formados por células y que en ellos se encuentran siempre unas estructuras denominadas cromosomas. (27).

Los análisis químicos mostraron que los cromosomas están formados por proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN); esta última sustancia fue descubierta por Friedrich Miescher en 1868. (26,27,28,29,30,31).

En 1902 Walter Sutton logró aplicar la primera y segunda ley de Mendel al comportamiento de los cromosomas durante la meiosis y llegó a la conclusión que las estructuras celulares responsables de la herencia eran los cromosomas. (26,27,28,29,30,31).

A principios de 1914, Robert Fulgen inventó una técnica de tinción del ADN. Gracias a esta nueva técnica logró visualizarse el material contenido en el núcleo y medir de manera aproximada la cantidad de ADN presente, dependiendo de la intensidad del color. Esto llevó al descubrimiento que todos los núcleos de las células de un mismo individuo tienen la misma cantidad de ADN, a excepción de los gametos (óvulo y espermatozoides), cuya coloración era la mitad de la intensidad más alta. A pesar de esto, durante estos años no fue posible establecer con exactitud cual era el material genético. Se sabía de la existencia de los ácidos nucleicos y de las proteínas. (23,26,27,28).

En 1928, el bacteriólogo inglés Fred Griffith experimentó con la bacteria causante de la neumonía, enfermedad peligrosa y muy difundida antes del descubrimiento de los antibióticos. Una de estas características sobresalientes de estas bacteria consiste en que están rodeadas por una cápsula de polisacáridos. Cuando se cultivan en medios de laboratorio durante tiempo prolongado pierden su cápsula y con ella su virulencia, esto es, se vuelven inofensivas. Lo interesante del experimento es que Griffith descubrió que las bacterias vivas no virulentas podían serlo nuevamente si se mezclaban con bacterias muertas virulentas. No obstante, debía saberse cuál era la sustancia que pasaba de unas bacterias a otras y las transformaba. (Fig No.1). (23,26,28,31).

En 1933 las investigaciones de Thomas Hunt Morgan, probaron la teoría propuesta por Sutton "los genes antes llamados factores mendelianos, se localizan en los cromosomas", por lo que quedó establecida la teoría cromosómica de la herencia. (23,26,27,28,29).

La ciencia dio pasos gigantados hacia el descubrimiento del componente químico responsable de la herencia. En la década de los cuarenta, Oswald T. Avery, Colin MacLeod y Maclyn McCarty, investigadores del Instituto Rockefeller de Nueva York, encontraron la respuesta. Su experimento consistió

en separar en forma cuidadosa todos los componentes químicos de las bacterias virulentas causantes de neumonía y probar uno a uno su efecto transformador en bacterias no virulentas; la sustancia que provocó la transformación fue la marcada con el número 44 y correspondió al ácido desoxirribonucleico. Este descubrimiento no convenció totalmente a la comunidad científica. (23,26,27,28,29).

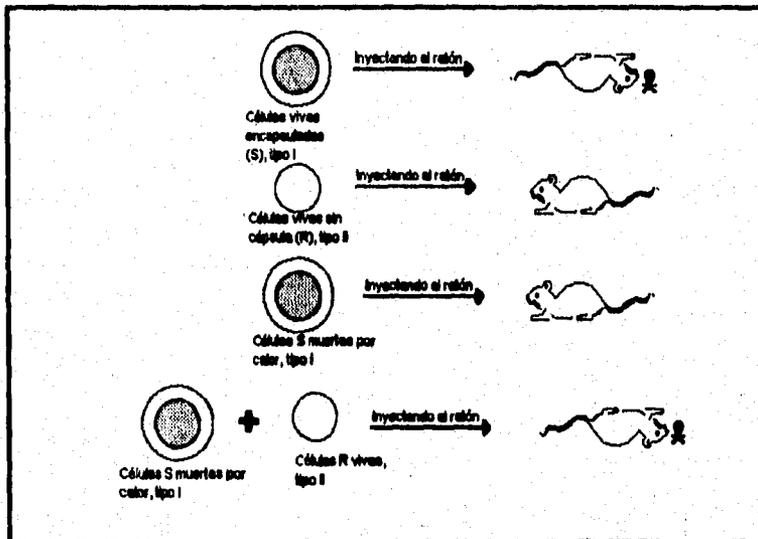


Fig. No. 1. Los experimentos de Griffith contribuyeron a sustentar la idea de que el ADN era el material genético. En su experimento, Griffith trabajó con dos cepas de *pneumococcus* (agente causante de la neumonía). La cepa lisa (S) era virulenta mientras que la cepa rugosa (R) era inocua. Griffith intuyó que alguna sustancia o factor de los neumococos lisos muertos por el calor podía transferirse a la cepa rugosa, transformándola en virulenta. Modificado de Karp, 1987.

Ya para 1950 se sabía que los ácidos nucleicos estaban formados por monómeros de fosfatos, azúcares y bases nitrogenadas, pero Erwin Chargaff

demostró que según el organismo, el ADN tenía diferentes proporciones de las bases nitrogenadas y determinó que el número de adeninas es igual al número de timinas, y la cantidad de guanina es igual a la cantidad de citosina de donde estableció las siguientes reglas de composición $(A)=(T)$, $(C)=(G)$ $(A+T) \neq (C+G)$ (23,26,27,28,29).

Fue necesario que pasaran 8 años (1952), para que un experimento realizado por Alfred Hershey y Martha Chase confirmara la proposición de que el ADN era el material de la herencia. Hershey y Chase supusieron que el material genético debería poseer dos propiedades: primero pasar al interior de la célula infectada y ser capaz de dirigir los fenómenos durante la infección; y segundo, pasar a la siguiente generación. Marcaron la envoltura protéica del virus con azufre radiactivo y el rollo de ADN con fósforo radiactivo. Como el azufre sólo está presente en la proteína y no en el ADN, en tanto que en el caso del fósforo ocurre a la inversa, puede seguirse la pista de cada una de estas partes marcadas por su camino de invasión. Con el microscopio electrónico se pudo observar durante la infección, el grueso del volumen del fago permanece fuera de la célula unido a la superficie celular con la cola. (Fig No. 2). Al usar bacteriófagos con ADN marcado con ^{32}P o con proteína marcada con ^{35}S , se pudo determinar el porcentaje de cada tipo de radiactividad que en realidad entra en la célula infectada o queda unida por fuera de la cubierta viral y se encontró que cuando se usan fagos marcados para la proteína, el grueso de la radiactividad permanece en la célula, y que por el contrario, cuando los que se emplean son fagos marcados en el ADN, el grueso de la radiactividad pasa al interior de la célula huésped. Cuando se verificó la radiactividad que pasaba a la siguiente generación se encontró que se podía detectar menos del 1% de la proteína marcada en la progenie, mientras que aproximadamente el

30% del ADN marcado se podía encontrar en la siguiente generación. (23,26,27,28,29).

Con la ayuda de la cristalografía de rayos X se pudo dilucidar la estructura del ADN en 1953. Fue así como Maurice Wilkins y Rosalind Franklin obtuvieron fotografías del ADN y ciertas medidas intramoleculares (es decir las medidas que separaban a los constituyentes del ADN) cuyo significado desconocían, pero que aparecían con regularidad: 2.0 nanómetros (nm), 0.34 nm y 3.4 nm. (23,26,27,28,29).

Fue así como James D. Watson y Francis Crick intervinieron sobre la dilucidación de la estructura del ADN e hicieron varios modelos para probar diferentes disposiciones de los elementos que constituyen al ADN, hasta que uno de éstos resultó apegarse con mayor exactitud a los datos de Chargaff y de Wilkins-Franklin. El ADN parecía ser una doble cadena, enrollada sobre sí misma, con un esqueleto de fosfato-azúcar (los pilares), con las bases nitrogenadas (uniendo los pilares) orientadas hacia el interior. En este modelo el ancho total de la doble hélice era de 2.0 nm, el grosor de las bases nucleotídicas era de 0.34 nm., y dado que la doble cadena gira sobre sí misma enrollándose, la escalera de caracol daría una vuelta completa cada 3.4 nm, esto es, cada 10 pares de bases. (Fig. No. 3). (23,26,27,28,29.).

Desde los tiempos en que los biólogos empezaron a considerar la naturaleza de las sustancias genéticas, se determinaron tres funciones principales que deberían satisfacerse: el almacén de información heredable, el mecanismo para la autoduplicación y la capacidad para dirigir las funciones de una célula. El modelo de Watson-Crick para la estructura del ADN fue de importancia vital a fin de demostrar la forma por medio de la cual dos de estas funciones genéticas llegan a cumplirse. (23,26,27,28,29.).

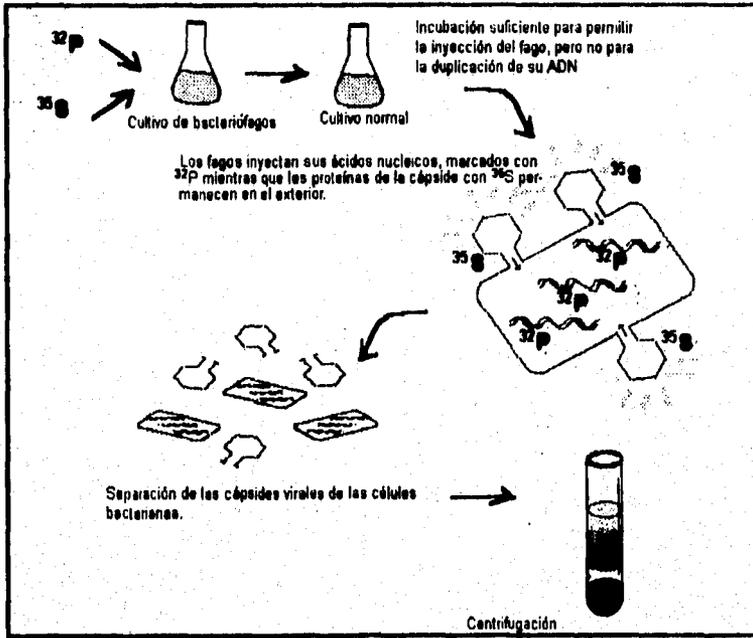
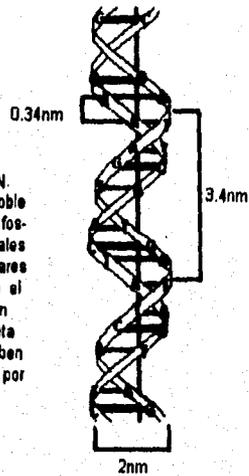


Fig. No 2. Hershey y Chase marcaron fagos radiactivamente. La cápside con azufre y el ADN con fósforo radiactivo. Posteriormente infectaron una colonia de bacterias, pero sin dar tiempo para la duplicación del ADN. Separaron la cápside vacía del fago y encontraron que únicamente el fósforo radiactivo (^{32}P) había penetrado en la célula. Modificado de Barahona, 1994.

Figura No. 3. Estructura del ADN. Representación esquemática de la doble hélice del ADN. Las dos cadenas de fosfato-azúcar y los bastones horizontales representan los enlaces entre los pares de las bases. La línea vertical indica el eje de la fibra. La doble hélice tiene un diámetro de 2 nm, una vuelta completa mide 3.4 nm de longitud y en ella caben diez pares de nucleótidos separados por una distancia de 0.34 nm.



Modificado de Karp, 1987.

Watson y Crick propusieron que las dos cadenas de la doble hélice eran en efecto un par de moldes disponibles para usarse en la duplicación. Cada cadena tendría la información para la secuencia complementaria. Se asigna a una banda el signo (+) con el fin de diferenciarla de la otra, a la cual se le asignaría el signo (-), si las dos cadenas deben separarse, la banda (+) puede servir como molde por el cual la polimerización de una banda (-) se puede llevar a cabo y viceversa. (23,26,27,28,29).

Meselson y Stahl idearon el 1958 un experimento refinado, empleando bacterias cultivadas en un medio alimenticio enriquecido con nitrógeno pesado ^{15}N y consiguieron obtener una población de bacterias cuyo ADN estaba marcado en sus dos bandas, con ^{15}N . Entonces, estas bacterias marcadas fueron sometidas

a un régimen que contenía nitrógeno ordinario, ^{14}N y se les permitió reproducirse durante dos generaciones sucesivas. Después de la primera división se analizó el ADN el cual contenía partes iguales de ^{15}N y ^{14}N . Después de la segunda división aparecieron dos clases de ADN observando que el primero contenía dos hebras con ^{14}N , en tanto que el segundo contenía una hebra con ^{14}N y la otra con ^{15}N .

Estos hallazgos están en completo acuerdo con la explicación de Watson y Crick de la duplicación del ADN. En la primera división se separaron las dos tiras, con ^{15}N cada una, y cada una sirvió, por así decirlo, de molde para la organización de la otra tira a partir del alimento con ^{14}N circundante. Así cada célula hija obtuvo moléculas de ADN con una tira de ^{15}N y la otra con ^{14}N . Precisamente antes de la siguiente división celular se separaron las tiras con ^{14}N y ^{15}N y cada una organizó a su lado una tira con ^{14}N . Al dividirse cada célula, a una de las células hijas le tocó el ADN de la molécula $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ y a la otra ADN de molécula $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$. (Fig No. 4). (29).

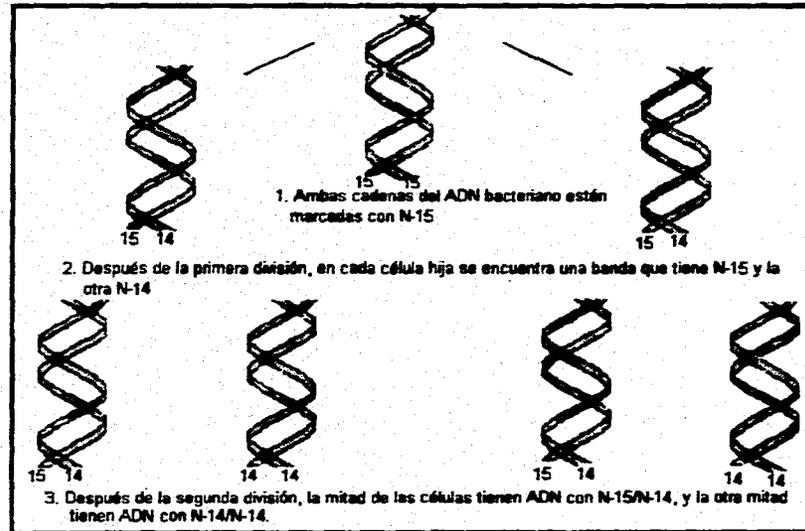
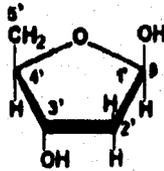


Fig No. 4. Duplicación semiconservativa del ADN. Modificado de Frankel, 1966.

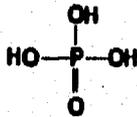
ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ADN.

La unidad estructural básica del ADN es el nucleótido, el cual contiene tres componentes característicos:

a) Un azúcar de cinco átomos de carbono (desoxirribosa).



b) Un grupo fosfato en la posición 5' del azúcar.



c) Una base nitrogenada que está unida al sitio 1' del azúcar. Las bases son de dos clases, las pequeñas pirimidinas (timina y citosina) y las grandes (adenina y guanina). (5,7,25,26,28,30,31). Fig No. 5.

La unión química entre el azúcar y el grupo fosfato se conoce como enlace 3'5' fosfodiéster. El ADN está formado por 4 tipos de nucleótidos puesto que tiene 4 bases nitrogenadas diferentes (5,26,28,30). Fig. No. 6.

Una cadena de nucleótidos forma un polinucleótido. La molécula de ADN es un largo polímero no ramificado y se compone de dos cadenas de nucleótidos.

Las dos cadenas forman un par de hélices de rotación derecha que se enrollan alrededor del mismo eje. (5,26,28,30).

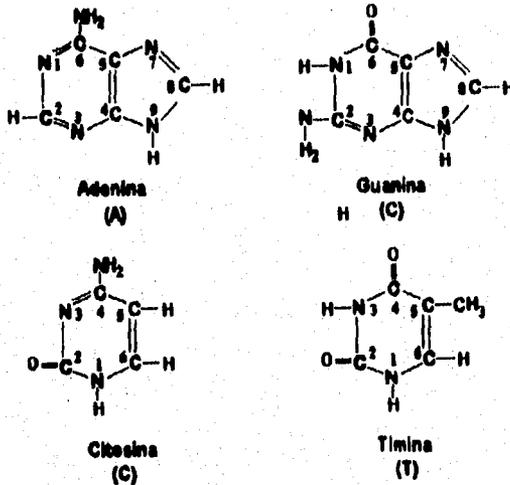


Fig. No.5. Las cuatro bases nitrogenadas del ADN. La adenina y la guanina son purinas, la citosina y la timina son las pirimidinas. Modificado de Karp, 1987.

El esqueleto de azúcar-fosfato-azúcar-fosfato se localiza en el exterior de la molécula con las bases proyectándose hacia el centro. (5,26,28,30).

Las dos cadenas se mantienen juntas por enlaces de hidrógeno que están presentes entre cada base de una cadena con una base asociada a la otra.

Las bases ocupan planos que son aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la molécula y, por lo tanto, están superpuestos. (5,26,28,30).

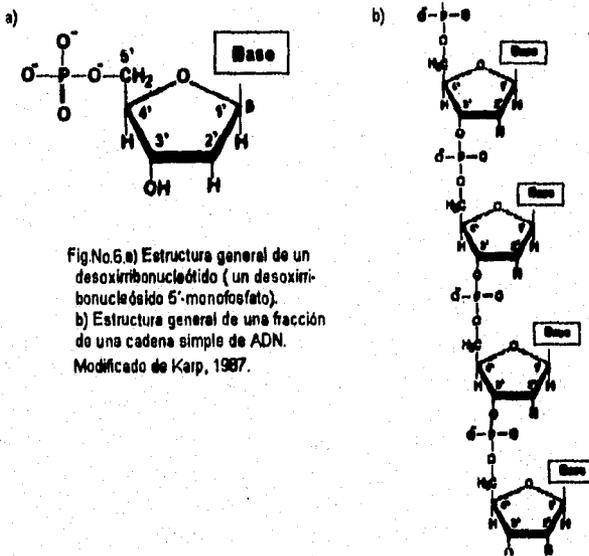
La distancia entre el átomo de fósforo del esqueleto y el centro del eje es de 10 Å (por lo tanto el ancho de la doble hélice es de 20 Å). (5,26,28,30).

En ancho de 20 Å de la fibra requiere que una pirimidina de una cadena siempre se aparee con una purina de la otra cadena, si no la asociación de dos purinas se extendería más allá del ancho requerido. (5,26,28,30).

Los átomos de hidrógeno enlazados con el carbono 4 de la citosina y el carbono 6 de la adenina están de manera predominante en la configuración amino (NH_2) en lugar de la forma imino (NH). De la misma manera, los átomos de oxígeno enlazados con el carbono 6 de la guanina y el carbono 4 de la timina están predominantemente en la configuración ceto ($\text{C}=\text{O}$) en lugar de la enol (COH). Estas restricciones estructurales en la configuración de las bases sugiere que la adenina es la única purina estructuralmente capaz de unirse con la timina, y la guanina es la única purina capaz de unirse con la citosina; por lo tanto, los únicos pares posibles son AT y GC, lo cual se ajusta al análisis efectuado por Chargaff. Los pares AT se unen por dos enlaces de hidrógeno y los pares GC por tres enlaces de hidrógeno. (5,26,28,30).

Las dos cadenas comprenden una doble hélice y las cadenas corren en direcciones opuestas, es decir son antiparalelas. En otras palabras, si una cadena está alineada en la dirección 5'-3', su cadena asociada debe alinearse en dirección 3'-5'. (5,26,28,30).

La doble hélice da una vuelta completa cada 10 residuos (34 Å) ó 150 vueltas por millón de peso molecular. (5,26,28,30).



No existe ninguna restricción en la secuencia de bases de una determinada cadena de una molécula. Sin embargo, una vez que la secuencia en particular se especifica en una cadena, la secuencia de la otra cadena se determina

automáticamente. Se usa el término complementariedad para expresar la relación entre las dos cadenas de la doble hélice; por ejemplo, A es complementaria de T, AGC es complementaria de TCG y una cadena entera es complementaria de la otra. (5,26,29,30). Fig. No.7.

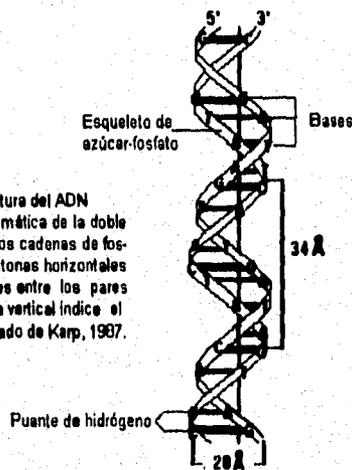


Fig. No. 7. Estructura del ADN
Representación esquemática de la doble hélice del ADN. Las dos cadenas de fosfato-azúcar y los bastones horizontales representan los enlaces entre los pares de las bases. La línea vertical indica el eje de la fibra. Modificado de Karp, 1967.

CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ESTRUCTURA DEL ADN

(1) Las dos bandas complementarias proveen un mecanismo para la replicación del ADN, durante la llamada fase "S" (síntesis) del ciclo celular, los puentes de hidrógeno se rompen, y las dos bandas se separan, cada banda actúa como molde para la formación de una "nueva" banda hija con las secuencias de bases complementarias a la banda ancestral. Una enzima cataliza la adición secuencial de nucleótidos para el crecimiento de las bandas de ADN, proceso conocido como replicación semiconservativa. (5,23,25).

(2) La secuencia de bases provee un código para el almacenamiento y transmisión de la información genética. Una molécula de ADN únicamente con tres pares de longitud pueden presentarse en 64 secuencias diferentes (AAA,AAT,AAG,AAC,ATA, etc). Una molécula de 100 pares de bases de longitud puede existir 4100 secuencias diferentes. (5,23,25).

(3) El ADN actúa como molde para la formación del RNA, la primer etapa en la síntesis de proteínas. (5,23,25).

PROPIEDADES DEL ADN

Desnaturalización del ADN.

La doble hélice del ADN experimenta un desenrollamiento cuando se somete:

- 1) A pH extremos,
- 2) Al calor,
- 3) A la disminución de la constante dieléctrica del medio acuoso por la incorporación de alcoholes, cetonas, etc.
- 4) A la acción de la urea, las amidas y otros solutos similares. (26,28).

El mecanismo que más se emplea para seguir la desnaturalización térmica, se denomina fusión, en donde se mide el aumento en la absorbancia de las cadenas sencillas en comparación con las de las originales (dobles), este aumento se denomina desviación hipercrómica o efecto hipercrómico. (26,28).

La temperatura en la que la desviación hipercrómica es semicompleta, recibe el nombre de temperatura media de fusión. (T_m). (26,28).

