



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

27

**VARIACION GENETICA DE LOS LOCI CSF1P0,
TPOX, TH01, F13A01, FESFPS Y vWA
EN LA POBLACION DEL VALLE DE MEXICO
Y SU APLICACION EN LA CRIMINALISTICA.**

297262

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
JORGE GUILLEN ALFARO

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

GRADECIMIENTOS:

**A mis padres:
Jorge y Concepción**

Gracias por su apoyo y comprensión incondicional y sobre todo por su cariño. Espero y esto sea una recompensa de todo el esfuerzo que realizaron para sacarme siempre adelante.

A mi hermana: Mónica

Gracias por tu ayuda y por soportarme durante todos estos años.

A mis asesores:

Q. F. B. Ma. Lourdes Vega Navarrete

M. en C. Alfonso Luna Vásquez

Por sus sabios consejos, apoyo y sobre todo por brindarme la oportunidad de desarrollarme en el aspecto profesional.

Biol. Carlos Carriedo Rico

Por permitirme se parte del Laboratorio de Genética Forense.

A mis Amigos de la Escuela:

Renata P. Saucedo, Teresa Maldonado, Greta Navarro,
Edgar Castelan, Ildfonso y Laissa Lazari.

A mis Amigos del Laboratorio:

Marco Abaunza "El Sensei", Maruka Ambriz, Elena Abarca,
Lulú Vázquez, Beatriz Rodarte "La Toto".

A mi novia: Estela

Por su apoyo, cariño y por ser alguien muy especial para mí.

INDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCION	
ANTECEDENTES	
0 GENERALIDADES DEL ADN	1
1 EL ADN	1
2 ESTRUCTURA	1
3 EL GEN	2
4 SECUENCIAS UNICAS Y REPETITIVAS	3
5 SATELITES	4
6 ANÁLISIS DE LOS MINISATÉLITES	4
7 ANÁLISIS DE LOS MICROSATÉLITES	6
TIPIFICACIÓN DEL ADN	
1 VNTR's Y STR's	8
2 RECCION EN CADENA DE LA POLIMERASA	11
3 ELECTROFORESIS	15
GENÉTICA DE POBLACIONES	
1 LEY DE HARDY- Weinberg	19
2 EQUILIBRIO DE CORRELACION	21
ANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	25
DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	26
METODOLOGÍA	27
RESULTADOS	39
ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
CONCLUSIÓN	60
ANEXO	61
GLOSARIO	67
BIBLIOGRAFÍA	70

RESUMEN

Se tomaron 100 muestras sanguíneas de personas radicadas en la zona metropolitana de la ciudad de México, proporcionadas de manera voluntaria donde el único requisito era que no tuvieran relación de parentesco biológico. Las muestras fueron sometidas a la extracción del material genético utilizando principalmente dos técnicas de extracción: La extracción orgánica que requiere la utilización de Fenol – Cloroformo – Alcohol Isoamílico y La extracción con Chelex que es una resina quelante, siendo ésta la más eficaz, ya que permite una menor manipulación de la muestra y por tanto evita las posibles contaminaciones por parte del laboratorista. Una vez extraído el ADN, se procedió a la amplificación de los sistemas triplex que amplifican en conjunto tres loci a la vez: el sistema CTT que contiene a los loci CSF1P0, TPOX y TH01 y el sistema FFv que contiene a los loci F13A01, FESFPS y vWA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. La detección de las formas alélicas de los loci analizados se hizo mediante el corrimiento electroforético en una cámara de secuenciación utilizando geles de poliacrilamida al 4% logrando con esto una buena resolución de los productos amplificados, los alelos de las muestras fueron determinados por comparación visual con un marcador alélico de peso molecular. Una vez obtenidos todos los datos se agruparon, determinando las frecuencias alélicas y genotípicas. Los resultados muestran una distribución uniforme de los alelos en la población estudiada a excepción del locus TPOX que presenta una heterocigocidad menor al 70%, en este sistema se presenta el alelo número 8 en más del 50% de las muestras analizadas, por tanto la distribución de alelos de este sistema en la población es muy baja. Asimismo, los valores calculados para el conjunto de marcadores establecen un poder de discriminación del 99.99% y poder de coincidencia al azar de 1 en 628,785 llegando a la conclusión de que el conjunto de seis marcadores CSF1P0, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA pueden ser utilizados en el área forense en casos de identificación así como en la búsqueda de responsabilidad de la paternidad.

INTRODUCCION

Criminalística es la disciplina que aplica los conocimientos, métodos y técnicas de las ciencias naturales en el estudio del material sensible significativo que se encuentra relacionado con un probable hecho delictuoso con el fin de determinar, en auxilio de los órganos encargados de administrar justicia, la existencia, reconstruirlo, señalar y precisar la intervención de uno o varios sujetos en el mismo.

Principios que hacen válido el método que aplica la Criminalística por ejemplo:

Principio de intercambio, apuntado por Edmond Locard investigador francés, donde señala que al cometerse un delito se realiza un intercambio de material sensible entre su autor, víctima y el lugar de los hechos.

Principio de correspondencia de característica.- Nos permite deducir, siempre que encontramos una correspondencia de características, después de haber realizado un cotejo minucioso que: dos impresiones dactilares, dos pelos, dos manchas de sangre, semen etc. corresponden a la misma persona.⁽¹⁾

¿qué es la identidad?, 1.- La identidad es el conjunto de caracteres que sirven para distinguir a un sujeto de los demás de la especie e individualizarlo⁽²⁾. 2.- identidad es el conjunto de caracteres que individualizan a una persona, haciéndola igual a si misma y distinta de todas las demás y 3.- Edmond Locard define la identidad como la cualidad o conjunto de cualidades que posee una cosa que la diferencia de todas las demás.⁽³⁾

La necesidad de individualizar a las personas se hizo más patente en el campo de la procuración de justicia debido al crecimiento de la delincuencia y a la reincidencia de los delincuentes por lo que se ha requerido de la creación de procedimientos fiables para su identificación, dividiendo la historia de la identificación en tres etapas: la primera se denomina equívoca o bárbara, en la cual por ejemplo, en la colonia el Rey Hammurabi mutilaba las orejas, manos o nariz a los delincuentes para poder identificarlos, también en la Edad Media específicamente en Francia a los reos se les marcaba el rostro con la "Flor de Liz" que era el emblema real, siendo posteriormente reemplazada por una "V" (volutus)

Para señalar a los ladrones, una "W" para los reincidentes y "GAL" para los condenados a las galeras. La segunda etapa denominada empírica se distingue fundamentalmente por la aplicación del método descriptivo, en el cual se describen las características fisonómicas del delincuente. La tercera etapa se denomina científica que se desarrolla a partir de 1882 en la cual Alfonso Bertillón introduce la antropometría y el retrato hablado que junto con la fotografía complementan su archivo de identificación en la Policía de París. Sin embargo, este procedimiento pasó a segundo término, dando paso a la dactiloscopia, propuesto por Sir Francis Galton en Inglaterra, quien sostuvo que los dibujos dactilares ofrecen una base fundamental para confiar en un sistema fundado en ellos. Galton utiliza las huellas dactilares de los 10 dedos, pero no había ideado un sistema para archivarlas. En 1891 en Argentina Juan Vucetich basándose en los estudios anteriores creó un archivo decadactilar, que permitió la clasificación de las impresiones en la práctica de la identificación, sistema de clasificación, que es usado actualmente. Casi paralelamente a los trabajos de Vucetich, surge otro método de identificación: la serología. Karl Landsteiner en 1901 descubre como producto de sus observaciones la existencia de los grupos sanguíneos del Sistema ABO que son hasta la fecha los grupos antigénicos de sangre humana más importantes. Von Dungern y Hirschfeld 1909 - 1910 proponen que su transmisión es hereditaria y en 1939 Wiener descubre el Sistema Rhesus (Rh). Otras disciplinas que intervienen en la identificación de individuos son la Odontología Forense que utiliza la ficha odontológica y la Antropología Forense que actualmente desarrolla el proyecto "La cara del mexicano" el cual ayudará en el examen médico de cadáveres y tiene que ver con todo lo que permite la identificación física, la somatología de las personas que abarca desde las mediciones de los huesos, estatura, tejido adiposo, tipo de cabello, piel, etc. En resumen es un análisis de la variabilidad fenotípica de los rasgos faciales que incluye datos genéticos, morfológicos y pigmentarios. ^(2,3,4)