Cuando se comparan los perfiles de fusión de ADN extraídos de diversas fuentes, se hizo aparente que la T_m para una preparación de ADN (a una determinada fuerza iónica era indicador muy sensible de la composición de las bases del ADN. A mayor contenido GC (% de G + % de C), mayor T_m . Esta estabilidad aumentada del ADN que contiene GC, refleja la presencia de hidrógeno extra entre las bases, en comparación con la pareja de AT. (26,28).

Viscosidad.

Debido a su naturaleza sumamente delgada, de gran longitud y a la rigidez de la doble hélice, las moléculas de ADN se rompen en fragmentos cada vez más pequeños, en condiciones suaves y tienen capacidad para enrollarse alrededor de una varilla de vidrio. (26,28).

Interacciones iónicas

La superficie exterior de la tira de ADN es aniónica debido a la presencia de grandes cantidades de grupo fosfato, cada uno de los cuales está totalmente ionizado a pH fisiológico. Como un polianión, el ADN es capaz de interacciones iónicas con una gran cantidad de moléculas cargadas positivamente. En solución, el ADN por lo general forma complejos con pequeños cationes (Mg^{++} Ca^{++}) pero en la célula eucarionte está en íntima asociación con proteínas cargadas positivamente (histonas). (26,28).

Proceso de sedimentación.

La molécula de ADN se ha analizado por técnicas que utilizan ultracentrifugación. Si una muestra de ADN se centrifuga en un tubo que contiene un gradiente de densidad; es decir, una solución como el cloruro de cesio, cuya concentración aumenta de la parte superior del tubo, hacia el fondo, cada molécula de ADN se moviliza hacia un sitio del tubo en donde la densidad del medio equivale a su propia densidad de flotación. Una vez que la

molécula llega a su lugar, la fuerza de centrifugación, ya no puede afectarla y permanece ahí, lo cual quiere decir que alcanzó su equilibrio. (26,28).

Efecto hipercrómico.

La desnaturalización del ADN va acompañada de cambios profundos en sus propiedades físicas, ya que:

- 1) la viscosidad decrece
- 2) la absorción luminosa a 260 nm aumenta
- 3) la rotación óptica se hace más negativa
- 4) la densidad de flotación aumenta

Las bases púricas y pirimidínicas absorben la luz ultravioleta a 260 nm. Si el ADN de doble cadena se desnaturaliza por calor, se observa un gran incremento en la luz absorbida a 260 nm como en un 20 a 60% y está directamente relacionado con el contenido en pares de bases A-T cuanto mayor es la proporción de pares A-T, más grande es el incremento de la absorción lumínica, este aumento es conocido como efecto hipercrómico. (26,28).

Julius Marmur y col.(1960), notaron que si a las moléculas de ADN se les da suficiente tiempo de incubación, con fuerza iónica y temperatura adecuadas (aproximadamente 25°C por debajo de la Tm) favorece la formación de los enlaces de hidrógeno y son por lo tanto capaces de reasociarse, fenómeno denominado renaturalización o reasociación. La reacción de reasociación demuestra una cinética de segundo orden, esto es, es proporcional al producto de la concentración de los reactivos. A mayor número de moléculas complementarias en un volumen determinado, mayor es la frecuencia de colisión, y más rápida la formación de una estructura doble y estable. (26,28).

BASES GENÉTICAS PARA LA IDENTIFICACION DE INDIVIDUOS.

Cada ser humano tiene una apariencia física única (fenotipo) y estas características son el resultado de la interacción de la información genética que heredó de sus padres durante la concepción y la interacción del medio ambiente que le rodea. (4,27).

La información genética está contenida en la estructura molecular del **ácido desoxirribonucleico (ADN)** y esta información se encuentra cifrada en el orden en que las **cuatro bases nitrogenadas** (o simplemente bases) se encuentran acomodadas a lo largo de la cadena del ADN. La unidad de la herencia es conocida con el nombre de **gene**, el cual es un fragmento de ADN y contiene la información para fabricar proteínas y otras moléculas fundamentales para la vida. (5,23,28,29,31).

Los genes están contenidos en los 23 pares de cromosomas, 22 pares son autosómicos (cromosomas no sexuales) y por lo tanto se asume que todas las células somáticas de un individuo son genotípicamente idénticas, y un par de cromosomas que determinan el sexo del individuo (cromosomas sexuales). Un cromosoma contiene alrededor de 2 000 genes. (4,5,6,7,8,25,30,31).

La localización específica de un gene sobre el cromosoma se le llama **locus** (en plural loci). Un gene puede presentar formas alternativas que se conocen como **alelos**, los cuales difieren a nivel de la secuencia del ácido desoxirribonucleico. Un **polimorfismo** es la frecuencia, dentro de una población de dos o más formas alternativas y distintos fenotipos que resultan de la **variación alélica** en un locus. (5,8,26).

Uno de cada par de cromosomas es de origen materno, la otra parte obviamente representa aquellos cromosomas recibidos del padre biológico.

Por su dotación cromosómica doble, los organismos diploides poseen dos alelos de cada uno de sus genes, con excepción de algunos genes localizados en cromosomas sexuales. Cuando ambos alelos son del mismo tipo, el organismo es **homocigoto** y cuando son diferentes, el organismo es **heterocigoto**. Algunos alelos pueden ser dominantes sobre otros en términos de su expresión. Frecuentemente el fenotipo determinado por un alelo se manifiesta aunque éste se encuentre en heterocigocidad; en contraste, otros alelos requieren de la homocigocidad para que se pueda manifestar el fenotipo que determinan. El primero es llamado **dominante** y el segundo **recesivo**. Sin embargo, existen alelos que son **codominantes** es decir que ambos se expresan cuando el estado es heterocigoto. (4,5,6,8,26).

Las razones por las que cada individuo es genéticamente diferente a todos los demás (excepto si tiene un gemelo idéntico) residen por un lado en la gran variedad de formas que puede tener cada uno de los aproximadamente 100,000 genes que tenemos los seres humanos y por otro, en la forma sexual como nos reproducimos. (5).

Cada gen contiene las especificaciones de una estructura o de una función particular del cuerpo, pero estas especificaciones pueden variar (alelos) y pueden considerarse como una variación normal, por ejemplo; los distintos grados de pigmentación de la piel, color de los ojos, o variedades fuera de lo normal (mutaciones), como en el caso de los albinos. (5).

Por otro lado, durante la meiosis (Fig No. 8) los cromosomas del padre y de la madre se entrecruzan para posteriormente repartirse en las dos células que formarán los gametos. Durante este entrecruzamiento o **recombinación genética** los cromosomas intercambian información entre ellos de tal manera que se forman cromosomas que son una combinación

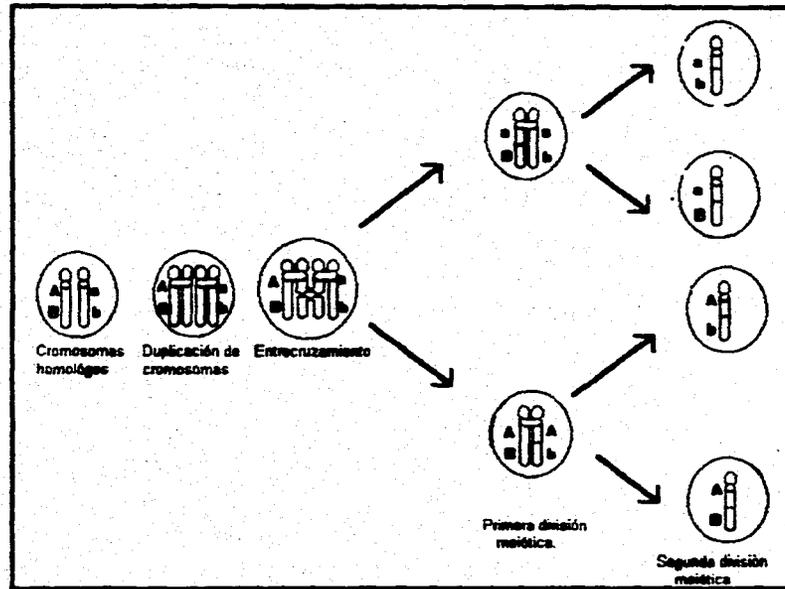


Fig. No. 8. Efecto del entrecruzamiento en la distribución de los alelos maternos y paternos dentro de los gametos. Modificado de Karp, 1967.

de los cromosomas del padre y de la madre. Si el cromosoma paterno tiene los alelos A y B en dos genes distintos y el materno tiene los alelos a y b en esos mismos genes, entonces los cromosomas que irán a formar a las células hijas tendrán complementos genéticos que no existían en los padres, como son las combinaciones de AB y ab. Estos gametos se llaman gametos recombinantes, en contraposición a los gametos ab y AB que son los parentales por ser los que fueron heredados por los padres. La variedad de óvulos y espermatozoides es tan grande que al conjuntarse darán lugar a una combinación única e irrepetible. (23,26).

El genoma humano (23 pares de cromosomas) consiste de secuencias de ADN de función conocida (exones), que codifican para la secuencia de aminoácidos de una proteína; pero, existen otras secuencias cuya función aún no ha sido establecida (intrones). Tal ADN "no codificante" actúa como secuencia "espaciadora" entre regiones "codificantes" y constituyen aproximadamente 90% del genoma humano, teniendo poca capacidad en la traducción o transcripción. Estas secuencias se han analizado y se ha visto que están constituidas por ADN repetitivo y son altamente polimórficas. (5,6). Existen dos clases de polimorfismos:

Polimorfismos de sitio. En donde la variabilidad alélica es debida a diferencias en sitios específicos en la molécula de ADN. En estos loci polimórficos la presencia de una base química particular del ADN confiere susceptibilidad a la acción de corte por unas tijeras químicas (enzimas) conocidas como endonucleasas de restricción. La forma alternativa del gen (alelo) el cual carece de esta secuencia química particular, es decir la ausencia del llamado sitio de restricción no permite el corte por la endonucleasa en este sitio. Así la presencia o ausencia de sitios de restricción dan como resultado fragmentos cromosómicos de longitud

variable. Los fragmentos resultantes del tratamiento enzimático son separados por longitud bajo una corriente eléctrica a través de un gel (proceso llamado electroforesis) y utilizando un ADN que tenga una secuencia similar al ADN es hibridizado (acoplado). Estos polimorfismos de sitio son mejor conocidos como polimorfismos de longitud en el fragmento de restricción (RFLPs). (Fig No. 9). (5,6).

Polimorfismos de longitud. Los polimorfismos también pueden presentarse en repeticiones múltiples de segmentos de corta longitud de ADN. En cada uno de los segmentos repetidos de la secuencia es similar, pero el segmento de longitud varia. Estos loci son conocidos como número variable de repeticiones en tándem (VNTR). Las secuencias en tándem se consideran que son alelos de longitud de bases. (5,6).

Para un locus VNTR, un individuo tiene dos alelos, uno en cada cromosoma. Los dos alelos pueden ser de la misma longitud o ser diferentes. Así, para un locus VNTR simple, cada individuo tiene una banda (homocigoto) o dos bandas (heterocigoto). Las secuencias repetitivas pueden presentarse en loci múltiples sobre varios cromosomas. (Fig No 9). (5,6).

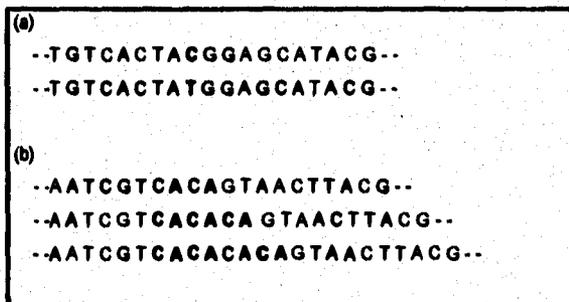


Fig. No. 9. Dos tipos de polimorfismos:
(a) un simple cambio de base
(b) repeticiones en tandem de número variable (VNTR).

METODOLOGIAS PARA EL ANALISIS DEL ADN EN EL AREA FORENSE.

La metodología particular que se emplee dependerá de la cantidad y calidad de la muestra, el objetivo de la prueba y la preferencia del laboratorio para llevar a cabo tal procedimiento. (5,7,25)

Todas las metodologías sin embargo, están diseñadas para aislar ciertas secuencias de nucleótidos -los segmentos polimórficos de la molécula del ADN. Estos fragmentos proveen las bases para distinguir el ADN de cada individuo.

En el trabajo forense, se utilizan dos métodos analíticos comunes para detectar el ADN polimórfico en muestras de origen humano y son : Polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción (RFLP) y las técnicas basadas en la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). (5,7,25).

El método de RFLP identifica fragmentos de la cadena de ADN que contiene los segmentos polimórficos, produce una "huella" de ADN de los fragmentos y mide su longitud. (5,7,25).

Los métodos basados en PCR determinan la presencia de alelos específicos (formas alternativas de genes que están presentes en diferentes individuos) de esta manera señalan las características genéticas específicas. (5,7,25).

POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DEL FRAGMENTO DE RESTRICCIÓN.

Para generar y detectar los polimorfismos en la longitud del fragmento de restricción (RFLPs), el ADN primero deberá ser aislado, las bandas de ADN son cortadas utilizando unas tijeras enzimáticas (endonucleasas de restricción Res), enzimas derivadas de bacterias que catalizan el proceso de corte. Una enzima particular cortará las bandas de ADN en la misma secuencia de nucleótidos (sitio de restricción). Por ejemplo la enzima de restricción Hpa I y

reconoce la secuencia de nucleótidos GTTAAC y marca el corte entre la A y la T.

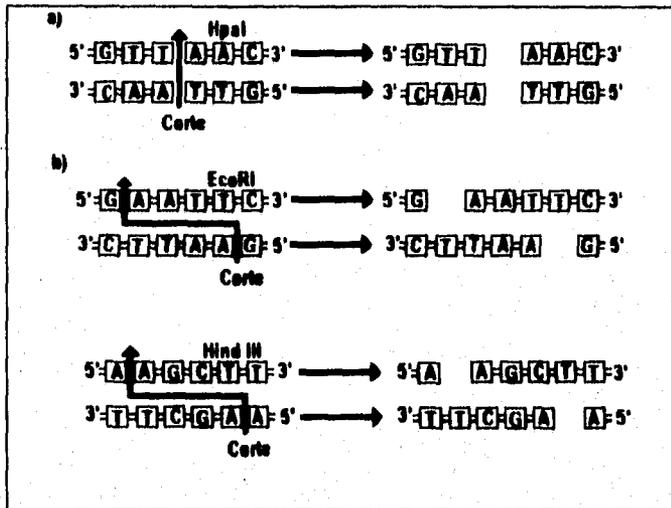


Fig No. 10 El corte del ADN por enzimas de restricción puede efectuarse de dos maneras distintas a) bordes romos; b) terminales cohesivos. Modificado de Vives Puiggrós, 1994.

Utilizando una técnica llamada electroforesis, los fragmentos polimórficos son separados por longitud. El ADN tiene una carga eléctrica negativa por lo tanto se moverá hacia el electrodo positivo. La distancia que recorra de un fragmento de ADN dependerá de la carga eléctrica, por su longitud y peso molecular. Así los fragmentos de la misma longitud y peso molecular recorrerán la misma distancia, los fragmentos más grandes se moverán más lentamente que los fragmentos más pequeños. Después de la electroforesis, la siguiente etapa consiste en transferir -los fragmentos de ADN del gel a la membrana de nylon procedimiento conocido como "Southern blotting", un reactivo químico (como hidróxido de sodio) actúa como una solución de transferencia y como medio

para separar los fragmentos de doble cadena en cadena sencilla. El ADN desnaturalizado (de una cadena) se trasfiere a un papel de nitrocelulosa, se seca y se somete a hibridación con una sonda marcada, que se unirá a la cadena complementaria. Después de unas horas de incubación, se procede a lavar la nitrocelulosa. Una vez seca se le aplica una placa de radiografía y se expone unos días a rayos X, al cabo de los cuales aparecerán unas bandas correspondientes a los fragmentos de ADN donde se hallaban las secuencias complementarias a la sonda. (5,6,7,25,32).

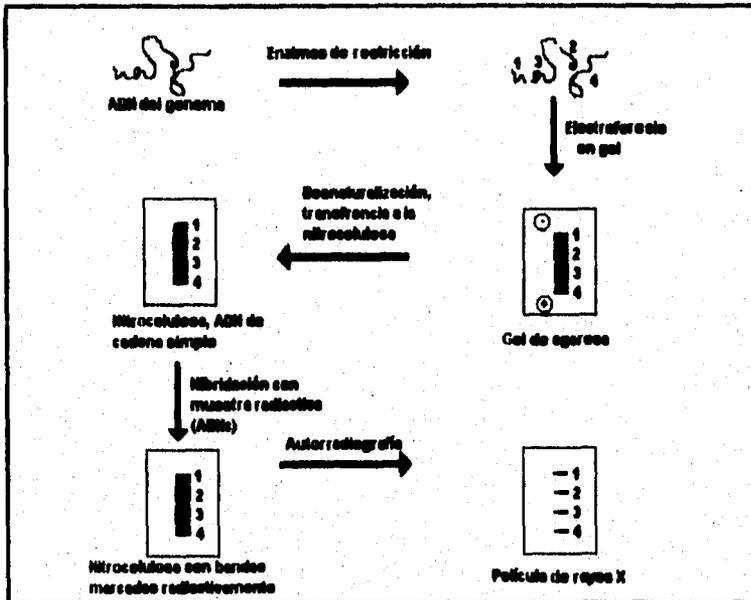


Fig. No. 11. Técnica de Southern Modificado de Vives Puiggrás, 1994.

El resultado es una autorradiografía y se parece mucho a un código de barras. Las diferencias genéticas entre los individuos serán identificadas como diferencias en la localización y distribución de los patrones de las bandas. (5,6).

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa no solamente es una herramienta analítica, sino también, una técnica de amplificación utilizada frecuentemente cuando la cantidad de la muestra está degradada.

Este método enzimático *in vitro* permite generar millones de copias de un segmento específico de ADN. (6,31,32,33,34,35,36,37,38,39).

La reacción en cadena de la Polimerasa requiere tres etapas térmicas:

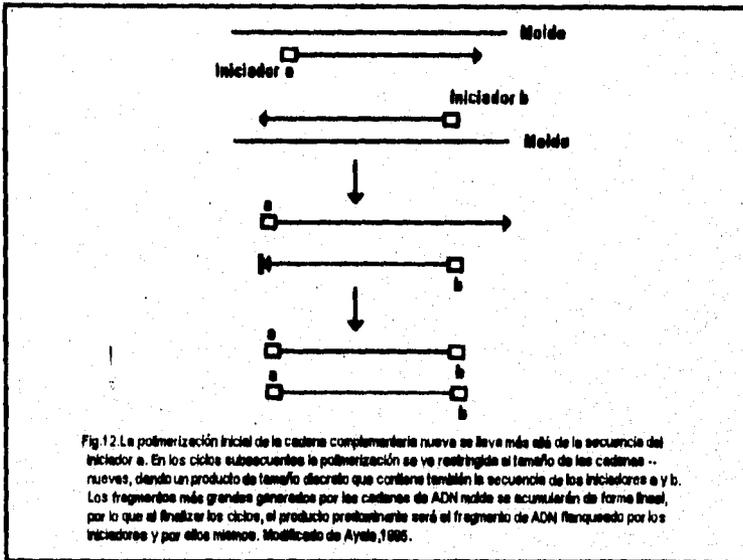
(1) Desnaturalización del ADN genómico.

La muestra de ADN es calentada de 92-96°C para separar las dos cadenas produciendo dos cadenas simples. Cada banda sirve de molde para la etapa de alineación.

(2) Alineación de los iniciadores al sitio complementario al molde de ADN de 45 a 72°C. Dos secuencias de oligonucleótidos sintéticos (conocidos como iniciadores) son diseñados de tal modo que por su estructura hibriden específicamente y en orientación adecuada (5' a 3') con la secuencia de interés del molde, donde de esta forma da lugar a una pequeña región de doble cadena inicial que necesita la ADN polimerasa.

(3) Extensión del iniciador en la terminal 3' OH por adiciones sucesivas de deoxinucleótidos (dNTPs). La extensión ocurre a 72°C. Las tres etapas anteriores conforman un ciclo.

La ADN polimerasa lleva a cabo la síntesis de una cadena complementaria de ADN en dirección 5' a 3' teniendo como molde ADN de doble cadena. Este proceso se repite generalmente 25 ciclos, la amplificación del ADN original es de aproximadamente un millón de copias. (6,31,32,33,34,35,36,37,38,39).



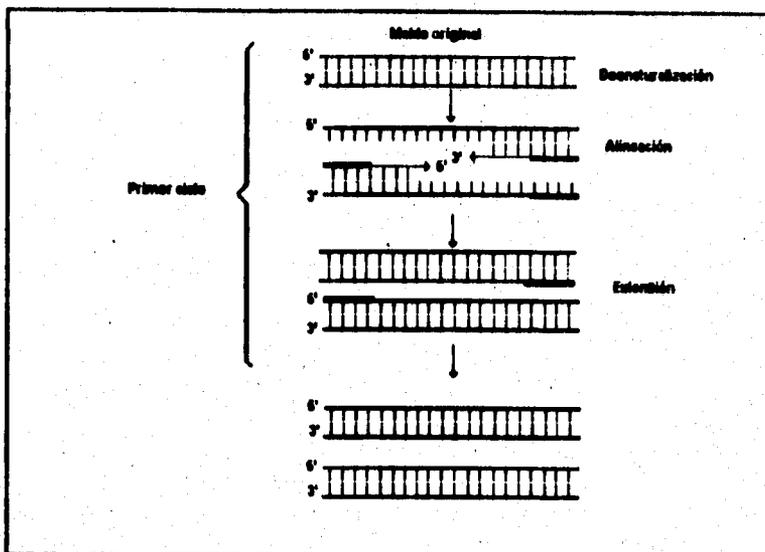


Fig. No. 13. Representación gráfica del primer ciclo de amplificación de la Reacción en cadena de la Polimerasa. Modificado de Reynolds, 1991.

El ADN amplificado puede entonces ser analizado por alguna de las siguientes metodologías:

1) Sondas de oligonucleótidos alelo específicas.

Un alelo es una de las varias formas alternativas de un gen con las mismas características y ocupan un locus dado sobre un cromosoma. En lugar de medir la longitud de los fragmentos de ADN como en la técnica de RFLP, las sondas alelo específicas son utilizadas para determinar si un alelo específico está presente. Este proceso es frecuentemente conducido en conjunto con PCR. (5,6,7).

El ADN es extraído y colocado sobre una membrana de nylon donde se introducen las sondas alelo específicas. Un proceso llamado "Dot Blot" estabiliza la muestra y una marca fluorescente hace visibles los puntos en los cuales hibridizaron. Existe también el método ASO reverso, en el cual se adhiere el oligonucleótido específico a la membrana y se visualiza un punto de color azul cuando el producto de amplificación hibridiza con el oligonucleótido específico.

Existen dos tipos de sondas de este tipo, de locus simple en donde los alelos detectados están presentes en el locus y las de multifocus en donde la sonda reconoce diferentes genes sobre diferentes cromosomas o reconoce a una familia de genes. (5,6,7).

2) Análisis electroforético.