La transmisión hereditaria de diversas características personales es una idea ancestral en el hombre, pero su utilización científica con finalidad de identificación es relativamente reciente. Durante el siglo XX se han descrito métodos basados en sistemas polimórficos que incluyen antígenos eritrocitarios, proteínas séricas, enzimas sanguíneas y antígenos leucocitarios humanos (HLA). El desarrollo científico en el área de la biología molecular ha permitido la aplicación de nuevas tecnologías aumentando la capacidad de identificar individuos e indicios cada vez más pequeños, como lo es la tecnología del ADN desarrollada por primera vez por Alec Jeffreys en el año de 1985 para la resolución de un caso de paternidad y posteriormente en la identificación de un joven procedente de Ghana y dos años después en la identificación de un violador.

donde los métodos serológicos clásicos no pudieron lograr una individualización suficiente con los análisis biológicos obtenidos de las víctimas. A partir de ese momento se ha ido generalizando su uso y ha pasado de sólo poder analizar determinados fragmentos de ADN de una longitud relativamente grande a analizar pequeñas regiones procedentes de indicios mínimos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR por sus siglas en inglés. El análisis del ADN por medio de marcadores genéticos representa una herramienta de trabajo muy confiable, esta tecnología se basa en la amplificación mediante PCR y la caracterización de regiones variables o polimórficas del material genético de los individuos (ADN) y es conocida como " huella digital del ADN". Este gran avance permite la identificación de cadáveres, de delincuentes involucrados en violaciones y crímenes, en comprobaciones de paternidad, en identificaciones de parentesco, en las relaciones étnicas de estudios genéticos etc. ⁽⁵⁾

Uno de los objetivos de un análisis de ADN es determinar el genotipo o perfil genético mediante la tipificación de marcadores genéticos polimórficos para ver si la muestra proviene de un individuo en particular, de la víctima o del sospechoso. ⁽⁶⁾ Si el genotipo determinado en la evidencia no es igual al genotipo del individuo cuestionado, puede ser excluido como fuente originaria del fluido biológico encontrado en el lugar de los hechos con una gran certeza. Si el genotipo del individuo concuerda con el de la evidencia puede hablar de similitud y correspondencia, es decir, que es posible que presenten un origen común. El compartir el mismo genotipo no constituye una identificación total ya que algunos individuos de una población presentan el mismo genotipo para el marcador genético estudiado, por lo tanto entre los marcadores se utilicen hay más probabilidad de encontrar diferencias entre los individuos. ⁽⁶⁾

En lo general, la variabilidad entre los individuos de un mismo grupo se percibe en relación con algunas características particulares, esto crea estereotipos que en realidad describen a algunas personas de cada población y ocultan la gran variabilidad que existe dentro de cada grupo.

La mayoría de los caracteres que distinguen a las poblaciones son hereditarios y genéticamente determinados, estas variaciones se deben a diferencias en las estructuras genéticas. De acuerdo con los conceptos Dobzhansky define como raza " a las poblaciones que se diferencian en la frecuencia de algunos genes" y Laughlin considera como raza " a grupos de individuos entre los cuales el intercambio de genes ha estado restringido por algún tiempo". Ambas definiciones contienen dos

elementos fundamentales: 1.- eliminan los estereotipos fenotípicos basados en características superficiales como el color de la piel y 2.- implican la posibilidad de cambio con el tiempo. ^(7,8)

Hay que hacer hincapié en que lo distinto en las poblaciones es la frecuencia relativa de los genes de un sistema o marcador genético pero que éstos son idénticos entre sí. Para estudiar desde este punto de vista a las poblaciones, conviene examinar el mayor número posible de marcadores genéticos.

Para conocer la frecuencia y distribución de un gen en una población es necesario investigar la característica que determina ese gen para de ahí deducir la composición genética. Para hacer eso, en condiciones ideales, se requiere que: 1) el carácter analizado sea determinado genéticamente y que la influencia de factores exógenos sobre el carácter debe ser nula, de tal forma que no se generen diferencias individuales con respecto a ese rasgo, atribuibles, por ejemplo al clima o a la alimentación etc. 2) el carácter hereditario debe ser discontinuo es decir, que permita distribuir a los individuos en grupos o clases perfectamente diferenciados. 3) que se conozca la forma como se hereda esa característica y 4) los genes de los caracteres hereditarios que se estudien deben poseer una frecuencia génica adecuada y en equilibrio en la población. ^(4,8)