El cual se utiliza para separar los productos de amplificación de diferente tamaño debido a las secuencias repetidas en tándem. (5,6,7).

3) Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados.

Este método involucra la purificación del ADN pero en lugar de fraccionar al ADN con una enzima de restricción, la técnica de amplificación PCR es utilizada para producir millones de copias de solamente la porción específica del cromosoma. (5,6,7).

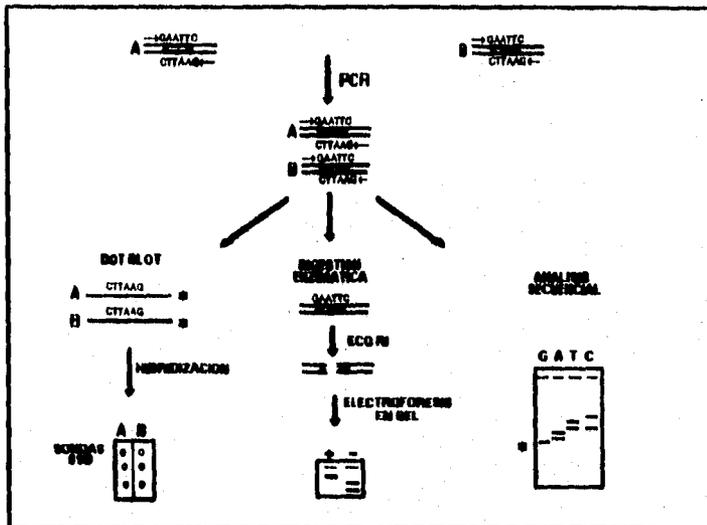


Fig. No. 14. Análisis de los productos generados por PCR de los primers (oligonucleótidos) flanqueantes a la región del polimorfismo. En este ejemplo, el polimorfismo es un simple cambio de bases en la secuencia de reconocimiento por la endonucleasa de restricción Eco RI (*). Los primers son complementarios a las secuencias conservadas en cada lado del polimorfismo, indicados por las flechas. Los dos tipos de productos de PCR son generados de este modelo mezclado; uno (A) contiene la secuencia de reconocimiento por la Eco RI y el otro (B) contiene la secuencia alterada. Tres métodos se ilustran para el análisis de los productos. Al utilizar el método de Dot Blot, los productos de PCR son fijados a una membrana de nylon. Las dos sondas de oligonucleótidos específicos (SSO) marcadas hibridizarán con las tiras idénticas bajo condiciones que permitan perfectamente unirse a las secuencias complementarias. La sonda 1 podrá hibridizar específicamente con los productos que contengan la secuencia A, y la sonda 2 podrá hibridizar con los productos que contienen la secuencia B. Consecuentemente, productos heterocigotos (una mezcla de los productos de secuencia A y B) hibridizarán con ambas sondas, mientras que los productos homocigotos hibridizarán con una sonda. La digestión con una enzima de restricción seguida por electroforesis en gel permite facilitar la determinación de genotipos cuando una secuencia de reconocimiento es afectada por el polimorfismo. Esta técnica permite observar los patrones de homocigotos y heterocigotos por medio de bandas. El análisis de la secuencia de ADN de los productos de PCR provee la secuencia actual del producto a través de la región polimórfica. La posición del polimorfismo es marcada con un asterisco (*). Las secuencias son leídas desde el final a la parte superior del gel. La secuencia del producto A es 5'-GAATTC mientras que la del producto B es 5'-GAACTC. La secuencia heterocigota es distinguida de la homocigota por la presencia de ambos residuos en la posición polimórfica. Modificado de Reynolds, 1991.

**TIPIFICACION DEL ADN
CON PROPOSITOS DE IDENTIFICACION LEGAL Y FORENSE.**

Sin lugar a dudas, el advenimiento de la PCR permitió un gran avance en las pruebas de identificación. La ventaja de esta técnica radica en su capacidad para generar miles de copias de una secuencia específica de (gene) ADN y con ello aportar material suficiente para realizar una diferenciación a nivel molecular. Como consecuencia, se han desarrollado sistemas de identificación por medio de marcadores genéticos en donde el poder de discriminación es mucho mayor que el obtenido con los marcadores tradicionales (grupo sanguíneo ABO, Rh, Fosfoglucumutasa (PGM)). (5,6,7).

Los marcadores genéticos adoptados en el área legal y forense (polymarker. HLA DQ A₁, D1S80), deben como ya se mencionó anteriormente, ser polimórficos, es decir, que se encuentren más de dos alelos de un gen en particular dentro de una población determinada. Se dice que un locus es polimórfico si las frecuencias de los alelos más comunes son menores de 0.95.

La tipificación de un marcador genético amplificado por PCR se basa en la detección de variación en las secuencias de ADN. Un tipo de polimorfismo es el cambio de una simple base. El segundo es la variación en las secuencias repetitivas o VNTR's de genes específicos. Dichos polimorfismos pueden ser diferentes de una persona a otra. (13,42,43,44,45,46,47,48).

Existen en la actualidad Kits que contienen todo lo necesario para llevar a cabo la técnica de PCR y que son específicos para determinado marcador genético. Algunos de estos sistemas son el, HLA DQ A₁, Polymarker y D1S80, éstos son ampliamente utilizados debido a su elevada variación alélica que

presentan dentro de la población. Se han llevado a cabo estudios para determinar la frecuencia de marcadores genéticos en diferentes poblaciones del mundo, los resultados revelan una elevada heterocigocidad y un alto poder de discriminación. No obstante, para la población mexicana sólo existen datos de frecuencia alélicas para el sistema HLA DQ A₁, no así para el D1S80 y PM.

A diferencia de la tipificación de polimorfismos en la secuencia de un gen, el análisis de los VNTR's ofrece una mayor ventaja pues hay más alelos en la población y por tanto un mayor número de combinaciones pueden obtenerse.(15).

I. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (HLA REGIÓN DQa1a)

La tipificación de la región DQ A₁ del Complejo Mayor de Histocompatibilidad no sólo es indispensable en la investigación de enfermedades del sistema inmunitario y la tipificación de tejidos para el trasplante de órganos, sino que se ha convertido en una herramienta imprescindible en la identificación de individuos. Este fue el primer sistema que se utilizó con fines forenses aplicando la PCR. Se han observado en la región DQ A₁ seis alelos (DQA 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3 y 4) cuya combinación definen 21 genotipos. La tipificación de este sistema se realiza con sondas específicas de oligonucleótidos (SSO) que están fijadas en membranas de nylon, dichas sondas son complementarias a la secuencia amplificada. A este método se le conoce como reverso del dot blot. La hidridización de las sondas con el producto amplificado se lleva a cabo bajo condiciones estrictas de lavados y temperatura, ya que se utiliza una enzima conjugada que produce la reacción de color la cual revela el alelo presente en una determinada muestra.

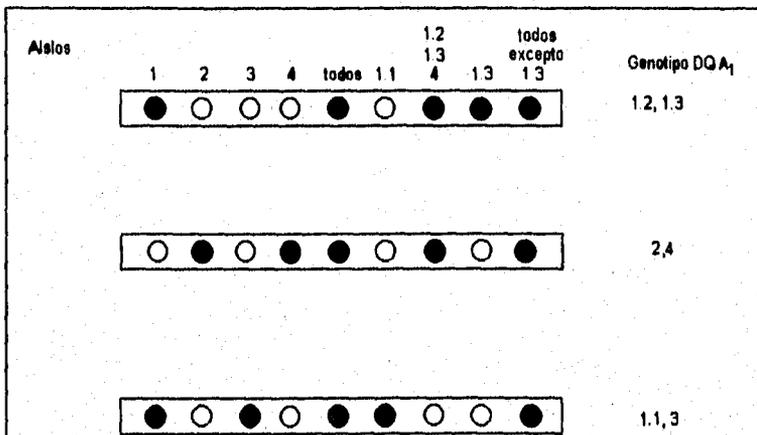


Fig. No. 15. Sondas inmovilizadas para la tipificación de QD A₁. Los patrones del reverso de dot blot para tres genotipos se ilustran. Cada uno de los 21 genotipos tiene un único patrón de puntos. Existen 9 sondas diferentes en la tira. Las cuatro primeras sondas representan a los alelos 1, 2, 3 y 4 respectivamente la quinta sonda denominada "todos" contiene una mezcla de todos los alelos y sirve como indicador, una intensidad superior o igual a esta mancha se considera como positiva. Las cuatro sondas restantes sirven para distinguir los subtipos del alelo 1. La primera y la tercera son específicas para los alelos 1.1 y 1.3 respectivamente, la segunda contiene una secuencia complementaria de los alelos 1.2, 1.3 y 4, la última sonda hibridiza con todos los alelos excepto con 1.3 y sirve para distinguir el genotipo 1.2, 1.3 del genotipo 1.3,1.3. Modificado de Reynolds, 1991.

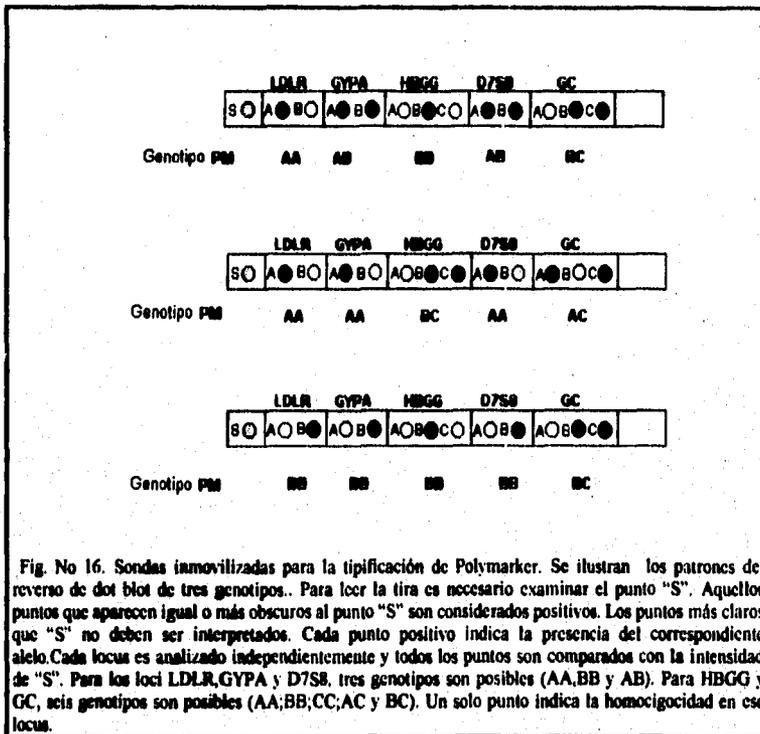
Este método es específico ya que permite observar cualquier variación alélica, debido a que en el soporte de nylon se encuentran las secuencias que son complementarias para cada uno de los alelos posibles.(45).

II. POLYMARKER

Este sistema incluye la tipificación simultánea de cinco loci genéticos como lo son; Receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), Glicoforina A (GYPA), Gammaglobina Hemoglobina G (HBGG), D7S8 y Componente específico de grupo (GC). Los alelos así como su localización en los cromosomas se enuncian en la siguiente tabla, incluyendo HLA DQalfa.

LOCUS	CROMOSOMA	PRODUCTO DE PCR (pb).	No. ALELOS
LDLR	19	214	2
GYPA	4	190	2
HBGG	11	172	3
D7S8	7	151	2
GC	4	138	3
HLA DQ alfa	6	239/242	6

Tomado de protocolo de amplificación del kit forense de polymarker. Perkin Elmer.



A pesar de que los seis loci génicos sólo poseen 2 ó 3 alelos por cada locus, este sistema es muy útil en la identificación forense de evidencia biológica y en pruebas para la determinación de paternidad, y de igual forma que en el sistema HLA DQ A₁, se utiliza el método reverso dot blot para la obtención del genotipo. (45).

III D1S80

La tipificación en este sistema consiste en la detección de secuencias repetitivas denominadas VNTR's o minisatélites que se localizan en el locus D1S80. Este locus (identificado por la sonda pMCT118) contiene como secuencia base un segmento de ADN constituido de 16 pb que se repiten de 14 a 41 veces. Cada alelo está determinado por el número de veces en que se repite la secuencia base (core), es decir, que el alelo 14 se define así porque la secuencia base se repite 14 veces, y así sucesivamente para los demás alelos. Como puede observarse, esta región posee una alta variabilidad alélica, ya que se han encontrado hasta el momento 29 alelos que definen 435 genotipos. (13,42,43,44,46).

Estudios realizados en familias revelan que el D1S80 se hereda de manera autosómica co-dominante, es decir que cualquier alelo tiene la misma probabilidad de segregarse durante la meiosis sin importar el tamaño del alelo. En general se dice que un buen marcador genético se trasmite por este mecanismo. (13,42,43,44,46).

Para poder observar los alelos presentes en las muestras biológicas y llevar a cabo la caracterización genética se aplica la técnica de electroforesis con geles de poliacrilamida (PAGE). La técnica de electroforesis permite separar los alelos VNTR's dependiendo de su tamaño, así cada alelo mostrará un recorrido electroforético distinto. (13,42,43,44,46).

El uso de este marcador genético como sistema de identificación se ha extendido en el área legal y forense ya que la aplicación de la PCR representa

una enorme ventaja pues se evita el uso de sondas radiactivas, necesarias en el análisis de RFLP, además de que la tipificación de cualquier evidencia biológica se realiza en corto tiempo. (13,42,43,44,46).

PERSPECTIVAS

Dedido al alto polimorfismo que presenta la región D1S80, éste se ha adoptado como sistema de identificación en laboratorios forenses. Como consecuencia se han generado estudios para conocer las frecuencias alélicas y genotípicas en determinadas poblaciones y de este modo obtener un banco de datos cuya estadística permita con absoluta certeza identificar a un individuo al relacionar la evidencia biológica con algún sospechoso.

VENTAJAS DE LA TIPIFICACION DEL ADN DE MATERIAL FORENSE BASADOS EN PCR.

Las técnicas de amplificación por PCR son simples, rápidas y sin paralelo en sensibilidad y aplicabilidad. Como tal, la tipificación de ADN utilizando PCR tiene varias ventajas en el área forense sobre el método de RFLP. (6).

Primera.- La tipificación es fácil y más rápida de realizar, puesto que no involucra el uso de radioactividad. Los resultados de la tipificación pueden ser obtenidos en días en comparación con meses para RFLP. La tipificación basada en PCR es automatizada por lo cual reduce al error del operador e incrementa el número de muestras que pueden ser tipificadas en un período corto de tiempo. (6).

Segunda.- Está basada en la sensibilidad; se necesita 1µg de ADN o menos para el análisis. Consecuentemente, el ADN puede extraerse de un simple cabello, pequeñas manchas de sangre, saliva o semen, tejidos, fragmentos de hueso y diente. Debido a que los métodos de tipificación por PCR consumen poco ADN, el análisis de las muestras puede ser repetido. Esto es una gran ventaja para el trabajo forense. En contraste con el análisis de RFLP que requiere de 50 a 500 ng de ADN y por lo tanto la repetición del análisis no siempre es posible. (6).

Otra ventaja de los sistemas de tipificación basados en PCR es que son menos sensitivos a la degradación del ADN. La degradación progresiva de ADN conduce a la pérdida de fragmentos de ADN (bandas) lo que imposibilita su detección por medio de RFLP. La amplificación de muestras de ADN por PCR requiere únicamente que el tamaño promedio del fragmento específico en la muestra sea igual o exceda al de la región(s) para ser amplificadas.(6).

APLICACIONES DE LA TIPIFICACION DEL ADN.

El desarrollo y perfeccionamiento de las huellas génicas ha abierto la posibilidad de identificar, a partir del material hereditario, la relación que existe entre distintos individuos. Esta técnica ha encontrado numerosas aplicaciones, y que continuación se describen.

Paternidad.

A causa del nuevo énfasis sobre los derechos de los niños, existe interés en aplicar métodos para establecer el parentesco. Actualmente se han sugerido regiones de ADN (VNTR) que son el mejor medio de análisis para la determinación de paternidad debido a que son marcadores altamente informativos y se heredan de manera mendeliana. (19,49,50).

Para resolver un caso de paternidad dudosa, hasta hace muy poco los especialistas comparaban los grupos sanguíneos y proteínas séricas y eritrocitarias heredadas de las partes implicadas: el presunto padre, la madre y el hijo. A pesar de la fiabilidad de la prueba convencional, ésta se limitaba a excluir un hombre de la responsabilidad de ser el padre biológico de la criatura con cierta seguridad aunque no de forma concluyente. Sin embargo, gracias a la huella génica, el analista es capaz de determinar con absoluta certeza si el acusado es en realidad el padre biológico del niño. (19,49,50).

La evaluación de probabilidad estadística de la paternidad, es expresada en forma de una razón o proporción de probabilidad llamada Índice de paternidad.

El índice de paternidad es derivado de las frecuencias obtenidas de cada de los sistemas genéticos utilizados uno para este fin tanto de la madre, el padre en disputa y el menor. (19,49,50).

Identificación de personas perdidas y víctimas

El perfil del ADN permite a los científicos forenses comparar los patrones de ADN de gente no identificada con aquellos patrones de sus familiares y determinar su identidad. La corporación "Lifecodes" ha llevado a cabo este proceso para identificar los restos de soldados perdidos en acción en las recientes áreas de conflicto. (5).

Investigación de una serie de crímenes cometidos por una misma persona.

El perfil genético de ADN puede ser muy útil en las investigaciones donde se quiera corroborar si diferentes evidencias comparten el mismo perfil que el del sospechoso, esto es muy útil sobre todo en casos de violación. (5).

Reapertura de casos no solucionados

Como el ADN frecuentemente mantiene un alto grado de integridad en manchas por largo periodo, el perfil del ADN puede ser reutilizado para reevaluar este tipo de evidencias. (5).

Inmigración.

Algunos países, como Gran Bretaña, utilizan la huella génica para confirmar el parentesco de los inmigrantes con los que dicen ser sus familiares establecidos en dicho país.

Evolución.

A partir del material genético rescatado de restos biológicos conservados de hombres, animales y plantas, los científicos ahondan con una precisión exquisita en el origen y la evolución de las especies o filogenia.

LIMITACIONES DE LA TIPIFICACION DEL ADN.

La tipificación del ADN ofrece a la investigación forense la oportunidad de determinar con un alto grado de certeza si las muestras recolectadas de diferentes sitios en el lugar de los hechos tienen el mismo origen, sin embargo su contribución a los sistemas de justicia civil y criminal no deben ser exageradas, ya que existen varias limitaciones de esta nueva herramienta y que continuación se describen:

El tiempo requerido para realizar el análisis para determinada muestra biológica es largo.

La cantidad y calidad de las muestras debe tenerse muy en cuenta pues, de estos dos factores depende que los resultados sean satisfactorios. Así una mancha de sangre necesita por lo menos contener 50 μ l de este fluido para poder llevar a cabo el análisis (Sensabaugh). El correspondiente límite para semen es de aproximadamente 10 μ l y para la tipificación de cabello es necesario contar con que éste presente raíz. (5).

Cuando las muestras recobradas de la escena del delito son adecuadas para llevar a cabo un análisis genético, el análisis no es inmediatamente útil a menos que un sospechoso esté en custodia. En este caso el ADN de la evidencia puede ser comparada con los resultados obtenidos de la muestra proporcionada por el sospechoso. Si por otra parte no se cuenta con el sospechoso, los resultados del análisis de la evidencia son de poca utilidad.

Otro factor limitante de utilizar las pruebas de ADN ha sido la escasez de laboratorios gubernamentales para realizar este tipo de análisis, la dificultad de financiamiento y la obtención de recursos para iniciar un programa ambicioso con la finalidad de tener un banco de datos sobre las frecuencias alélicas de los sistemas de marcadores genéticos utilizados en el área legal y forense. (5,7).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que el genoma humano contiene un número apreciable de secuencias polimórficas que se repiten miles de veces a lo largo del mismo. Estas secuencias altamente variables (VNTR), cuyo papel en nuestro organismo aún no se ha esclarecido, se conoce que varían de una persona a otra por lo que han sido utilizadas por los científicos forenses como otro sistema más de identificación de delincuentes, cadáveres, y en la adjudicación de paternidad con un alto grado de confiabilidad que rebasa a la obtenida por las técnicas convencionales. (4,5,6,7,8,15,49,50).

Las pruebas de ADN incluyen dos etapas principales cuando se utilizan en el ámbito legal. La primera involucra las técnicas biológicas moleculares que permitan obtener el material genético o ADN directamente de una muestra biológica. La segunda etapa consiste en la interpretación de la prueba de ADN, dentro de esta etapa es posible obtener uno de los siguientes resultados:

-Cuando el patrón genético de ADN de la evidencia no coincide con la del sospechoso la prueba puede ser declarada exculpatoria. En este caso, no se requiere una base de datos sobre los marcadores utilizados; sin embargo, cuando coinciden los patrones genéticos de las muestras del sospechoso con las de la víctima, y los indicios recolectados en el lugar de los hechos, el estudio se puede declarar como inclusión positiva, para este último caso se debe reconocer la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la misma población de la que proviene el sospechoso, tengan el mismo patrón genético, a fin de evitar el argumento de que el sospechoso no está ligado a la

muestra o que existen otros individuos con el mismo patrón genético. (15). Por lo anterior las preguntas de relevancia directa son: ¿Qué diferencias génicas existen entre el ADN de un individuo en relación a los otros individuos de una población?, y ¿Cómo pueden estas diferencias ser utilizadas para discernimiento en el ámbito legal?. (5).

Este es el principal problema y el punto de controversia en los casos legales, por lo tanto existe la necesidad de desarrollar una metodología confiable para establecer la identidad, basadas en la presencia de diferencias a nivel molecular entre individuos de la población.

En la adjudicación de la paternidad la prueba se fundamenta en el hecho de que el padre biológico debió heredar al hijo la mitad de la información genética. por lo que el patrón genético del hijo debe presentar identidad parcial con el patrón genético del padre biológico, y debe presentar además, identidad parcial con el patrón genético de la madre. (19,49,50).

Sin embargo, se debe conocer la probabilidad de que un individuo tomado al azar de la misma población pueda ser el padre biológico. Esto hace necesario la disponibilidad de un banco de datos en el que se registren las frecuencias alélicas y genotípicas para cada uno de los sistemas genéticos estudiados.

Una de las secuencias altamente polimórficas que ha sido ampliamente estudiada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, se encuentra en el locus D1S80, la cual se ha identificado por la sonda pMCT118; está localizada en la región distal del cromosoma número 1 y muestra segregación autosómica codominante. Las unidades repetitivas del D1S80 son de 16 pares de bases de longitud y se repiten de 14 a 41 veces para cada alelo. Por lo menos 29 alelos han sido identificados hasta la fecha con un poder de

discriminación (PD) de 0.95-0.98 dependiendo de la población estudiada y está incluido como uno de los sistemas para la obtención de la "huella génica".

Por lo anterior, y considerando que en nuestro país no hay estudios sobre la distribución de frecuencias alélicas del locus D1S80 en la población mexicana, se pretende llevar a cabo un estudio piloto en una muestra de la zona metropolitana de la Ciudad de México.