Cada individuo tiene una información genética única con la excepción de los gemelos idénticos, los cuales provienen del mismo óvulo fecundado. En los organismos diploides cada gene tiene dos copias de información genética una proveniente de la madre y otra del padre. Todas las células que constituyen a un individuo tienen la misma información genética o ADN, lo que permite obtener los mismos resultados para un marcador genético si se trabaja con sangre, hueso, cabello, hígado, semen etc. de una misma persona. Los marcadores genéticos a nivel de ADN que pueden ser útiles en la identificación de individuos deben tener un gran poder de discriminación (PD) o capacidad de distinguir entre dos individuos (variación genotípicas). Entre más alelos tenga un marcador genético (mayor polimorfismo) y más uniforme sea su distribución entre la población (mayor heterocigocidad), mayor será su poder de discriminación. Las frecuencias genotípicas y alélicas de diferentes sistemas genéticos varían mucho según la población a estudiar ya que dentro de una misma población se presentan genes antropológicamente muy variables, por lo cual al realizar un estudio poblacional se debe tomar en cuenta esta característica.

GENERALIDADES DEL ADN

EL ADN

ácido desoxirribonucleico o ADN es una de las macromoléculas más importantes que se encuentra en todas las células humanas. El ADN consiste de un polímero formado por subunidades repetidas, siendo la molécula más larga que se encuentra en las células humanas. Este gigante de cadenas de nucleótidos está contenido en los cromosomas y es el encargado de almacenar información genética en forma de codones lo que permite formar las demás estructuras haciendo posible su función respectiva.

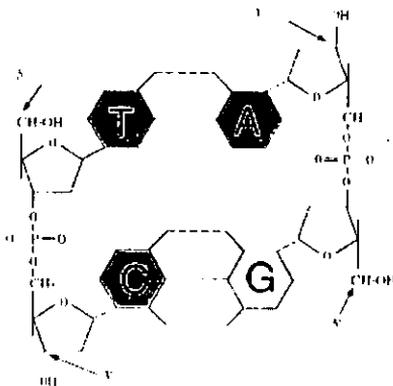
ESTRUCTURA DE ADN

Los nucleótidos del ADN están compuestos de tres entidades: un azúcar 2' (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base. Existen cuatro bases comunes encontradas en los nucleótidos de ADN: adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T) y estas bases caen dentro de dos grupos, las purinas y las pirimidinas. Las bases purinas consisten de dos anillos mientras que las pirimidinas sólo cuentan con un anillo. Todas las bases son estructuras heterocíclicas, cuyos anillos contienen átomos de carbono y nitrógeno. En todos los casos, las bases se encuentran posicionadas en el azúcar del C1' ⁽¹⁰⁾.

Los nucleótidos cuando se encuentran unidos forman un polímero constituido de un grupo fosfato que une a las unidades mediante un enlace fosfodiéster entre el carbono 5' de una molécula de azúcar y el carbono 3' de la misma. De hecho, las bases no solo se encuentran unidas a través de estos enlaces, sino que también, se unen específicamente a través de enlaces no covalentes unas con otras, de la siguiente forma: la adenina se une a la timina y la citosina a la guanina, esta unión ocurre a través de

cadenas separadas de la espina dorsal formada por el azúcar y grupo fosfato, dando como resultado la forma de doble hélice de la molécula de ADN ⁽¹⁰⁾.

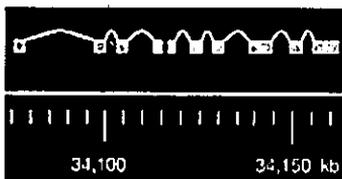
En la doble hélice, las dos cadenas del ADN corren antiparalelamente una de la otra, es decir, una cadena corre de izquierda a derecha en dirección $5' \rightarrow 3'$ la cual siempre se aparea con otra cadena con una secuencia de bases complementarias que corre en dirección $3' \rightarrow 5'$. Por convención, las secuencias del ADN son leídas en dirección $5' \rightarrow 3'$. Aún y cuando la estructura del ADN es aparentemente simple, su elucidación prueba ser una formidable tarea ⁽⁹⁾.