OBJETIVO GENERAL

- ★ **Obtener y analizar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en el locus D1S80 de una muestra de la zona metropolitana de la Ciudad de México.**

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ★ **Recolectar 116 muestras de los individuos seleccionados para el estudio.**
- ★ **Extraer el material genético ADN a través de diferentes protocolos de extracción dependiendo del tipo de muestra.**
- ★ **Utilizando la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa y estándares de ADN de concentración conocida, cuantificar el ADN aislado de cada una de las muestras.**
- ★ **Amplificar el fragmento de ADN del cromosoma 1 ubicado en el brazo corto en el locus 80 a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. (PCR).**
- ★ **Estandarizar la técnica de electroforesis vertical con gel de poliacrilamida (PAGE).**
- ★ **Determinar los alelos y genotipos del locus D1S80 por medio de la técnica de PAGE.**
- ★ **Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas**

★ Determinar si la distribución de las frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México se encuentra en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg.

★ Obtener el poder de discriminación del locus D1S80 para la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México

★ Comparar las frecuencias alélicas de la zona metropolitana de la Ciudad de México con otras poblaciones.

HIPOTESIS NULA (H_0).

La distribución de las frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México en el locus D1S80, se encuentra en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg por lo tanto, estas frecuencias se utilizarán para conformar el banco de datos con propósitos forenses.

HIPOTESIS ALTERNA (H_a).

La distribución de las frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México en el locus D1S80, no se encuentra en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg por lo tanto, estas frecuencias no se pueden utilizar para conformar el banco de datos con propósitos forenses.

DISEÑO DE LA INVESTIGACION

TIPO DE ESTUDIO

La investigación se realizó de acuerdo a un diseño de tipo observacional, prospectivo, transversal, descriptivo.

POBLACION

La población sujeta al estudio fue de 116 personas voluntarias de la Institución, principalmente de peritos, policías judiciales y de aquellas personas que de un modo u otro están relacionadas con alguna de las averiguaciones previas, sin parentesco familiar, que nacieron y/o que residen en el D.F. o en la zona metropolitana de la Ciudad de México, las cuales donaron alguna de las siguientes muestras: sangre, saliva o semen.

I.- CRITERIOS DE INCLUSION: Se consideró a personas de sexo femenino y masculino que nacieron y que radican en la zona metropolitana de la Ciudad de México, de edad entre 20 y 50 años y que no refieran parentesco familiar entre ellas.

II.- CRITERIOS DE EXCLUSION: No se tomaron muestras a personas que refirieron parentesco familiar y que no nacieran o radicaran en la zona elegida para el estudio.

III.- CRITERIOS DE ELIMINACION:

- a) Se descartaron aquellas muestras en las que no se obtuvo un rendimiento suficiente para llevar a cabo el análisis.
- b) Las muestras que al determinar el genotipo presente más de dos alelos del gen estudiado, en virtud de que esto indica contaminación de la muestra.

VARIABLE

La variable determinada en el estudio es de tipo cualitativa nominal.

METODOLOGIA.

I. RECOLECCION DE LAS MUESTRAS.

- 1.- Las muestras con sangre periférica se tomaron en un tubo con anticoagulante EDTA.
- 2.- A las muestras de saliva se les adicionó una vez su volumen de etanol absoluto y se trabajaron al siguiente día después de su recolección.
- 3.- Las muestras de semen se colocaron sobre una gasa estéril, se dejan secar y se guardan en refrigeración.

II. EXTRACCION DEL MATERIAL GENETICO (ADN).

Dependiendo del tipo de muestra se aplicó la técnica adecuada para la extracción del ADN.

Para las muestras de tipo sanguíneo se aplicó la Técnica de "LIFECODES" cuando el volumen de la muestra fue inferior a 2 ml. y cuando el volumen de la muestra fue mayor de 2 ml se aplicó la técnica de Sacarosa-Tritón. Ver anexo C.

Cuando la muestra fue saliva se aplicó la técnica de extracción de células epiteliales. Ver anexo C.

Para la extracción de Células espermáticas de semen se utilizó la técnica de CHELEX. Ver anexo C.

III. CUANTIFICACIÓN.

Para lograr un producto de amplificación óptimo es importante cuantificar el material genético y los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

Preparación del gel. (Ver anexo C).

Migración. (Ver anexo C).

Tinción. (Ver anexo C).

IV. AMPLIFICACION

Una vez que se determinó la cantidad adecuada de ADN necesaria se procedió a amplificar el fragmento de ADN llamado VNTR D1S80 por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ver anexo C).

V. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Para poder observar e identificar los alelos y por consiguiente los genotipos en cada una de las muestras, se siguió el siguiente procedimiento:

Montaje del molde para el gel. (Ver anexo C).

Preparación del gel. (Ver anexo C).

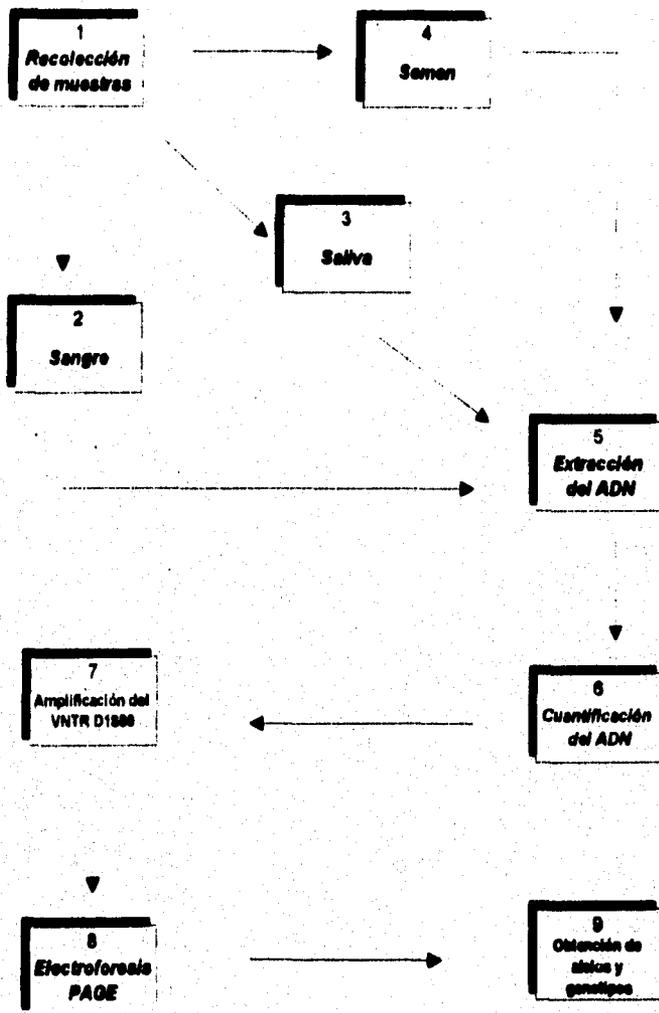
Preparación de la muestra para cargar el gel. (Ver anexo C).

Corrimiento del gel. (Ver anexo C).

Desamblaje. (Ver anexo C).

Tinción. (Ver anexo C).

DIAGRAMA DE FLUJO.
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.



RESULTADOS

Los resultados se presentarán en tablas y gráficas con el fin de facilitar la interpretación de los mismos y se analizarán de manera extensa y detallada, rescatando los aspectos más relevantes de cada uno de ellos en las conclusiones de la investigación.

Determinación de los alelos y genotipos.

Para determinar las bandas de amplificación del locus D1S80 sobre el gel y como consecuencia la visualización de los alelos y genotipos de cada una de las muestras, se aplicó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

Para poder asignar los alelos del sistema D1S80 en las muestras, se hizo uso de un control (ladder) que presenta un patrón de 27 alelos para el sistema D1S80 y a través de una comparación visual entre el ladder y cada uno de los productos de amplificación, se identifican los alelos y por consiguiente el genotipo que presenta cada una de ellas.

En la fig No. 17. Se observa el esquema y la fotografía del corrimiento del gel de poliacrilamida teñido con bromuro de etidio, en ella se puede observar la colocación del ladder y las muestras intercaladas numeradas del 1 al 6.

Hubo ocasiones que se observaron bandas "adicionales" a los productos de amplificación, pero estas bandas "extra" (bandas inespecíficas, ocasionadas por la formación de dímeros de los iniciadores o de productos heterogéneos), fueron siempre de baja nitidez y de peso molecular mucho más alto que el de los fragmentos amplificados de locus es decir, salían del intervalo de peso molecular que marca el ladder.

Cuando la cantidad de ADN fue superior a la indicada (2.5 a 10 μg / 20 μl) el proceso de amplificación se inhibe, observándose este fenómeno como una banda "nítida" al inicio del gel, exactamente sobre la zona de aplicación. Por otro lado cuando la cantidad de ADN fue inferior a la indicada, no se observaba la aparición de la banda correspondiente a lo largo del carril.

También se llegaron a observar algunas bandas más "nítidas" que otras, como una consecuencia de mayor concentración del producto amplificado.

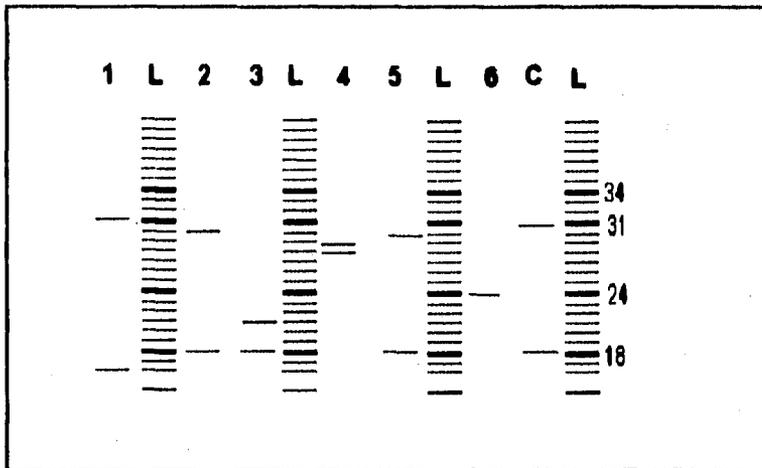
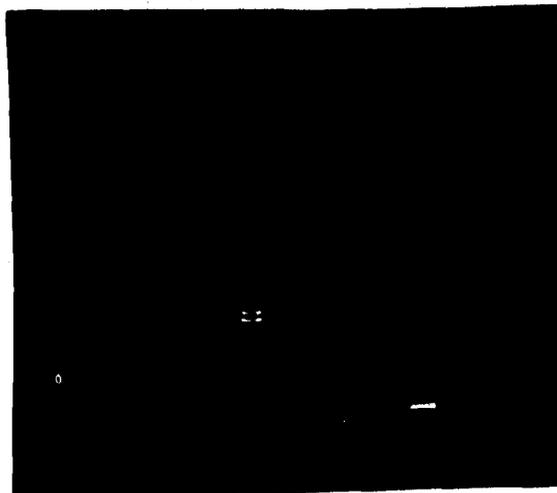


Fig. No. 17. Electroforesis en gel de poliacríamida después de la tinción con bromuro de etidio. El ladder (marcador de peso molecular "L") contiene 27 bandas (alelos). Cada banda representa un alelo, dos alelos conforman un genotipo, cuando los dos alelos son idénticos el genotipo se denomina homocigoto, cuando los alelos son diferentes el genotipo se denomina heterocigoto. Las bandas más oscuras representan a los alelos 18, 24, 31 y 34. El alelo más pequeño es el 14 y el más grande es el 41, el alelo 15 no se representa. La determinación de los genotipos de cada una de las muestras es a través de una comparación visual de la posición que ocupa cada una de las bandas con el ladder. C= Control positivo (18,31). La muestra 1 presenta el genotipo (18,24); la muestra 2 (18,30); la muestra 3 (18,21), la muestra 4 (28,29), la muestra 5 (18,30) y la muestra 6 (24,24).



El número de alelos que hasta la fecha han sido reportados en diversos estudios de poblaciones en el cromosoma 1 locus 80, han sido 29. (13,42,44, 45,70,71,72).

En la población de la zona metropolitana de la ciudad de México, únicamente se encontraron 18 alelos de los 29 alelos posibles reportados por la literatura.

En la tabla No. 1 se presentan estos alelos, el número de veces que fueron observados en la población (frecuencia). La frecuencia de cada uno de los alelos fue obtenida al aplicar el método de cuenta génica, la última columna en la tabla representa la frecuencia relativa, la cual se obtuvo al dividir el número de veces que se observó cada alelo entre el número de cromosomas analizados ($n=232$). Esta información se representa en forma gráfica en el gráfico No. 1, como puede verse en dicho gráfico existen 5 alelos predominantes en la población y son:

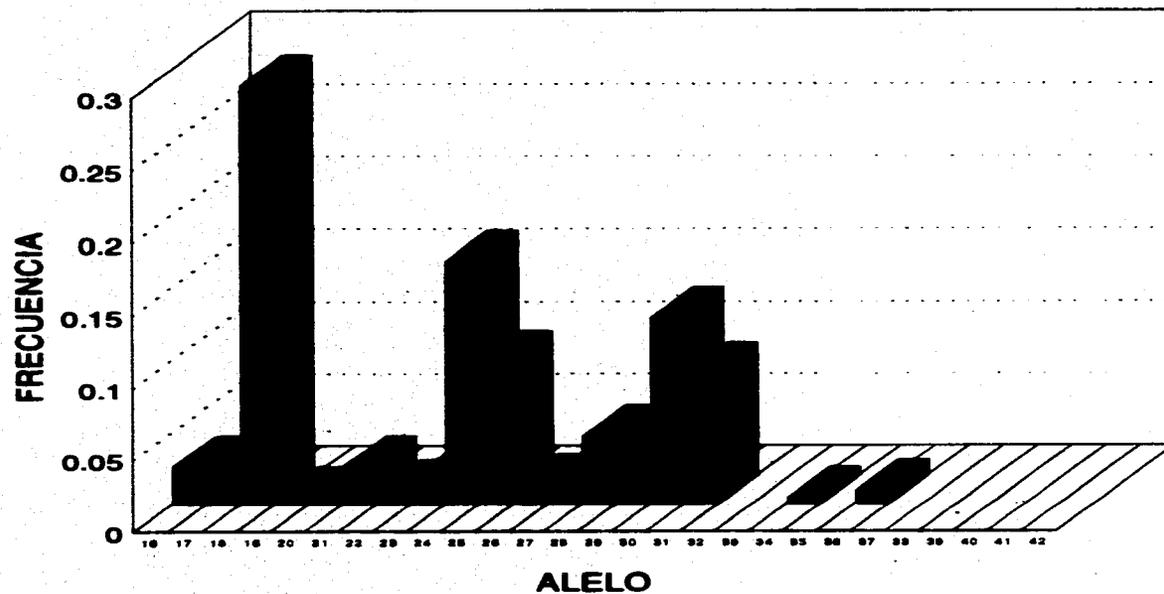
alelo 18	frecuencia relativa	0.289
alelo 24	frecuencia relativa	0.168
alelo 25	frecuencia relativa	0.099
alelo 30	frecuencia relativa	0.129
alelo 31	frecuencia relativa	0.091.

Los alelos 19,20 y 34 son los menos comunes en la población estudiada. Los alelos restantes representan frecuencias relativas entre 0.004 y 0.047. Nueve alelos no se graficaron debido a que no fueron observados y fueron: 14, 15,32,33,35,37,38, 40 y >41.

Teóricamente, cuando una población evoluciona, desde el punto de vista genético, significa que determinados alelos de los genes tienden a adquirir frecuencias mayores que otros. (73).

ALELOS^a	No. OBSERVADO	FRECUENCIA
16	6	0.026
17	4	0.017
18	67	0.289
19	1	0.004
20	2	0.009
21	6	0.026
22	2	0.009
23	1	0.004
24	39	0.168
25	23	0.099
26	3	0.013
27	4	0.017
28	11	0.047
29	9	0.039
30	30	0.129
31	21	0.091
34	1	0.004
36	2	0.009

Tabla No.1. Frecuencias alélicas del locus D1S80 (18 alelos) en 116 individuos no relacionados de la zona metropolitana de la Ciudad de México.
a) Nomenclatura del número de repeticiones.



Gráfica 1. Distribución de las frecuencias alélicas del locus D1S80 en una muestra de 116 individuos no relacionados de la zona metropolitana de la Ciudad de México.

En cada uno de sus cromosomas, cada individuo posee dos alelos uno aportado por su madre y el otro por su padre. La combinación de estos dos alelos conforman su genotipo en locus analizado. Cuando ambos padres aportan el mismo alelo, el genotipo es llamado homocigoto y cuando el par de alelos que aportan los padres es diferente se dice que el genotipo es heterocigoto.

En teoría las combinaciones de los 18 alelos observados darían un total de 171 genotipos; 153 heterocigotos y 18 homocigotos. Sin embargo en la población de la Ciudad de México únicamente se observaron 48 genotipos; 41 genotipos heterocigotos y 7 homocigotos. En la tabla No. 2 se presentan estos genotipos, así como el número de veces que se observaron, esta información fue graficada en el gráfico No. 2, en donde podemos observar la distribución de las frecuencias genotípicas del locus D1S80.

Los seis genotipos siguientes:

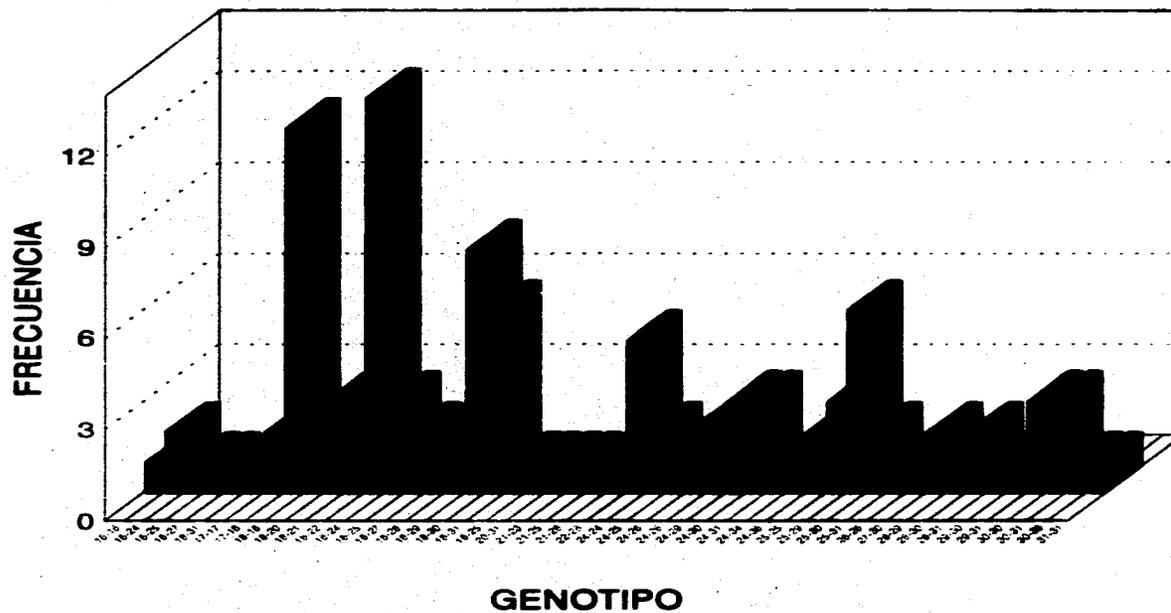
18,18	frecuencia relativa	0.103
18,24	frecuencia relativa	0.112
18,30	frecuencia relativa	0.069
18,31	frecuencia relativa	0.051
24,24	frecuencia relativa	0.043
25,30	frecuencia relativa	0.051

son combinaciones de los 5 alelos más predominantes (18,24,25,30 y 31) en la población y representan en conjunto el 42.9%.

GENOTIPO	NO.OBSERVADO
16,16	1
16,24	2
16,26	1
16,27	1
16,31	1
17,17	1
17,18	1
18,18	12
18,20	1
18,21	3
18,22	1
18,24	13
18,25	3
18,27	2
18,28	2
18,29	1
18,30	6
18,31	6
19,25	1
20,31	1
21,23	1
21,25	1
21,28	1
22,28	1

GENOTIPO	No.OBSERVADO
24,24	5
24,25	2
24,26	1
24,28	2
24,29	1
24,30	3
24,31	3
24,34	1
24,36	1
25,25	2
25,29	3
25,30	6
26,28	1
27,30	1
28,28	2
28,30	1
28,31	2
29,30	1
29,31	1
30,30	3
30,31	3
30,36	1
31,31	1
TOTAL	118 GENOTIPOS

Tabla No. 2. Frecuencias genotípicas del locus D1S80 48 genotipos de los 171 genotipos posibles en 118 individuos no relacionados de la zona metropolitana de la Ciudad de México.



GRAFICA 2. Distribución de las frecuencias genotípicas del locus D1S80 en una muestra de 116 individuos no relacionados de la zona metropolitana de la Ciudad de México.

El Dr Bruce Budowie profesor titular en la academia del FBI, ha publicado varios trabajos internacionales sobre el análisis estadístico de las frecuencias alélicas y genotípicas en el locus D1S80 (13,42,44,45), utilizando un método computarizado del que se obtienen resultados de tras pruebas estadísticas que permiten determinar si las frecuencias alélicas de la población se encuentran en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg. Debido a que el presente trabajo es el primer estudio piloto en este locus que se desarrolla en el país y dado que se han realizado trabajos conjuntos para otros loci, se recurrió a la experiencia del Dr. Budowie, quien gentilmente realizó al análisis estadístico del presente trabajo, lo cual nos permite comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de la zona metropolitana de la Ciudad de México con otras poblaciones Hispánicas estudiadas en E:U por el FBI. En el anexo D, se puede apreciar el reporte del análisis estadístico y los comentarios del Dr Budowie.

Para comprobar que los datos obtenidos de la población de la zona metropolitana están dentro del equilibrio Hardy-Wainberg, el Dr. Budowie maneja tres pruebas estadísticas, la prueba exacta (Fisher), la prueba de proporción o razón de probabilidad y la prueba de homocigocidad. (Tabla No. 3).

La distribución de las frecuencias genotípicas para la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México para el locus D1S80 no se desvía del equilibrio Hardy-Weinberg para la prueba de proporción o razón de probabilidad y la prueba exacta (Fisher), más poderosas que la prueba de homocigocidad. En la prueba de homocigocidad existe una desviación poco significativa ($p=0.044$).

PRUEBA EXACTA	PRUEBA DE HOMOCIGOCIDAD	PRUEBA DE PROPORCION DE PROBABILIDAD	G ESTADISTICA
0.205	0.044	0.395	0.019±0.004

Tabla No. 3. Resultados de las pruebas realizadas con los datos obtenidos de las frecuencias alélicas de 116 individuos no relacionados para comprobar que la muestra de la zona metropolitana de la Cd de México cumple con el equilibrio Hardy-Weinberg.

POBLACION	HOMOCIGOCIDAD OBSERVADA	HOMOCIGOCIDAD ESPERADA	HETEROCIGOCIDAD OBSERVADA	HETEROCIGOCIDAD ESPERADA
ZONA METROPOLITANA	21.6	14.9	78.4	85.1

Tabla No. 4. Porcentajes de homocigocidad y heterocigocidad observado y esperado en la muestra de la zona metropolitana de la Cd de México.

El locus D1S80 mostró una heterocigocidad del 78.4% y una homocigocidad del 21.6%, en la zona metropolitana de la Ciudad de México, mientras que la heterocigocidad esperada es del 85.1% y 14.9 % para la homocigocidad esperada. (Tabla No. 4)

Según el principio de Wahlund, "la frecuencia de homocigocidad en una población compuesta de diferentes subgrupos es mayor que la esperada de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg".(74). Esto pudiera ser la explicación del alto porcentaje de homocigotos en la población estudiada, a pesar de que el grupo de nuestra población se restringe a individuos que nacieron y que radican en la Ciudad de México, sus padres y ancestros provienen de diferentes estados de la República Mexicana (diferentes subgrupos). Esto concuerda con estudios previos con grupos Hispánicos radicados en E.U. en los que también se han encontrado un alto porcentaje de genotipos homocigotos para loci tipo VNTR. (74,75).

Para calcular el poder de discriminación (PD) del locus D1S80 en la muestra de la zona metropolitana de la Ciudad de México se utilizaron las frecuencias genotípicas observadas (Tabla No. 5). El poder de discriminación fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$PD=1-\sum P_i^2$$

donde $\sum P_i^2$ = a la sumatoria de los cuadrados de las frecuencias relativas de los diferentes genotipos encontrados.

El poder de discriminación es definido como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar puedan poseer diferentes genotipos para el marcador que ha sido probado en la población y que un valor alto de PD (0.96) indica un potencial de individualización grande por lo tanto

GENOTIPO ^a	FRECUENCIA (P _i)	(P _i) ²	GENOTIPO ^a	FRECUENCIA (P _i)	(P _i) ²
16,18	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	24,24	0.043	1.8 X 10 ⁻³
16,24	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴	24,25	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴
16,25	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	24,26	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
16,27	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	24,28	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴
16,31	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	24,29	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
17,17	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	24,30	0.026	6.7 X 10 ⁻⁴
17,18	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴	24,31	0.026	6.7 X 10 ⁻⁴
16,18	0.103	1.1 X 10 ⁻²	24,34	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
18,20	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	24,36	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
18,21	0.026	6.7 X 10 ⁻⁴	25,25	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴
18,22	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	25,29	0.026	6.7 X 10 ⁻⁴
18,24	0.112	1.3 X 10 ⁻²	25,30	0.051	2.7 X 10 ⁻³
18,25	0.026	6.7 X 10 ⁻⁴	25,31	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴
18,27	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴	26,26	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
16,26	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴	27,30	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
18,29	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	28,29	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴
18,30	0.069	4.8 X 10 ⁻³	28,30	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
18,31	0.051	2.7 X 10 ⁻³	28,31	0.017	2.9 X 10 ⁻⁴
19,25	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	29,30	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
20,31	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	29,31	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
21,23	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	30,30	0.026	6.7 X 10 ⁻⁴
21,25	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	30,31	0.026	6.7 X 10 ⁻⁴
21,26	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	30,36	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵
22,26	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵	31,31	0.009	8.1 X 10 ⁻⁵

$$\Sigma(P_i)^2 = 0.045$$

$$PD = 1 - 0.045 = 0.955 = 0.96$$

TABLE No. 6. Determinación de poder de exclusión del locus D1S80 en una muestra de la zona metropolitana de la Ciudad de México.
b) nomenclatura basada en el número de repeticiones en tándem.

una gran porción de la población puede ser excluida; concluyéndose que este marcador es una herramienta útil para el trabajo forense en la población de la Ciudad de México, sin embargo de los resultados obtenidos podemos apreciar una alta frecuencia de seis genotipos (pág 79) los cuales conforman el 42.9% en la población de la Ciudad de México; para el caso de que una muestra de tipo forense presente uno de estos genotipos se recomienda además el empleo de otro marcador genético, por el contrario cuando la muestra presenta un genotipo de baja frecuencia (0.009-0.026) tiene un valor de exclusión y/o inclusión mayor.

La probabilidad de coincidencia al azar (PCA) entre los genotipos de dos individuos para el marcador D1S80 (tabla N0. 6), se calculó con la siguiente fórmula:

$$PCA = q^2(2-q)$$

donde q= frecuencia alélica media.

El resultado de 6×10^{-3} nos indica que 6 individuos de 1000 habitantes de la Ciudad de México, tendrían el mismo genotipo para el marcador D1S80.

Al comparar la heterocigocidad observada en diferentes poblaciones radicadas en E.U.A. se puede observar que la representación de la población oriental presenta el más elevado porcentaje de heterocigotos (90.7 %) en orden decreciente le sigue la población afroamericana (13.0%), hispana del sur este (19.4 %). Hispano sur oeste (20.4), Ciudad de México y Caucásica (21.6%).. con esto. se observa que las combinaciones de los alelos para el locus D1S80 en la población Oriental proporcionan una diversidad de genotipos mayor que para las poblaciones restantes y por lo tanto este marcador en esta población proporciona un mayor grado de individualización. (tabla No. 7).

PROBABILIDAD DE COINCIDENCIA AL AZAR= 6×10^{-3}

Tabla No. 6. Probabilidad de coincidencia al Azar (PCA) entre los genotipos de dos individuos de la zona metropolitana de la Ciudad de México para el locus D1S80.

POBLACION	HOMOCIGOCIDAD OBSERVADA	HETEROCIGOCIDAD OBSERVADA
ZONA METROPOLITANA CD DE MEXICO	21.6	78.4
*HISPANO SUDESTE	19.4	80.6
*HISPANO SUDOESTE	20.4	79.6
*AFRICANO AMERICANA	13.0	87.0
*CAUCASICA	21.6	78.4
*ORIENTAL	9.3	90.7

Tabla No. 7. Comparación de la homocigocidad y heterocigocidad observada en el locus D1S80 en la muestra de la zona metropolitana de la Cd de México con otras poblaciones.
*Budowle et al (44).

Las frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México se contraponen con las frecuencias alélicas de 5 poblaciones (Hispanos del Sureste, Suroeste, Caucasicos, Orientales y Afroamericanos) para el VNTR D1S80 obtenidos por Budowle (44)(tabla No. 7). Los gráficos No. 3,4,5,6,7,Y 8 representan la información contenida en esta tabla.

Cabe mencionar que las poblaciones Hispanas abarcan individuos Americanos (argentinos, guatemaltecos, pueruanos,etc, incluyendo a mexicanos) y que dependiendo en la zona que habitan en E.U.A fueron clasificados como Hispanos del Sureste y Suroeste. La población blanca radicada en E.U.A. esta incluida dentro del tronco racial Caucásico; la Afroamericana engloba a los individuos descendientes de raza negra y que nacieron en el continente Americano y la población Oriental abarca a las personas que emigraron del continente Asiático y que radican en E.U.A.

FRECUENCIAS ALEICAS
(n=número de individuos tipificados).

Alelo	Muestra de la zona metropolitana (n=116)	*Hispanos del Sureste (n=247)	*Hispanos del Suroeste (n=162)	*Afroamericanos. (n=606)	*Caucásicos (n=718)	*Orientales (n=204)
14	----	----	----	----	----	----
15	----	----	0.003	----	----	----
16	0.026	0.004	0.019	0.002	0.001	0.034
17	0.017	0.012	0.003	0.026	0.002	0.025
18	0.269	0.225	0.222	0.073	0.237	0.152
19	0.004	0.004	0.006	0.003	0.003	0.022
20	0.009	0.010	0.019	0.032	0.016	0.007
21	0.026	0.030	0.025	0.115	0.021	0.034
22	0.009	0.026	0.019	0.061	0.036	0.017
23	0.004	0.014	---	0.014	0.012	0.017
24	0.166	0.316	0.315	0.234	0.376	0.230
25	0.069	0.059	0.093	0.045	0.046	0.027
26	0.013	0.006	0.006	0.006	0.020	----
27	0.017	0.012	0.022	0.006	0.007	0.047
28	0.049	0.061	0.074	0.130	0.063	0.076
29	0.039	0.076	0.019	0.053	0.052	0.042
30	0.129	0.016	0.019	0.009	0.006	0.123
31	0.091	0.051	0.056	0.054	0.072	0.093
32	----	0.006	0.003	0.007	0.006	0.012
33	----	0.004	0.003	0.004	0.003	0.005
34	0.004	0.006	0.003	0.066	0.001	0.005
35	----	----	----	0.002	0.003	0.005
36	0.009	0.014	0.06	0.001	0.004	0.005
37	----	0.006	----	----	0.001	0.007
38	----	----	----	----	----	----
39	----	0.002	0.006	0.003	0.003	0.005
40	----	----	----	----	----	----
41	----	----	0.006	0.002	----	0.007
>41	----	0.006	0.003	0.007	0.001	0.002

Tabla No. 6. Comparación de las frecuencias alélicas de la muestra de la zona metropolitana de la Cd. de México con las de poblaciones Hispánicas del Sureste, Suroeste, Afroamericana, Caucásica y Oriental.

a) todos los alelos mayores de 41 se colocaron en la clase >41.

* Budowle et. al (44).

En los gráficos No.3 y 4, se observa que las poblaciones Hispánicas presentan 23 alelos de los cuales 5 de ellos no se observaron en la población de la Ciudad de México y son los alelos 32,33,39,41 y >41.

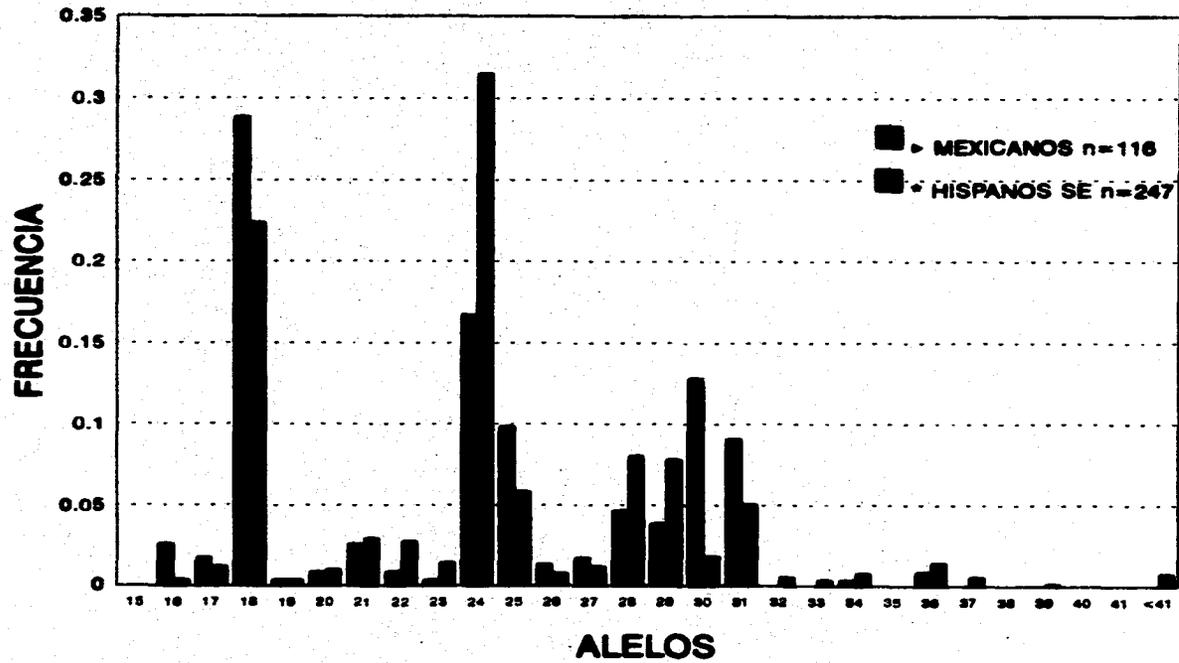
La población del Suroeste presenta el alelo 15 y 41 que no se encontró en las poblaciones del Sureste y de la Ciudad de México; sin embargo estas dos últimas poblaciones presentan el alelo 23 que no se presenta en la primera. El alelo 37 se presenta en la población del Sureste únicamente.

Puede observarse así mismo que en las tres poblaciones los alelos 18,24,25 y 31 se presentan con una elevada frecuencia además los alelos 14,35,38 y 40 no se observaron en las tres poblaciones.

En la población de la Ciudad de México el alelo 30 se encuentra en una mayor incidencia que en las poblaciones Hispánicas y que éstas a su vez presentan el alelo 25 y 28 con mayor frecuencia.

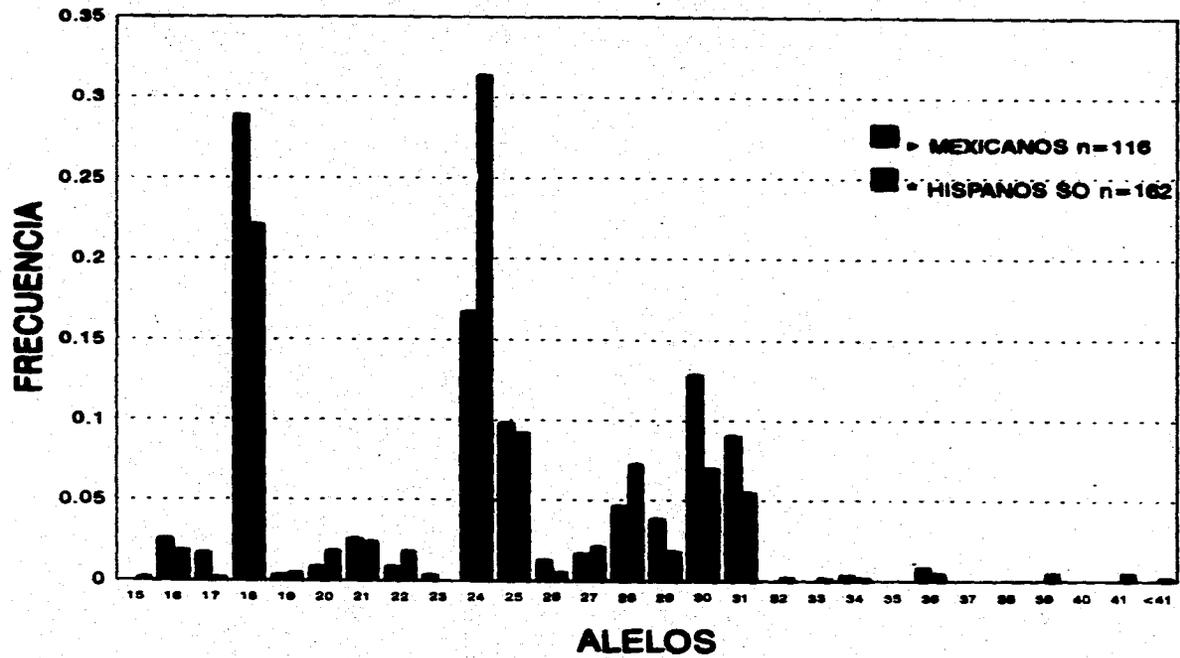
Debido a que no se han reportado investigaciones sobre las frecuencias alélicas y genotípicas en el VNTR D1S80 en la población mexicana y que existe un mayor grupo de mexicanos en la región del Suroeste, el Dr. Budowie realizó una tabla de contingencia de 2 x C de la prueba exacta para generar una prueba llamada G estadística (Tabla No. 2) para comprobar la homogeneidad entre la población de la Ciudad de México y la población Hispánica del Suroeste, en donde se esperaba que ambas poblaciones fueran similares, sin embargo estadísticamente son diferentes ($p=0.019$), esto puede deberse a diferencias

genéticas alelos que no se presentan en la población mexicana (15,32,33,39, 41 >41, a variación en el muestreo, es decir la población Hispana del Suroeste esta compuesta por una diversidad de individuos hispanos, lo que conduce a obtener una mayor diversidad alélica (24 alelos) en comparación con la población de la Ciudad de México (18 alelos), o bien al tamaño de la muestra (población mexicana $n=162$), es decir que posiblemente al incrementar el número de individuos en la población de la Ciudad de México podrían haberse incrementado el número de alelos presentes.



* B. Bustos • Saavedra G., Liceo P.

Gráfica 3. Comparación de frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México con Hispanos del sureste.



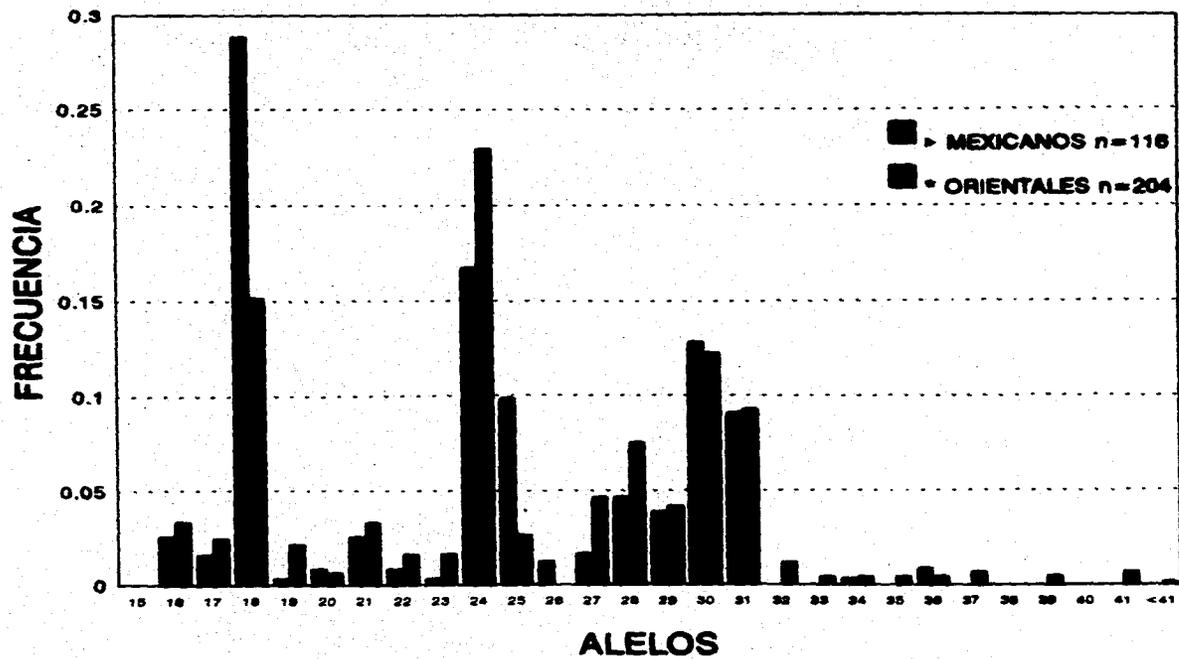
* B. Budowie • Saavedra G., Liceo R.
Gráfica 4. Comparación de frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México con Hispanos del suroeste.

En el gráfico No. 5. Se contraponen las frecuencias alélicas de la población de la Ciudad de México con la población Oriental.

La población Oriental presenta 24 alelos 7 de ellos (32,33,35,37,39,41 y 41) no se presentaron en la población de la Ciudad de México, sin embargo esta última población presenta el alelo 26 que no fué visualizado en la primer población.

En ambas poblaciones los alelos 14, 15, 38 y 40 estuvieron ausentes y los alelos 18, 24, 30 y 31 se presentan en elevada frecuencia en comparación con los alelos restantes, cabe hacer notar que el alelo 18 es más frecuente en la población de la Ciudad de México y el alelo 24 lo es en la población Oriental.

A pesar de que la población Oriental presenta una heterocigocidad elevada (90.7%) y por lo tanto una mayor variabilidad genética (24 alelos) en comparación con la población de la Ciudad de México (78.6% y 18 alelos respectivamente), estas dos poblaciones presentan una distribución de frecuencias similares; esta similitud puede ser una consecuencia de la migración realizada por los primeros pobladores asiáticos hacia nuestro continente por el estrecho de Bering, los cuales nos legaron parte de su información genética.



* B. Bustos • Sandoz G., Lora R.

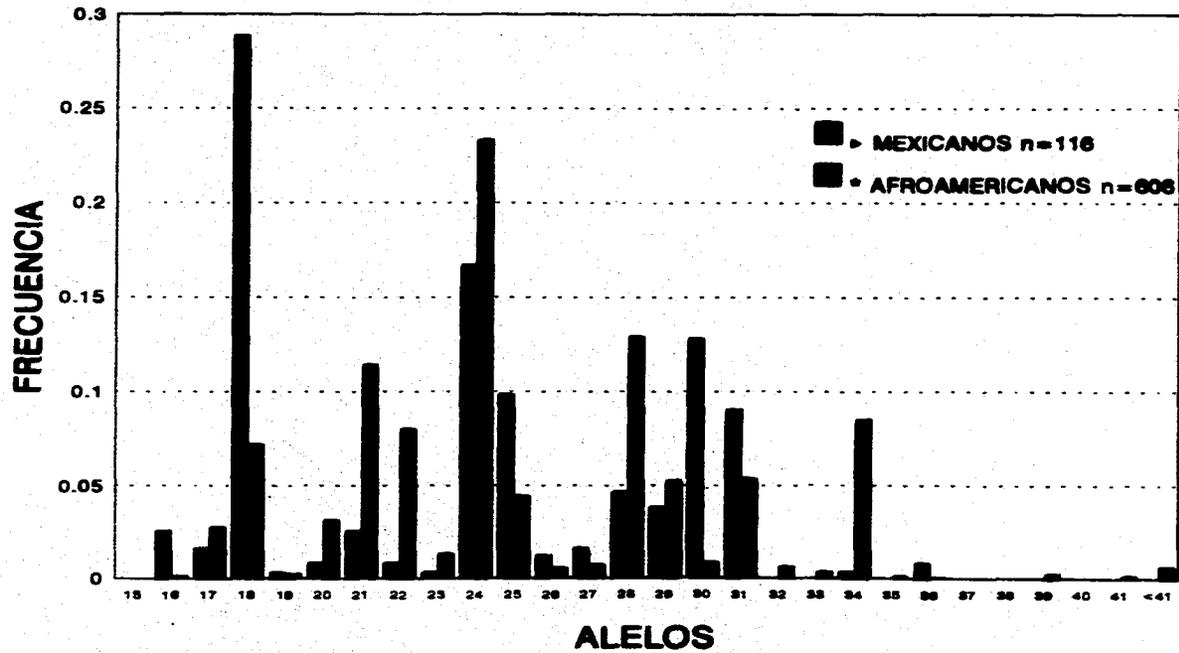
Gráfica 5. Comparación de frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México con Orientales.

En el gráfico No.6 se contraponen las frecuencias alélicas de la población de la Ciudad de México y la población Caucásica.

El número de individuos tipificados en la población Caucásica fue mayor (n=718); 7 veces más individuos que en la población de la Ciudad de México, es decir que si se incrementará el número de individuos en la población de la Ciudad de México posiblemente se presenten los 6 alelos "extra" (32,33,35,39 y >41) que presenta la población Caucásica.

Los alelos 15,38,40 y 41 están ausentes y los alelos 18, 30 y 31 se encuentran elevados en ambas poblaciones.

La población Caucásica mostró 6 alelos más que en la población de la Ciudad de México, sin embargo puede observarse en la tabla No. 7 que ambas poblaciones tienen una homocigocidad del 21%, este resultado puede ser explicado por la alta frecuencia de los que presentan los alelos 18,24,28 y 29 los cuales tienden a su vez a combinarse entre sí formando genotipos con una mayor incidencia con respecto a los alelos restantes en la población Caucásica y los alelos 18,24,25, 30 y 31 en la población de la Ciudad de México.



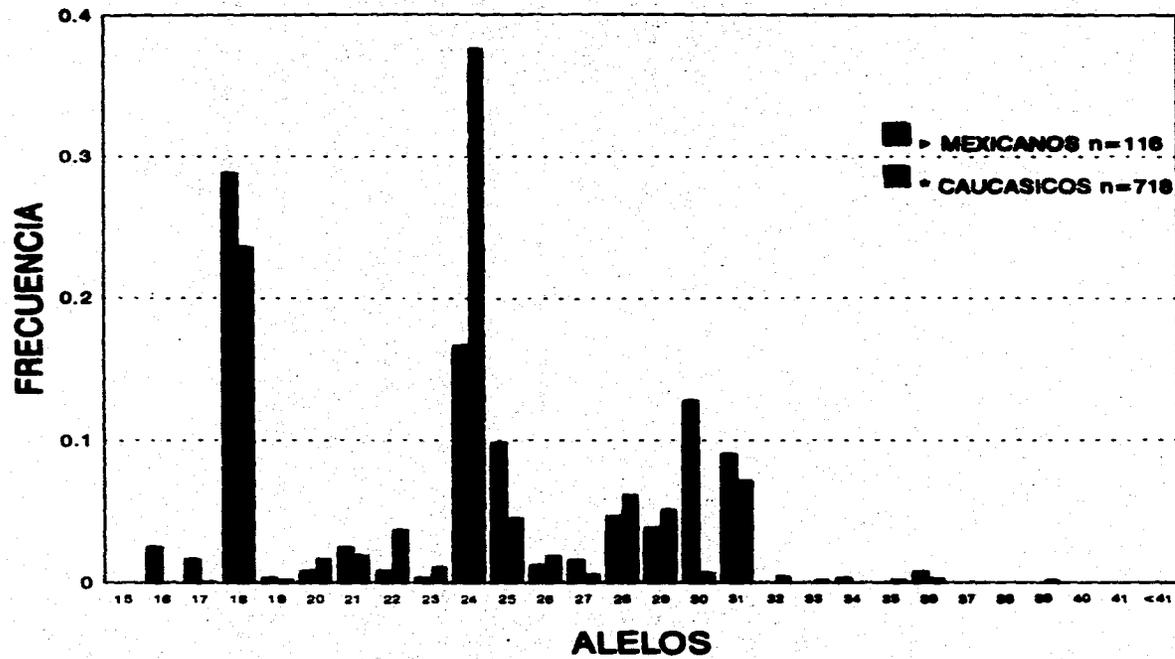
* S. Budowie • Saavedra G., Licea R.

Gráfica 6. Comparación de frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México con Afroamericanos.

Al contraponer las frecuencias alélicas de la Ciudad de México con la población Afroamericana podemos notar la ausencia de 4 alelos (15, 37, 38 y 40) (gráfico No. 7) y que los alelos 18, 24 y 31 presentan una alta frecuencia en las dos poblaciones.

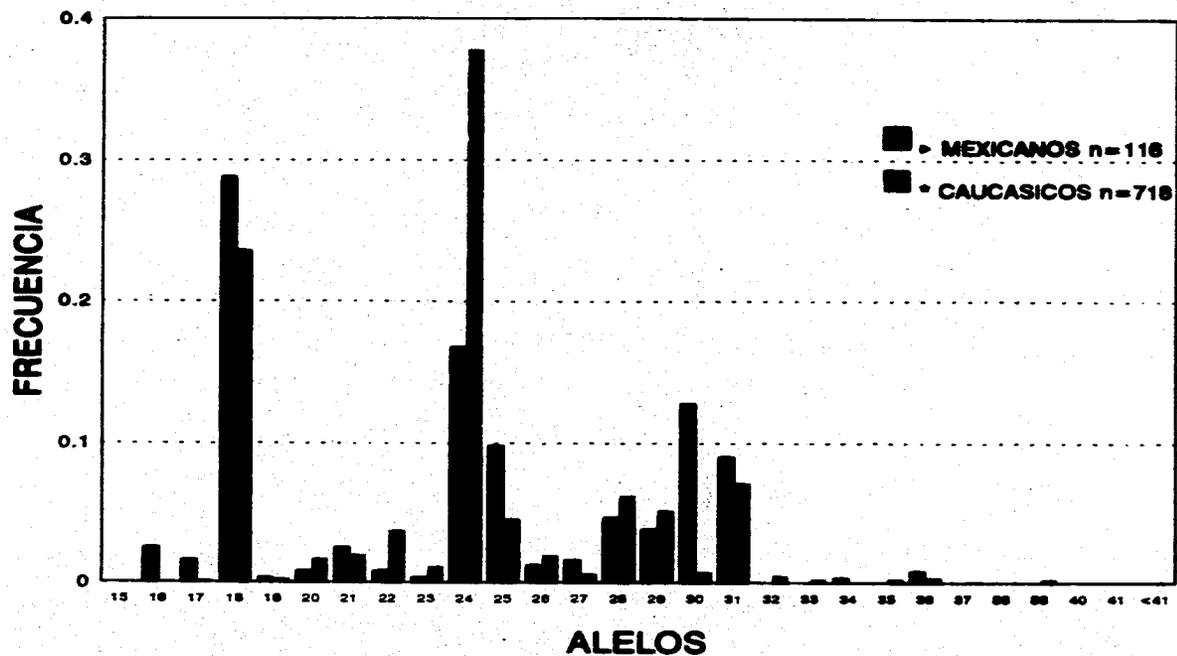
El número de individuos tipificados en la población afroamericana fué de 606 y en comparación con los 116 individuos tipificados en la población de la Ciudad de México, es decir existen 5 veces más individuos tipificados en la primer población por lo tanto, se esperaría que al incrementar nuestro número de muestra pudiesen aparecer algunos de los alelos "extra" (32,33,39,41 y >41) que no se observa en la población estudiada.

Los alelos 18,21,22,24,28 y 34 se encuentran más elevados en la población afroamericana y los alelos 18,24,25,30 y 31 en la Ciudad de México.



* B. Budowne + Saavedra G., Licea R.

Gráfica 7. Comparación de frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México con Caucásicos.



* B. Bustos - Saeedra G., Liceo P.

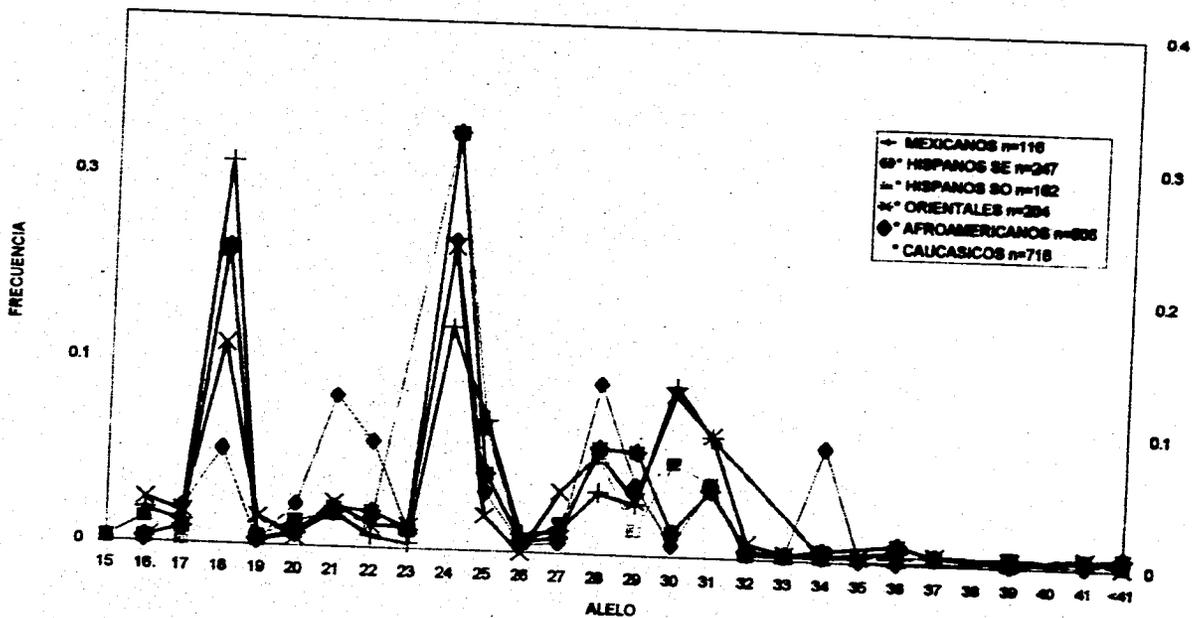
Gráfica 7. Comparación de frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México con Caucásicos.

En la gráfica No. 8. Se presenta el polígono de frecuencias alélicas de la población de la Ciudad de México y las poblaciones Caucásica, Afroamericana, Oriental e Hispanas del Sureste y del Suroeste.

En el polígono de frecuencias puede apreciarse con mayor facilidad la alta frecuencia de los alelos 18 y 24 en las seis poblaciones. La existencia de una alta frecuencia de éstos alelos no solamente en estas poblaciones sino en otras como la Italiana, Filandesa, Brasileña ect; indica una antigüedad evolucionaria del polimorfismo de este locus, lo cual sugiere que estos son alelos ancestrales y que probablemente precedieron a la dispersión geográfica humana, además los alelos restantes pueden ser el resultado de subsecuentes mutaciones en este locus.

Los alelos 14,38 y 40 no se observaron en ninguna de las seis poblaciones.

Asimismo puede apreciarse "picos" de frecuencia alélica representativos de cada población como lo son: el alelo 24 en la población Caucásica; los alelos 18, 25 y 30 en la población de la Ciudad de México; los alelos 20, 21, 22, 28 y 34 en la población Afroamericana, los alelos 16,27 y 31 en la población Oriental. El alelo 29 en la población Hispana del Suroeste y el alelo 15 en la población Hispana del Sureste.



* B. Bustos, Sandoval C., Lina R.

Gráfica 8. Polígono de frecuencias de 116 individuos no relacionados de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México y cinco diferentes poblaciones radicadas en los Estados Unidos.

CONCLUSIONES

a) Independientemente del tipo de muestra (sangre, saliva o semen) y de los protocolos de extracción, la cantidad mínima de ADN, necesaria para poder determinar los alelos y genotipos en el locus D1S80, es la misma a la reportada por Budowle 1991, siendo la cantidad viable a utilizar para los estudios de identificación en individuos de la población metropolitana de la Ciudad de México.

b) La aplicación de las técnicas de amplificación del fragmento de longitud (AMP-FLP) junto con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y tinción de bromuro de etidio, son relativamente simples, baratas, rápidas y no requieren el uso de radioisótopos, con las que se obtuvo experiencia para la tipificación de material biológico como rutina en análisis de casos forenses con el marcador D1S80.

c) La distribución de las frecuencias alélicas de la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México en el locus D1S80, se encuentra en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg.

d) Los datos sobre la distribución de las frecuencias alélicas en la zona metropolitana de la Ciudad de México formaran parte del banco de datos para el marcador D1S80, el cual se realiza con la finalidad de determinar con exactitud cuantos individuos en nuestra población pueden compartir el mismo perfil genético.

e) La distribución de las frecuencias alélicas de la población de la Ciudad de México y 5 poblaciones radicadas en E.U.A. en el locus D1S80 son diferentes. Estas diferencias traducidas en variabilidad genética, probablemente son

tamaño de muestra y por otro lado, a los flujos migratorios que se han presentado en las últimas décadas hacia el país del Norte.

f) La existencia de una alta frecuencia de los alelos 18 y 24 en las poblaciones en donde se ha estudiado el VNTR D1S80, indica que probablemente estos alelos son ancestrales y que precedieron a la dispersión geográfica humana

g) La variabilidad genética que presenta el marcador D1S80 en la zona metropolitana de la Ciudad de México con respecto a marcador HLA DQA1a es mayor puesto que el primero presenta 18 alelos que en combinación generan 48 genotipos y el segundo únicamente presenta 6 alelos que en combinación generan 21 genotipos.

h) El poder de discriminación del locus D1S80 en la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México es de 0.96, por lo que se concluye que este marcador es útil para el trabajo forense con propósitos de identificación y exclusión de paternidad.

i) La probabilidad de coincidencia al azar (PCA) en este estudio fue de 6×10^{-6} e indica que al utilizar este marcador alrededor de 6 individuos tomados al azar en 1000 habitantes pueden tener el mismo genotipo, sin embargo para propósitos de identificación un solo marcador no es suficiente por lo cual es necesario incrementar el número de marcadores genéticos con la finalidad de que la probabilidad de coincidencia al azar entre dos individuos de nuestra población sea menor.

SUGERENCIAS:

La separación física de las áreas de trabajo para las diferentes etapas del análisis, junto con un cuidadoso manejo de las muestras y control de calidad nos parecen ser las precauciones más adecuadas en contra de la contaminación y posteriores malas interpretaciones.

Se recomienda incrementar la población de estudio, tomar muestra de individuos de todos los estados y considerar a los diferentes grupos étnicos de la República Mexicana con el fin de disponer de un banco de datos representativo del país para propósitos de identificación y establecimiento de parentesco.

Analizar, en combinación con el locus D1S80, PM y HLA, otras regiones hipervariables del genoma, clasificadas como VNTR y STR (cortas repeticiones en tandem, los más abundantes son los di- tetranucleótidos) con objeto de incrementar el grado de individualización en los procesos de identificación que se realizan en el área forense.

Con el fin de abatir costos de análisis, se sugiere construir un marcador de peso molecular ("ladder") en el laboratorio con los alelos amplificados de la población en estudio como lo recomienda Sajantila (51).

**ANEXO A.
MATERIAL Y REACTIVOS**

KITS

Kit AmpliFLP™ D1S80 PCR Amplification. Perkin Elmer

El kit contiene:

- a) Mezcla de reacción PCR AmpliFLP™ D1S80 (1.1 ml) primers D1S80, AmpliTaq ADN polimerasa, dATP, dGTP, dCTP y dTTP en solución de buffer y sal.
- b) Solución de MgCl₂ 5mM. (1.5 ml). MgCl₂ 5 mM en agua esterilizada y ultrafiltrada.
- c) Aceite mineral. (5 ml).
- d) Control de ADN. (0.2 ml).
- e) Ladder alélico AmpliFLP™ D1S80. (0.2 ml).

Gene Amp™ Detection Gel High Resolution Gel Concentrate. Perkin Elmer

Gene Amp™ detection gel Loading Buffer. Perkin-Elmer

REACTIVOS

Agua destilada o desionizada (esterilizada). Merck

Persulfato de amonio. Sigma

Acido bórico. Sigma

Acido dietilendiamino tetracético(EDTA). Sigma

Hidróxido de sodio. Sigma

TEMED. Sigma

TRIS Base (Trizma base). Sigma

Bromuro de Etidio. Gibco BRL

Cloruro de magnesio. Sigma

Cloruro de sodio. Sigma

Triton X-100. Sigma

Acido clorhídrico. Merck

Chelex. Gibco BRL

Ditiotreito (DTT). Sigma
Etanol 95%. Merck
Agarosa. Sigma
Duodecil sulfato de sodio. Sigma
Azul de bromofenol. Gibco BRL
Buffer de lisis celular. Gibco BRL
Buffer de lisis de proteínas. Gibco BRL

EQUIPO

Autoclave.
Balanza analítica. Sartorius
Hibridizador Techne
Horno de microondas
Microcentrífuga con control de temperatura. Baxter
Gradillas para microtubos.
Potenciómetro con electrodo de calomel y buffer de referencia. Fisher scientific
Refrigerador. Friatic
Congelador. Friatic
Eagle eye. Stratagene
Vortex (agitador). Baxter
Mechero Bunsen.
Cronómetro.
Parrilla eléctrica.
Microtubos de pared delgada
Termociclador 480. Perkin Elmer
Sistemas de verificación de temperatura para termociclador modelo 480. Perkin Elmer.
Agitador orbital.
Aparato de electroforesis vertical (para geles de 15 X 17cm). Gibco BRL
Placas de vidrio para electroforesis.

Juego de espaciadores (1.5 mm de espesor). Gibco BRL
Peines con 20 dientes de teflón de 1.5 mm de espesor. Gibco BRL
Fuente de poder. Gibco BRL
Sujeta papeles grande.(pinzas)
Tubos de 50 ml con tapa. Falcon
Puntas para micropipeta para dispensar volúmenes de 10 μ l, 20 μ l y 100 μ l con filtro hidrofóbico,estériles.
Micropipetas para dispensar volúmenes de 1-20 μ l,20-200 μ l,200-1000 μ l.
Bulbos estériles.
Baño seco con control de temperatura.
Parrilla con agitación magnética y calentamiento integrado.
Bloque para baño seco de aluminio
Espátula de acero inoxidable.
Vasos de precipitado de 100,500 1000 ml. Pyrex
Matraz Elenmeyer de 100,250 ml. Pyrex
Pipetas Pasteur. Pyrex.
Pipetas graduadas 5 y 10 ml. Pyrex
Probetas de 10 y 25 ml. Nalgene
Matraces volumétricos 1000 y 2000 ml. Pyrex
Placas de microlitulación.
Barra magnética.
Guantes.
Parafilm.
Marcador de tinta permanente.
Masking tape.
Cinta canela.

ANEXO B.

PREPARACION DE SOLUCIONES

Agarosa al 0.8 % P/V (cuantificación de ADN genómico).

Pesar 0.8 g de agarosa grado electroforesis y adicionar 100 ml de TAE 1X. Colocar en el horno de microondas hasta que los cristales desaparezcan, agregar agua desionizada para completar el volumen original.

Azul de bromofenol

Disolver 0.1 g de azul de bromofenol en 23.75 ml de H₂O desionizada, agitar y adicionar 1 ml de Tris-HCl 1M (pH 8), 0.25 ml de EDTA 0.5M y 25 ml de glicerol. Mezclar vigorosamente.

Bromuro de etidio:

Solución 1000X (0.5mg/ml)

Adicionar 50 mg de bromuro de etidio en 80 ml de H₂O. Aforar a 100 ml y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Solución de trabajo (0.5µg/ml).

Hacer una dilución de la solución anterior 1:1000. (Para teñir los geles).

Bufer de lisis nuclear

Concentración final.

1.21 g TRIS base	(10mM)
23.4 g de NaCl	(400mM)
0.75 g de Na ₂ EDTA	(2mM).

Disolver los reactivos anteriores en aproximadamente 800 ml de agua desionizada en un vaso de precipitado de un litro. Ajuste el pH a 8.2 utilizando

HCl 6N. Afore a un litro con agua desionizada y mezcle vigorosamente. La solución es estable por 6 meses a temperatura ambiente.

Buffer TAE

Solución 50X pH 8.5

Disolver 242.2 g Tris base en 400 ml de H₂O destilada, 200ml de EDTA 0.5 M y 57.1 ml de ácido acético gracial. Ajustar el pH a 8.0 y aforar a un litro.

Solución de trabajo 1X:

Diluir la solución anterior 1:50 con agua desionizada.

Buffer TBE 10X (890 mM TRIS, 890 mM ácido bórico, 20 mM EDTA (1L))

A 40ml. de 0.5M EDTA, pH 8.0, adicionar aproximadamente 900 ml. de H₂O destilada. Adicione 108 gr. de Tris base y 55gr. de ácido bórico para diluir la solución de EDTA. Agitar vigorosamente con una barra magnética. Ajustar el volumen a un litro con H₂O desionizada. Filtrar la mezcla utilizando un filtro Nalgene de 0.2 a 0.4 μ m para remover las partículas sólidas y prevenir la formación de un precipitado. Almacenar en un contenedor de vidrio para facilitar la inspección visual del precipitado. Si se observa un precipitado blanco, el buffer deberá desecharse.

Buffer de corrimiento de electroforético 0.5X TBE [44.5 mM Tris borato, 1mM EDTA (1L)].

Adicionar 50 ml de TBE a 950 ml H₂O destilada, mezclar vigorosamente.

Buffer TE

1.0 ml de Tris 1M

0.02 ml de 0.5 M de EDTA

Adicionar los reactivos anteriores y aforar a 100ml con agua desionizada.

Ditiotreitol (DTT)

Disolver 15.45 gramos de ditiotreitol en 100 ml de agua desionizada.

Almacenar a -20°C

Duodecil sulfato de sodio al 20 %.

Disolver 200 g de duodecil sulfato de sodio grado electroforesis en aproximadamente 800ml de agua desionizada en un vaso de precipitado de un litro. Calentar si es necesario a 37°C en baño maría para disolver completamente el duodecil sulfato de sodio en la solución. Aforar a un litro, mezclar vigorosamente. La solución es estable por 6 meses a temperatura ambiente.

EDTA 0.5M pH 8

Disolver 186.1g de Na₂EDTA en aproximadamente 500 ml de agua desionizada en un vaso de pp de 1 litro ajustar a pH de 8. Aforar a 1 litro y mezclar vigorosamente. Esterilizar en autoclave. La solución es estable por un año a 4°C.

Etanol 70%

Agregar 736.84 ml de Etanol al 95% y aforar a un litro. Almacenar a 20°C.

Persulfato de amonio al 10% (P/V).

Adicionar 0.1 gr. de APS por cada 1.0 ml. de H₂O. Mezclar vigorosamente la solución (APS) la cual deberá ser almacenada en un contenedor con tapa de 2 a 8°C.

Proteinasa K (5mg/ml).

Adicionar 10 ml de agua desionizada a un frasco de 100 mg de proteinasa K y agitar vigorosamente para disolver. Transferir a una frasco de 25 ml y adicionar 10 ml más de agua desionizada. Almacenar en alícuotas de 500µl en tubos para microcentrifuga y almacenar a -20°C. La enzima es estable por 6 meses.

Sacarosa-Tritón 2X

	Concentración final
219 g de sacarosa	(0.84M)
2.42 g de TRIS base	(0.02M)

2.03 g de $MgCl_2$ (0.01M)
20 ml de Tritón X-100 (2%).

Disolver los reactivos anteriores en aproximadamente 500 ml de agua desionizada en un vaso de precipitado de un litro. Ajustar el pH a 7.6 utilizando HCl 6N. Aforar a un litro con agua desionizada y mezclar. La solución es estable por tres meses a 4°C.

Sacarosa-Tritón 1X

Hacer una dilución de la solución anterior 1:1 con agua desionizada.

Solución saturada de Cloruro de Sodio.

Adicionar 350 gramos de NaCl a un matraz de un litro, disolver con agua. Agitar para disolver tanto como cloruro de sodio sea posible. Una solución saturada de cloruro de sodio formará un precipitado de la sal. Almacenar a temperatura ambiente

TRIS 1 M pH 8

Disolver el tris base en aproximadamente 500 ml de agua desionizada en un vaso de precipitado de 1 litro. Ajustar el pH a 8 utilizando aproximadamente 70ml de ácido clorhídrico 6N. Aforar a 1 litro con agua desionizada y mezclar. La solución es estable por seis meses a 4°C.

TRIS-HCl 1M, pH 8 (1L).

Disolver 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH 8.0(± 0.2) a temperatura ambiente adicionando 45 ml de HCl concentrado. Ajustar en volumen final a 1L con agua desionizada y mezclar vigorosamente. La solución deberá filtrarse con un filtro de poro de 0.2µm.

ANEXO C.

II.-EXTRACCION.

Técnica de LIFECODES (1 ml de sangre total)

Nota: Todos los reactivos permanecieron a 4°C durante su uso.

1.- En un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml se agregó 1.0ml de sangre total bien mezclada y centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, una vez terminado el tiempo de centrifugación cuidadosamente se removió el plasma (fase superior).

Nota: Un control se procesó junto con las muestras.

2.- Posteriormente se adicionó 1.0 ml. de Buffer de lisis celular a la fase inferior obtenida en la etapa anterior, se tapó y se agitó en vortex por 1 minuto.

3.- A continuación se colocó en tubo de microcentrifuga y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. Por decantación se eliminó el sobrenante sin mover el botón (o pellet) y se colocó cada tubo boca abajo sobre una superficie absorbente (papel).

4.- Se repitieron las etapas 2 y 3 dos veces más.

5.- Después se adicionó 1.0 ml de Buffer de lisis de proteínas y se agitó con vortex a alta velocidad para resuspender la pastilla (pellet), se centrifugó a 2100 rpm por 5 minutos a 4°C y se eliminó por decantación el sobrenadante.

6.- Se colocaron las muestras sobre hielo.

Nota: Se preparó la siguiente mezcla de reacción antes de utilizarla. Preparando un volumen total para todas las muestras más una alícuota extra para compensar el error de pipeteo.

Nota: La proteinasa K se colocó en hielo todo el tiempo.

7.- Se preparó la mezcla de reacción con 225 μ l de buffer de lisis de proteínas y 25 μ l de proteinasa K por cada muestra se agitó y se mezcló bien.

8.- Se adicionó 250 μ l de mezcla de reacción a cada muestra y con la punta de la pipeta se subió y bajó el líquido para resuspender la pastilla o pellet posteriormente se colocó el tubo en el bloque de calentamiento a 56°C.

9.- Después de que el último tubo se colocó en el bloque de calentamiento, se incubaron por dos horas y aproximadamente cada 15 ó 20 minutos se agitó en el vortex para resuspender el pellet o pastilla.

Nota: El pellet nuclear se resuspendió completamente para obtener mejor rendimiento.

10.- Se colocó el tubo conteniendo las muestras en el vortex por 30 segundos y se agitó vigorosamente después de la incubación.

11.- Se centrifugó el tubo por 2 minutos a 5000 rpm, posteriormente se prosigue con el proceso de amplificación.

Note: La calidad de las muestras permanecerán por más de un año si se guardan a 4°C.

Técnica de Sacarosa-tritón (5 ml de sangre total).

1.- Se tomaron 5 ml de sangre con 0.5 ml de anticoagulante EDTA 0.5 M, la muestra sanguínea se colocó en un tubo falcon de 50 ml y se ponen sobre hielo.

2.- A continuación se adicionó 12.5 ml de solución sacarosa tritón 2X, 7.5 ml. de agua destilada estéril y mezclar.

3.- Posteriormente se centrifugó a 2100 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y el pellet nuclear se lavó con 5 ml de solución de sacarosa tritón 1X. Este procedimiento se repitió hasta que el pellet quedo completamente blanco.

4.- Una vez que se obtuvo el pellet limpio (sin hemoglobina) se adicionó 1.5 ml de buffer de lisis nuclear, 54 µl de SDS al 20 % y 50 µl de proteinasa K.

5.- El tubo se colocó en un baño de agua a 56°C y se incubó por lo menos 2 hrs o bien dejarse toda la noche en la estufa a 37°C.

6.- A continuación al tubo se adiciono 0.5 ml. de solución saturada de NaCl, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó a 2100 rpm durante 15 minutos.

7.- El sobrenadante se colocó en un tubo limpio estéril de 15 ml y se adicionó dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente por inversión se mezcló hasta que el ADN precipitó.

8.- Con una pipeta pasteur con punta sellada se enrolló el ADN , esta punta se sumergió en un microtubo de 1.5 ml con etanol frío al 70%, se lavó suavemente el ADN moviendo la pipeta por lo menos 30 segundos, y se retiró del etanol para dejar secar completamente al ADN a temperatura ambiente.

9.- Se transfirió el ADN seco a tubos pequeños con 200µl de buffer TE pH 8.

10.- Este ADN genómico se disolvió a 55 °C durante 3 hrs o bien a temperatura ambiente toda la noche.

NOTA: El ADN genómico se guarda en refrigeración o bien se puede continuar con el proceso de amplificación.

Extracción de ADN de células espermáticas.

1.- En un micro tubo de 1.5 ml con 200 µl de Chelex al 5% se colocaron 3 µl de semen.

2.- Se adicionó 2 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y 7 µl de DTT 1 M, por inversión se mezcló suavemente y se incubó a 56°C por 30 a 60 minutos.

3.- Una vez terminado el tiempo de incubación se agitó el tubo con la muestra en el vortex de 5 a 10 segundos a alta velocidad y se centrifugó a 5 000 rpm durante 5 ó 10 segundos y se incubó a 100°C por 8 minutos.

4.- A continuación se agitó vigorosamente la muestra en el vortex durante 5 a 10 segundos a alta velocidad y se centrifugó de 2 a 3 minutos a 5 000 rpm.

NOTA: La muestra ahora esta lista para el proceso de amplificación. Se recomienda utilizar 20 µl del sobrenadante para la técnica de PCR y almacenar las muestras de 2 a 8 °C. Para reutilizarse repita la etapa 4

Extracción de ADN de células epiteliales obtenidas de saliva.

1.- Se colocaron aproximadamente 2 ml de saliva en un tubo falcon estéril y se adicionó dos veces el volumen de etanol al 96%.

2.- Al día siguiente se centrifugó el tubo a 2100 rpm por cinco minutos y decantó el sobrenadante después se adicionó 0.5 ml de Buffer de digestión, 12 µl de proteinasa K (10mg/ml) y 15 µl de DTT y se incubó a 56°C por dos horas, durante este lapso se agitó vigorosamente cada 15 o 20 minutos.

3.- Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifugó a 2100 rpm durante 5 minutos y con mucho cuidado se separó el sobrenadante y se colocó en un tubo estéril limpio de 1.5 ml y se desechó el pellet.

4.- Posteriormente se agregó el mismo volumen de etanol absoluto frío al que se obtuvo en la etapa anterior y se invirtió el tubo varias veces a continuación se congeló por 30 minutos.

5.- Una vez transcurrido el tiempo de congelación se centrifugó el tubo a 2100 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación sin perder el pellet y se colocó el tubo boca abajo sobre una superficie absorbente (papel) para quitar el exceso de etanol absoluto.

6.- Después se lavó el pellet con 1.5 ml etanol al 70% a temperatura ambiente, se centrifugó a 2100 rpm durante 15 minutos y se decantó el etanol.

7.- A continuación se colocó la muestra en el hibridizador a 56°C hasta que el etanol se evaporó completamente y se adicionó 200 µl de buffer TE pH 8.

8.- Se dejó que la muestra se disolviera toda la noche a 37°C.

NOTA:- La muestra está lista para el proceso de amplificación.

III. CUANTIFICACION DEL ADN DE LAS MUESTRAS.

Preparación del gel.

1.- Se preparó el buffer TAE necesario para la preparación del gel y el llenado de la cámara de electroforesis horizontal u submarina. (ver apéndice).

2.- Se limpió el molde para el gel con agua y detergente, posteriormente se enjuagó con suficiente agua y se dejó secar perfectamente.

3.- Una vez que se limpió el molde se sellaron los extremos del molde con masking tape perfectamente y se colocó el molde sobre una superficie horizontal a fin de que el grosor del gel fuera constante 1.5 mm y colocar el peine sobre el molde.

4.- Se preparó un gel de agarosa al 0.8% (ver apéndice) y una vez disuelta la agarosa, se dejó enfriar antes de vaciarla en el molde para evitar la formación de burbujas y se esperó que el gel solidificara para retirar el peine, después se quitó con cuidado los extremos de maskig-tape.

5.- Se colocó el molde en la cámara de electroforesis.

Migración.

- 1.- Sobre una placa de microtitulación se colocaron 3 μ l de azul de bromofenol y 7 μ l de ADN genómico por cada muestra y se mezclaron ambos componentes.
- 2.- Con una micropipeta se depositó la mezcla anterior dentro del orificio del gel de manera que la punta de la pipeta quedara en forma vertical y al vaciar el contenido se trató de no introducir aire y de no perforar el gel.
- 3.- En una placa de microtitulación se colocaron 3 μ l de azul de bromofenol y 2 μ l de estándares de ADN de 5, 10, 50, 100 y 200 μ g, se mezclaron y se depositaron en el gel.
- 4.- Una vez que se colocaron las muestras, se conectó la cámara a la fuente de poder y se comenzó la migración a 60 V hasta que las muestras entraron en el gel, después se aumentó el voltaje a 100 V.
- 5.- La electroforesis se detuvo una vez que el segundo colorante del azul de bromofenol, llegó hasta 2 cm de la parte terminal del gel.

Tinción

- 1.- Al finalizar la migración, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio (2 μ g/ μ l) durante 5 min con agitación en el orbital a 50 rpm, se retiró y se enjuagó varias veces para quitar el exceso de bromuro de etidio.
- 2.- Se observó en el transiluminador de luz UV, y la cantidad de ADN obtenida de cada una de las extracciones se determinó por comparación con los estándares de concentración conocida.

IV. AMPLIFICACION POR PCR.

El siguiente protocolo detalla el proceso de amplificación por PCR

1.- Se programó el termociclador para 32 ciclos de amplificación.

Cada ciclo de amplificación constó de una etapa de desnaturalización a 94°C por 60 segundos, una etapa de alineación a 65°C por 60 segundos, una etapa de elongación a 72°C por 60 segundos, terminados los 32 ciclos de amplificación se dió un tiempo extra de 10 minutos a 72°C.

2.- Se determinó el número de muestras para amplificarse incluyendo controles positivos y negativos y se etiquetaron los tubos requeridos.

3.- Se dispensó en cada tubo 20 µl de la mezcla de reacción, 10 µl de solución de cloruro de magnesio 5 mM y se centrifugaron para que todo el líquido quede en la parte inferior.

NOTA: Es importante que todas las soluciones se mezclen no más de 30 minutos antes de empezar el proceso de amplificación, esto es con la finalidad de minimizar la formación de dímeros de primer u otros productos no específicos

4.- Posteriormente se adicionó una gota de aceite mineral a los tubos de reacción.

5.- Se dispensó la cantidad de ADN genómico requerido en cada uno de los tubos con mezcla de reacción de la siguiente forma:

5.1.- **Tubos muestra.**-Se adicionó 20 µl de la muestra de (2.5 a 10 ng) ADN a cada tubo etiquetado .

5.2.- Tubos de control positivo.- Se mezcló el control positivo de ADN y se centrifugó brevemente antes de usarse y se tomó 20 µl de la parte superior. El control positivo de D1S80 contiene los alelos 18 y 31.

5.3.- Tubos de control negativo.- Se adicionaron 20 µl de agua destilada estéril.

NOTA: Al depositar el ADN la punta de la pipeta debe de atravesar la capa de aceite y asegurarse de no introducir burbujas de aire.

6.- Tan pronto como se terminó de adicionar las muestras de ADN, se colocaron los tubos en el termociclador y se verificó que las etapas del primer ciclo fueran las adecuadas.

NOTA: El programa de amplificación deberá ser completado en aproximadamente 2.5 horas. Las muestras ahora están listas para el análisis de los productos de amplificación por electroforesis en gel o pueden ser almacenadas de 2°C a 8°C por lo menos 7 días o a -20°C por períodos más largos.

V. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) PARA DETERMINAR LOS ALELOS Y GENOTIPOS DEL LOCUS D1S80

Montaje del molde para el gel

1.- Se lavaron las placas de vidrio con agua y detergente, se enjuagaron con suficiente agua.

2.- Se verificó que las placas de vidrio no tuvieran residuos de detergente al limpiarlas con etanol al 95% y se dejaron secar).

3.- Se ensamblaron las placas de vidrio en forma de "sandwich", se colocaron los espaciadores de grosor adecuado en los bordes de la placa de vidrio más larga y cuidadosamente se colocó la placa de vidrio más corta sobre los espaciadores, se presionó firmemente los bordes con dos sujetos papeles grandes de cada lado y con cinta canela, se selló al borde inferior asegurándose de que las esquinas quedaran perfectamente selladas. Posteriormente se sellaron los bordes derecho e izquierdo teniendo la precaución de volver a sellar las esquinas.

NOTA: Este procedimiento no debe dejar burbujas de aire entre la cinta canela y el vidrio.

4.- Se sujetar los bordes derecho e izquierdo una vez sellados con cinta canela con tres sujetadores de papel grandes de cada lado de la placa y se formó un ángulo de 45 a 60° entre el molde (placas) y la mesa de trabajo.

NOTA: Esta posición permitirá la eliminación de burbujas de aire.

Preparación del gel

1.- Se adicionaron 30 ml de agua desionizada, 2ml. de buffer TBE 10X y 8 ml de gel concentrado de alta resolución a un vaso de precipitado de 100ml con un agitador magnético y se colocaron sobre una parrilla magnética a temperatura ambiente y se mezclaron los reactivos.

NOTA: La etapa anterior se deberá realizar rápidamente debido a que en la adición de persulfato de amonio y TEMED comenzará el proceso de polimerización.

2.- Se adicionó a la mezcla anterior 400 μ l de persulfato de amonio (al 10%) y 20 μ l de TEMED. Se disminuyó la velocidad de agitación y se homogenizó el gel.

3.- Inmediatamente se vertió el gel entre las placas lentamente y se mantuvo un fluido constante evitando la entrada de burbujas de aire.

4.- Se insertó el peine en la parte superior de las placas y se colocó el gel sobre una superficie plana y se dejó que polimerice a temperatura ambiente por lo menos 45 minutos antes del corrimiento electroforético.

NOTA: El gel polimerizado puede ser almacenado con las placas envuelto en bolsas de plástico por 24 horas a temperatura ambiente. El buffer de corrimiento TBE 0.5X se puede añadir alrededor del peine antes de envolverlo

en plástico para evitar la deshidratación. Tratar de no mover la posición del peine mientras se guarda en las bolsas de plástico.

Preparación de la muestra para cargar el gel.

- 1.- Una vez que el gel se polimerizo, se marcaron los dientes del peine con un marcador de tinta indeleble sobre la superficie del vidrio y cuidadosamente se quitó el peine, las pinzas y la cinta canela.
- 2.- Se colocó el molde con el gel en la cámara de electroforesis a continuación se adicionó al depósito de la parte superior de la cámara de electroforesis buffer TBE 0.5X y se observó que no hubiera ningún escurrimiento del buffer de li depósito de la parte superior hacia la parte inferior, posteriormente se adicionó buffer TBE 0.5X en el reservorio inferior de la cámara.
- 3.- Sobre una placa de microtitulación se colocaron 1 μ l de azul de bromofenol y 6 μ l de ladder de D1S80 y se dispensaron en el gel de manera que se alterne un carril del gel el ladder y las muestras.
- 4.- Sobre una placa de microtitulación se dispensaron 1 μ l de azul de bromofenol y 8 μ l de la muestra de ADN genómico, se mezclaron y después se dispensaron las muestras en cada pozo del gel.

Corrimiento del gel.

- 1.- Se conectaron los cables de los electrodos a la cámara de electroforésis y a la fuente de poder y se inició la electroforesis a un voltaje de 300 volts por una hora y media.

Desamblaje

- 1.- Se desconectó el sistema de electroforesis de la fuente de poder, se desechó el buffer de la cámara y se quitaron las placas de vidrio.
- 2.- Con una espátula ancha y con un flujo constante de agua se desprendió cuidadosamente el gel de las placas de vidrio, se cortó un pequeño triángulo en una de las esquinas del gel para conocer la orientación del mismo.

Tinción

- 1.- Se adicionó en un recipiente 200 ml de agua y aproximadamente 20 μ l de bromuro de etidio y se colocó el gel en esta solución.
- 2.- Sobre un agitador orbital se colocó el recipiente con el gel a 50 rpm por 5 minutos. Una vez que ha transcurrido el tiempo de tinción se lavó el gel con agua de la llave dos o tres veces más.

Análisis del gel.

- 1.- Se colocó el gel en el transiluminador de luz UV del Eagle eye y se determinaron los alelos.
- 2.- Se verificó la colocación del gel y por consiguiente la posición de las muestras y se observaron los alelos presentes en cada muestra y por comparación con el ladder se determinaron los genotipos y se tomó la fotografía correspondiente.

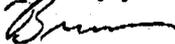
ANEXO D.

ANALISIS ESTADISTICO.

Dear Alfonso:

Enclosed are the analyses for the PM, HLA-DQA1, and D1S80 data that you requested. I performed the Hardy-Weinberg and Linkage expectation tests. However, it was not possible to perform the Linkage Tests between the Polymarker Loci and HLA-DQA1 and D1S80. I would suggest that analysis be done before publishing a manuscript. To perform such I would need to know the complete genotype of each sample. If you could send me the HLA-DQA1, Polymarker, and D1S80 types on each sample, I could complete the analyses. In the meantime, I have enclosed the analysis for your review. If you would like to publish this, I would be more than pleased to assist you in the writing of the paper for publication.

Sincerely yours,


Bruce Budowle

RESULTS

The distributions of observed allele and genotype frequencies for the PM, HLA-DQA1, and D1S80 loci in the Mexican population sample are shown in Tables 1, 2, 4, 5 and 6. Except for D7S8 ($p=0.033$), the genotype frequency distributions for the loci do not deviate from HWE based on the homozygosity test (except for D1S80; $p=0.044$), likelihood ratio test, and the exact test (Tables 3, 4, and 5). NOTE: That the D7S8 locus departure is a significant deviation, but not highly significant. With a Bonferroni correction, there is little evidence for departures from HWE for this Mexican population sample. (since the other more powerful tests for HWE for D1S80 are not significant, there is no problem with HWE for D1S80). To obtain the likelihood ratio test and the exact test analyses the data were shuffled 1000 times for PM loci and 2000 times for HLA-DQA1 and D1S80.

The effect on a frequency estimate of D7S8 genotypes using the product rule (when there is a detectable departure from Hardy-Weinberg expectations) and when using the counting method (i.e., observed genotype frequency) is demonstrated in Table 7. The estimate in Table 7 marked by an asterisk is the situation where the product rule yielded a lower frequency estimate than the counting method. Obviously, for the genotypes D7S8 AA and BB, invoking the product rule would yield a conservative estimate. The difference in D7S8 AB genotype frequency estimates is small (0.551 vs. 0.46), which suggests that the use of the product rule for estimating D7S8 genotype frequencies would still provide a valid estimate for forensic or human identity purposes (i.e., where undue bias would not be generated). The departure from HWE for D7S8 most likely is due to sampling variance (and not substructure effects - the observed homozygosity is lower than expected homozygosity). These data also show that departures from HWE generally have little impact on genotype frequency estimates when independence is assumed.

An analysis was performed to determine whether or not there

were any detectable associations between any of the five PM loci (Until the HLA-DQA1 and D1S80 data are put in a format to enable linkage analysis...). An inter-class correlation test analysis demonstrated that there was only one example for correlation between the alleles at any of the pairs of loci - that is GYPA and Gc (p=0.042) (Table 8). NOTE: The departure is significant, not highly significant; A Bonferroni correction would suggest that there is no departure from independence between loci in this Mexican sample population; The observed and expected two-locus genotype frequencies are not substantially different - also suggesting little effect if independence is assumed.

As an additional test for association, independence among the seven loci was evaluated by examining whether or not the observed variance (s_x^2) of the number of heterozygous loci in the population sample is within its confidence interval under the assumption of independence using the procedure described by Brown, et al. (1980). There was no evidence of association for the five PM loci described in the Mexican sample population using the s_x^2 criterion ($s_x^2 = 1.302$; 95% confidence interval of variance is 0.872-1.558).

A 2 x C contingency table exact test was used to generate a G-statistic (1000 shuffling experiments) (Roff and Bentzen; Sokal and Rohlf) to test for homogeneity between the Mexican and a US Southwest Hispanic population sample. These two groups would be expected to be the most similar. There were no significant differences in allele frequencies for the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, Gc, and HLA-DQA1 between Southwest Hispanics (Budowle, et al. 1995) and the Mexican sample. Only D1S80 was different statistically. NOTE: This difference is not highly significant (p=0.019). The difference in D1S80 data between the sample populations may be due to genetic differences, sampling variance, or to small sample sizes. Regardless, the Mexican and Southwest Hispanic population data overall are similar. Additionally, the similarity between the two populations for D7S8 also supports the utility of the product rule for estimating D7S8 genotype frequencies. There would be no anticipated substantial differences in DNA profile frequency estimates if either sample population were used as a reference database.

REFERENCES

PCR REFERENCE---

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, T., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N., "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis for diagnosis of sickle cell anemia," Science, Vol. 230, 1985, pp. 1350-1354.

PM REFERENCES---

Yamamoto, T., Davis, C.G., Brown, M.S., Schneider, W.J., Casey, M.L., Goldstein, G.L., and Russell, D.W., "The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA," Cell, vol. 39, 1984, pp. 27-38.

Table 6. D1880 observed allele frequencies in 116 unrelated Mexicans.

ALLELE	FREQUENCY
16	0.026
17	0.017
18	0.289
19	0.004
20	0.009
21	0.026
22	0.009
23	0.004
24	0.168
25	0.099
26	0.013
27	0.017
28	0.047
29	0.039
30	0.129
31	0.091
32	0.000
33	0.000
34	0.004
35	0.000
36	0.009

a) Observed Homozygosity = 21.6%; Expected Homozygosity (unbiased) = 14.9%; HWE - Homozygosity Test ($p=0.044$), Likelihood Ratio Test ($p=0.395$), Exact Test ($p=0.205$)

GLOSARIO

ADN. Acido desoxirribonucleico; macromolécula formada de una doble cadena de desoxirribonucleótidos. Contiene toda la información genética de la célula.

ADN complementario. (ADNc) ADN cuyas bases son complementarias al ARNm; se emplea para clonación o como sonda específica en estudios de hibridización.

ADN polimerasa. Enzima que cataliza la unión de desoxinucleótidos para formar ADN de doble cadena. Esta enzima utiliza ADN de una sola cadena como molde.

Alelo. Forma alternativa de un gen; se encuentra en un locus particular dentro del cromosoma. Si existen más de dos alelos en una población, se dice que el locus presenta alelismo múltiple.

ARN. Acido ribonucleico, macromolécula de una sola cadena formada por ribonucleótidos. ARNm (Acido ribonucleico mensajero); lleva información del núcleo (ADN) al citoplasma para dirigir la síntesis de proteínas.

ARN polimerasa Enzima que cataliza la formación de ARN a partir de ribonucleótidos 5'-trifosfato usando una cadena de ADN o ARN como molde.

Autosoma. Cromosomas que no son los sexuales. La especie humana posee 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (gonosomas).

Código genético. Secuencia consecutiva de tripletes (codones) de ADN y ARN que especifican la secuencia de aminoácidos para la síntesis de proteínas.

Codominancia. Cuando el par de alelos se expresa en el heterocigoto. Por ejemplo, los humanos que poseen el grupo sanguíneo AB muestran los efectos fenotípicos de ambos alelos codominantes I^A e I^B.

Codón (tripleto). Grupo de tres nucleótidos continuos en el ARNm que codifica un aminoácido específico.

Criminalística. Ciencia penal auxiliar que mediante la aplicación de sus conocimientos, metodología y tecnología al estudio de las evidencias materiales descubre y verifica científicamente un hecho delictuoso y al o los presuntos autores aportando las pruebas a los organismos que procuran y administran justicia.

Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Grupo de genes localizados en el cromosoma 6 del humano y en el cromosoma 7 de los ratones. El CMH controla muchas actividades de las células del sistema inmunitario incluyendo el proceso de rechazo en trasplantes y la muerte de células infectadas por virus por medio de los linfocitos T killer. Se han designado símbolos para el CMH en distintos mamíferos como por ejemplo: Humanos (HLA), perros (DLA), ratones (H-2) y rata (Rt-1).

Complejo HLA. Complejo de antígenos leucocitarios en humanos. Ocupa un segmento de ADN de alrededor 3,500 Kb de largo localizado en el brazo corto del cromosoma 6. La región localizada junto al telómero contiene los genes que codifican a las moléculas clase I de histocompatibilidad (HLA-B, HLA-C y HLA-A). La región próxima al centrómero contiene a los genes que codifican a las moléculas clase II (DP, DQ y DR). Los genes que codifican a los componentes del sistema del complemento se ubican en la región media del complejo.

Cromosoma. Corpúsculos que se encuentran generalmente en el núcleo de las células. Cada cromosoma está formado por una molécula de ADN que se encuentra rodeada por proteínas (histonas). En las células procarióticas los

cromosomas contienen toda la información genética esencial para la vida de la célula.

Cromosomas homólogos. Par de cromosomas que se heredan de cada progenitor. Los cromosomas homólogos contienen la misma secuencia lineal de genes y como consecuencia cada gen está presente en duplicado dentro de la célula.

Diploide. Cantidad de material cromosómico de una célula somática. Las células somáticas en el ser humano contienen 46 cromosomas.

Dominante. Se refiere a los alelos que manifiestan completamente su fenotipo cuando están presentes en estado heterocigoto. Los alelos cuya expresión fenotípica se enmascara por los alelos dominantes se denominan alelos recesivos.

Embalar. Es la maniobra que se hace para guardar, inmovilizar y proteger algún indicio dentro de algún recipiente protector.

Endogamia. Apareamiento intragrupos.

Endonucleasa. Enzima que corta los enlaces internos fosfodiéster en la molécula de ADN. Las endonucleasas de tejido somático hidrolizan al ADN cortando la doble cadena. Las endonucleasas aisladas de células en profase meiótica producen cortes en una hebra del ADN con terminación 5' hidroxilo. Los cortes en la cadena simple del ADN representan los primeros pasos en la replicación y la recombinación.

Exón. Porción del gen que es incluido en la transcripción para formar ARNm. Los exones ocupan generalmente tres distintas regiones dentro del gen que codifica a las proteínas; la primera, la cual no es transcrita dentro de la proteína, señala el inicio de la transcripción y contiene las secuencias que

dirigen al ARNm a los ribosomas para la síntesis proteica. Los exones de la segunda región contienen la información que codifica la secuencia aminoacídica de la proteína. Los exones de la tercera región son transcritos a la parte del ARNm que contiene las señales de terminación de la transcripción y de la adición de una cola de poliadenilato (poliA).

Fenotipo. Naturaleza física, bioquímica y fisiológica de un individuo determinada, tanto por su genotipo como por el medio ambiente en el cual se desarrolla.

Gameto. Célula germinal haploide.

Gen. Unidad mínima de herencia que ocupa una posición específica (locus) dentro del cromosoma. Posee uno o más efectos específicos en el fenotipo de un organismo. Hay tres clases de genes: (1) genes estructurales que son transcritos a ARNm y que son trasladados dentro de cadenas polipeptídicas. (2) genes estructurales que son transcritos a moléculas de ARNr o ARNt. y (3) genes reguladores que no son transcritos, pero que sirven como sitios de reconocimiento para las enzimas y otras proteínas involucradas en la replicación y transcripción.

Genética. Ciencia que estudia la herencia.

Genética de poblaciones. Estudia la distribución de los genes y genotipos de las poblaciones y el modo en que la frecuencia de los mismos se conserven o modifican. Trata de explicar en términos cuantitativos y predictivos el proceso de adaptación. Los genetistas de poblaciones construyen modelos matemáticos para dilucidar la interacción de los genes con factores como la selección, tamaño de la población, mutación y migración.

Genética Molecular. Subdivisión de la genética que estudia la estructura y funcionamiento de los genes a nivel molecular.

Genotipo. La constitución genética de un organismo.

Haploide. Número de cromosomas de un gameto normal que sólo contiene uno de cada par de cromosomas. En el hombre, el número haploide es 23.

Hardy-Weinberg, Ley Las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. En una situación en donde se considera un simple par de alelos, las frecuencias de A y a están definidas por p y q respectivamente. En equilibrio, las frecuencias de las clases genotípicas son: p^2 (AA), $2pq$ (Aa) y q^2 (aa). Para que se cumpla esta ley se deben de cumplir cuatro condiciones: 1) Que el tamaño de la población sea muy grande. 2) Que todos los apareamientos se lleven a cabo al azar. 3) Que todos los alelos sean codominantes. 4) Que no lleguen alelos de fuentes externas.

Heterocigoto. Individuo que tiene dos alelos diferentes en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

Histonas. Proteínas altamente conservadas que al unirse al ADN forman nucleosomas, la unidad básica de la cromatina.

Homocigoto. Individuo que posee los dos alelos idénticos en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

Intrón. Segmento de ADN que, a pesar de ser transcrito, se remueve del transcrito primario al originarse el ARN mensajero.

Kb. Kilobase (miles de pares de bases en un fragmento de ADN).

Locus (plural: loci). Localización exacta del gen en un cromosoma. Las diferentes formas del gen (alelos) ocupan siempre la misma posición o locus en el cromosoma.

Locus polimórfico. Locus genético en una población en la cual el alelo más común tiene una frecuencia menor de 0.95.

Lugar de hechos. Sitio donde se ha cometido un hecho que puede ser delito.

Mapa cromosómico. Determinación de la posición y el orden de los loci génicos en un cromosoma, analizando especialmente la frecuencia de recombinación entre éstos.

Marcador genético. Es una característica simple heredada, la cual es estudiada no sólo por su interés intrínseco, sino para rastrear este segmento sobre un cromosoma. Un rasgo puede emplearse como marcador genético en los estudios de líneas celulares, de individuos, de familias y de poblaciones si está determinado genéticamente, si puede clasificarse con certeza, si tiene un patrón de herencia inequívoco y si presenta variaciones hereditarias lo suficientemente comunes para permitir su clasificación como un polimorfismo genético.

Migración. En genética de poblaciones es el movimiento de individuos entre diferentes poblaciones de una misma especie dando como resultado un flujo génico.

Nucleótido. Monómero constituido por una base (purina o piridina), un azúcar (pentosa) y un grupo fosfato.

Oligonucleótido. Polímero corto de nucleótidos (menos de 50 bases).

P. Brazo corto de un cromosoma (del francés petit).

PAGE. (Polyacrilamide gel electroforesis). Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Palíndromo. Secuencia de ADN que es complementaria a sí misma, y por tanto, idéntica a su cadena complementaria (ambas se leen en la misma dirección 5' a 3'). Palíndromos perfectos (por ejemplo, GAATTC) aparecen frecuentemente en sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción; los no perfectos (por ejemplo, TACCTCTGGCGTGATA) frecuentemente aparecen en sitios de unión de otras proteínas, como las represoras; palíndromos interrumpidos (por ejemplo, una repetición invertida como GGTTXXXAACC) ofrecen la posibilidad, de la formación en una cadena de ácido nucleico de la estructura de horquilla de cuello y lazo como ocurre en el ARNt. Tramo corto de ADN que tiene bases de ADN idénticas al leerlas en sentido 5' a 3' sobre cada una de las cadenas del ADN bicatenario. Por ejemplo: 5' ATCGAT-3' 3' TAGCTA-5'.

PCR. (Polymerase Reaction Chain). Reacción en cadena de la polimerasa que sirve para amplificar secuencias específicas de ADN.

Perito. Persona experta o experimentada en una ciencia o arte.

Población Mendeliana. Es el conjunto de organismos que viven en un lugar determinado y entre los cuales los apareamientos se llevan a cabo.

Poliacrilamida, Gel Preparado con una mezcla de acrilamida y N,N'-metilenebisacrilamida en presencia de un agente polimerizante. Se forma una malla tridimensional insoluble de cadenas monoméricas. Dependiendo de la concentración de cada ingrediente es posible preparar geles con diferente tamaño de poro. Estos geles se utilizan para separar moléculas biológicas como proteínas o ADN.

Polinormismo Presencia de dos o más genotipos alternativos en una población, determinados por factores genéticos y que presentan frecuencias

demasiado elevadas para que puedan ser mantenidos en la población sólo por mutación (p.e. humanos Rh positivos y Rh negativos).

Q. Brazo largo de un cromosoma.

Recesivo. Se dice que un gen es recesivo si sólo se expresa cuando está en su forma homocigótica,

Servicios Periciales. Son el conjunto de actividades desarrolladas por especialistas en determinadas ciencias o técnicas las cuales previo examen de una persona, un hecho, un mecanismo, una cosa o un cadáver emiten un dictamen traducido en puntos concretos y fundado en razonamientos técnicos.

Sistema de grupo sanguíneo primario. Son aquellos grupos bien conocidos y definidos. Incluye el sistema ABO, MNSs, P, Rh, Diego, Duffy, I, Kell, Kidd, Lewis, Lutheran, Xa y Yt.

Sistema de grupo sanguíneo secundario. Este sistema incluye antígenos que son precursores de nuevos sistemas o productos de genes mutantes raros en existencia. También se incluyen antígenos de alta incidencia los cuales no han sido relacionados a sistemas mejor conocidos. Este grupo incluye los siguientes antígenos: Auberger, August, Batly, Becker, Biles, Heibel, Marriot, Orris, Raddon, etc.

Sonda. Molécula (oligonucleótido o anticuerpo monoclonal) que sirve para detectar un gen o su producto, frecuentemente con fines de diagnóstico.

Taq ADN polimerasa. Enzima que es sintetizada por la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. Esta enzima es estable a los 95°C y se usa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Traducción. Proceso en el cual la secuencia nucleotídica del ARNm que contiene el mensaje genético, determina el orden de los aminoácidos, para la formación de la cadena polipeptídica.

Transcripción. Síntesis de ARN sobre un molde de ADN.

VNTR (Variable number of tandem repeats). Alelos que están constituidos por una secuencia base de nucleótidos unidos en tandem y que se repiten n veces a lo largo de un locus dado. Estos alelos pueden ser cortados con una enzima de restricción específica que produce fragmentos que difieren en tamaño dependiendo del número de repeticiones presentes de la secuencia base. La secuencia base que constituye estas regiones (alelos) contiene de 10 a 15 pares de bases. Los alelos VNTR son altamente polimórficos y debido a esto se utilizan como marcadores genéticos en estudios forenses, casos de disputa de paternidad, genética de poblaciones, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Thorwald, J. El siglo de la Investigación Criminal. Ed. Continental 1982.
2. Lewontin R.; Hartl L. Population Genetics in Forensic DNA typing. Science 1991,254,1745-1750.
3. Manual Systeme Automatise de Reserche D'individus. Avenir Technologie.
4. Berumen C. J. El análisis del ácido desoxirribonucleico en la identificación de individuos. Ciencia y Desarrollo. Julio/Agosto. 1993.
5. Robertson; Ross A.; Burgoyne L.; DNA in Forensic Science, Theory, Techniques and Application. Ellis Howood limited, 1990.
6. Reynolds R.; Sensabaugh G.; Blake E. Analysis of Genetic Markers in Forensic DNA Samples Using the Polymerase Chain Reaction. Anal Chem. 1991, 63.
7. Department of Justice. Forensic DNA Analysis: Issues. Criminal Justice Information Policy 1991,NCJ-128567, 1-31.
8. Lander E. DNA fingerprinting on trial. Nature 1989, 339, 501-515.
9. Lewin R. DNA Fingerprints in Health and Disease. Science 1986, 233, 521-522.

10. Hickis J. DNA typing: A unique weapon against crime. The Scientist. 1989, January 23,12-13
11. Kloosterman A.; Vossen R.; Wust D.; de Leeuw W.; Uitterlinden A. Detection of Three Different VNTR's by DNA-Amplification. Advances in Forensic Haemogenetics 1992, 53-55.
12. Webb M.; Williams N.; Sutton M. Microbial DNA Challenge Studies of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Probes Use for DNA Profiling Analysis. J Foren Sci. 1993, 38, 1172-1175.
13. Budowle A.; Chakraborty B.; Giusti R.; Eisenberg A. Analysis of the VNTR Locus AmpliFLP D1S80 by the PCR Followed by High-Resolution PAGE: Am J Human Gen 1991, 48, 137-144.
14. Nakamura Y.; Leppert M.; O'Connell P.; Wolff R.; Holm T.; et. al. Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. Science 1987, 235, 1616-1622.
15. Chakraborty R.; Kidd K. The utility of DNA typing in forensic work. Science 1991,254,1735-1739.
16. Montiel Sosa Juventino. Criminalística Tomo 1 Ed. Limusa 1984.
17. Moreno Gonzalez. Manual de Introducción a la Criminalística Ed. Porrúa. 1984.

18. Villanuevas Cañada E. Criminalística. Medicina legal y Toxicología 3ra Edición Fundación García Muñoz, Valencia, 1985.
19. Saferstein R. Forensic Science HandBook Vol II. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 1988.
20. Saferstein R. Forensic Science HandBook Vol I. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 1988.
21. Imwinkelried. Edward J., Scientific and expert evidence. Practising Law Institute. New York City. 1981
22. Eguiarte F. Luis; Una guía para principiantes a la Genética de Poblaciones. Investigación y Ciencia. 1978, 26,30-38.
23. Barahona A. Piñero D.; Genética: La continuidad de la vida. Fondo de cultura económica. 1994.
24. Risch, Neil J., and Devlin B. On the probability of matching DNA fingerprints. Science 1992,255,717-720.
25. Crime Laboratory Digest 1988, Vol. 15 No.1
26. Karp G. Biología Celular. Segunda edición Mc. Graw-Hill México 1987.
27. Pié. Contijoch, M. El mensaje hereditario. Una introducción a la Genética. Edición. primera., Ed. Trillas. 1988

28. Lehninger A. L. Bioquímica. 2a. Ed. España: Ediciones Omega,1990:871-900.
29. Frankel, Edward., DNA, el proceso de la vida, décimo sexta edición. Ed. siglo XXI. 1989.
30. Salamanca F. Citogenética Humana.1a. Ed. México: Editorial Médica Panamericana,1990: 9-43.
31. Barrera Saldaña H. A. Información Genética.1a. Ed. México: Colección Ciencia Básica, 1992: 9-32.
32. Vives, Puiggrós.J. Hematología Clínica. Ingeniería Genética aplicada a la Hematología. Capítulo 7. 1987.
33. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. y col. PCR Protocolos. A Guide to Methods and Applications. USA: Academic Press, Inc, 1990: 325-336.
34. Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics Relating to the use of PCR-Based Polymorphisms. Foren Sci Int 1992, 55, 1-3.
35. Barros F.; Lareu M.; Carracedo A. Detection of Polymorphisms of Human DNA After Polymerase Chain Reaction by Miniaturized SDS-PAGE. Foren Sci Int 1992, 55, 27-36.

36. Eisenstein B. The Polymerase Chain Reaction. *The New England J Med* 1990,322,178-182.
37. Weller D. PCR Amplification of DNA. *Journal of Chemical Education* 1994, 71, 340-341.
38. Saiki R. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Erlich H. Ed. Stockton Press. New York, 1990; pp 7-16.
39. Von Beroldingen C.; Blake E. T.; Higuchi R.; Sensabaugh G. F.; Erlich H. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. Erlich H. Ed. Stockton Press: New York, 1990; pp 209-223.
40. Kwok S.; Higuchi R. Avoiding False Positives with PCR. *Nature* 1989, 339, 237-238.
41. Britten R.; Kohne D. Repetead Segments of DNA. *Sci Amer* 1970, 222, 24-31.
42. Sajantila A. Budowle B.; PCR amplification of alleles at D1S80 locus: Comparison of a Finnis and North American Caucasian population sample and Forensic Case Work evaluation. *Am J. Hum. Genet*,1992 ,50:816-825.
43. Deka R. Chakraborty R. Population Genetic characteristics of D1S80 locus in seven Human population. *Hum. Genet.*, 1994,94:252-258.
44. Budowle B; Baechtel F; D1S80 population data in Africans, Americans,

- Caucasians, Southeastern Hispanics, Southwestern Hispanics and Orientals.
J. Foren. Sci. 1995,40,38-44.
45. Budowle B; Linsey J; Validation and population studies of the loci
LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and GC (PM LOCI) and HLA DQ α using multiplex
amplification and typing procedure. J. Foren. Sci. 1995,40, 45-54.
46. Thymann M; Nellen L.J. Masumba G. Analysis of the locus D1S80 by
amplified fragment length polymorphism technique (AMP-FLP). Frequency
distribution in Danes. Intra and Inter laboratory reproducibility of the technique.
Forensic Science International. 1993, 60,47-56.
47. Jeffreys, A; Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. Nature.
1985,314,67-73.
48. Jeffreys A.; MacLeod A.; Tamaki K.; Neil D.; Monckton G. Minisatellite
repeat coding as a digital approach to DNA typing. Nature 1991, 354,
204-209.
49. Helminen P. Ehnholm; Jeffreys A. Application of DNA "fingerprints" to
paternity determination. The Lancet. 1988,574-576.
50. Brenner C.H. A note on paternity computation in cases lacking a mother.
Transfusion. 1993, 33, 51-54.
51. Bachtel S.; Smeric B.J. Multigenerational Amplification of a Reference
Ladder of Alleles at locus D1S80. J. Foren Sci 1993,38, No 5, 1176-1182.

52. Marx J. DNA Fingerprinting Takes the Witness Stand. *Science* 1988, 240, 1616-1618.
53. Monson K.; Budowle B. A Comparison of the Fixed Bin Method with the Floating Bin and Direct Count Methods: Effect of VNTR Profile Frequency Estimation and Reference Population. *J Foren Sci* 1993, 38, 1037-1050.
54. Walsh P.; Metzger D.; Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. *BioTechniques* 1991, 10, 506-513.
55. Devlin B.; Risch N.; Roeder K. No Excess of Homozygosity at Loci Uses for DNA Fingerprinting. *Science* 1990, 249, 1416-1420.
56. Wei, Gou and Thompson E.; Performing the Exact test of Hardy-Weinberg propotion for multiples alleles. *Biometrics* 1992, 48, 361-372.
57. Edwards, A; Hammond, H; Jin, L.; Caskey, C.t; and Chakraborty, R; Genetic variation at five trimeric and tetrameric repeat loci in four human population groups. *Genomics*. 1992, 12, 241-253.
58. Chakraborty,R; Smouse, P:E; and Neel, J.V. Population amalgamation and genetic variation: Observations on artificially agglomerates tribal populations of central and south America. *Am. J. Hum. Genet.* 1988, 43, 709-725.
59. Nei, M. and Roychoudhury, A:K; Sampling variances of heterozygosity and

- genetic distance. *Genetics* 1974, 76, 379-390.
60. Nei, M; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic*. 1978, 89, 583-590.
61. Edwards, A; Hammond, H; Jin, L; Caskey, C:T; and Chakraborty, R; Genetic variation at five trimeric and tetrameric repeat loci in four human population groups. *Genomic*. 1992, 12, 241-253.
62. Chakraborty, R; Fornage, M; Guegue, R; and Boerwinkle, E. Population genetics of hypervariable loci: analysis of PCR based VNTR polymorphism within a population. In Burke T, Dolf G, Jeffreys A.J: : *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*. Birkhauser Verlag, Berlin, 1991. 127-143.
63. Weir, B:S; Independence of VNTR alleles defined by fixed bins. *Genetics*, 1992, 130, 873-887.
64. Karlin, S; Cameron, E:C; and Williams, P:T; Sibling and parent-offspring correlation estimation with variable family size. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 1981, 78, 2664-2668.
65. Brown, AHD; Feldman, M.W; and Nevo, E; Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics*, 1980, 96, 523-536.
- 66.- Chakraborty, R; Detection of nonrandom association of alleles from the distribution of the number of heterozygous loci in a sample. *Genetics*, 1984, 108, 719-731.

67. Weir, B:S; Multiple test. In genetic Data Analysis, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. 1990, 109-110.
68. Roff, D:A; and Bentzen P; The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphism: χ^2 and the problem of small samples. Molecular Biology and Evolution. 1989, 6, 539-545.
69. Sokal R:R; and F.J: Rohlf. Biometry, 2nd. edition W:H: Freeman and company. San Francisco. 1981.
70. Novelli G. Spinella A. Dallapiccola B.; Analysis apo B, HLA DQalpha, and D1S80. Polymorphisms in the Italian population using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Biology, 1992, 4: 381-386.
71. Heibrich E. Hutz M and Santos R. D1S80 locus variability in three Brazilian ethnic groups. Human Biology, 1995, 67(2): 311-319.
72. Falcone E.; Spadafora P and DeBenedictis G; DYS19, D12S67, and D1S80 polymorphisms in population samples from Southern Italy and Greece. Human Biology, 1995, 67(5): 689-701.
73. Chaventré A. and Degos L. Mundo Científico La Recherche. Ed. Fontalba. No. 4. 1981. España.
74. Berumen J. Diversidad genética de tres sondas de ADN en la huella digital de ADN de una población mexicana. Rev. Invest. Clín. 1994; 46: 457-464.