EL GENE

Un segmento particular y reconocible del ADN es llamado gene y la ubicación específica de éste en el cromosoma se denomina locus. En algunos casos, un gene tendrá una función específica, tal como codificar para la producción de enzimas proteicas necesarias para el metabolismo celular. Pero otros genes son utilizados para la huella genética del ADN, cuya función exacta es desconocida ⁽⁹⁾.

cepto por los genes localizados en los cromosomas sexuales, los cromosomas humanos tienen dos copias de cada gen, uno otorgado por parte de la madre y otro del padre. Es posible sin embargo, que la secuencia de pares de bases que crean las copias paternas y maternas para un gene no sean exactamente iguales, en este caso, el individuo se considera heterocigoto. La forma alternativa de un gen se denomina alelo y si un individuo tiene dos copias de un mismo alelo, se dice que el individuo es homocigoto, en otras palabras, la secuencia de pares de bases para un gene específico que son otorgados por el padre y la madre son iguales ⁽⁹⁾.



SECUENCIAS ÚNICAS Y SECUENCIAS REPETITIVAS DEL ADN

condido en aproximadamente 3 mil millones de pares de bases del ADN del genoma humano diploide se encuentran de 25,000 a 30,000 genes ⁽⁵¹⁾ con una longitud aproximada de 5 a 10 pares de bases, incluyendo los intrones. El ADN contiene secuencias indicadoras de una variedad de procesos, tal como la regulación de la expresión de genes, la replicación del ADN, el empaquetamiento y segregación de cromosomas. Incluyendo ADN espaciador, secuencias indicatorias y ADN codificante de proteínas, estas secuencias únicas corresponden aproximadamente del 70 al 80% del total del genoma humano. El restante 20 a 30% del genoma consiste de secuencias repetitivas no codificantes con funciones inciertas. ⁽⁹⁾

ADN repetitivo puede ser dividido en dos clases: secuencias repetitivas en tándem y secuencias escalonadas. El ADN repetitivo en tándem representa un tercio del ADN repetitivo en el genoma humano, cerca del 10% de longitud total. Como los genes repetidos en tándem, estas regiones consisten del inicio al final de repeticiones de una secuencia particular, que están comprendidas de muchas unidades cortas, del nivel de 5 a 250 pares de bases repetidas típicamente cientos a miles de veces. Regiones de este tipo son referidas como satélites del ADN, debido a la tendencia de algunas de estas secuencias a formar bandas satélites en gradientes de densidad de equilibrio. En los humanos, esto ocurre en una variedad de eucariontes. Existen numerosas clases de familias de ADN satélites, donde algunas de estas clases están asociadas con la región del centrómero de los cromosomas.⁽⁹⁾ La fracción menor del ADN repetido en tándem, consiste de regiones mucho más cortas que los satélites ADN, y exhiben una extraordinaria variabilidad en toda su longitud.

SATÉLITES

Las secuencias de los satélites ADN se encuentran típicamente cerca del centrómero del cromosoma⁽⁹⁾ y usualmente consisten de pequeñas secuencias repetidas muchas veces en el genoma⁽¹⁰⁾.

ANÁLISIS DE LOS MINISATÉLITES

Satélites, minisatélites y microsatélites son todas las clases de ADN repetitivo y estos elementos de secuencia repetida se encuentran arreglados en tándem. Las tres clases se distinguen sobre la base de las unidades de repetición. Los minisatélites típicamente consisten de 9 a 100 pares de bases cuyas secuencias se repiten de 10 a 1000 veces. Existen miles de loci minisatélites distribuidos a través del genoma de un amplio rango de eucariontes y muchos de ellos son hipervariables, debido a la variación

el número de copias de unidades repetidas. Los minisatélites son además sistemas ideales para la identificación individual. ⁽⁹⁾

La huella genética y perfil del ADN han encontrado numerosas y variadas aplicaciones durante los últimos 10 años. Estas técnicas son utilizadas para resolver miles de disputas de paternidad y maternos cada año en todas las ciudades del mundo. El examen del ADN ha sido utilizado en muchos casos forenses, particularmente en casos de delitos sexuales. Otras aplicaciones incluyen el examen de pedigree animal, autenticidad de líneas celulares, estudios de cultivo de plantas y estudios evolutivos. ⁽⁹⁾

Adicionalmente con el desarrollo de los RFLP's, determina otra clase de polimorfismo fue caracterizado basándose en los arreglos en tándem de las secuencias repetidas. Las secuencias repetidas en tándem están ampliamente distribuidas en los genomas eucariontes y muchos tipos de estas repeticiones han sido descritas. Otro aspecto común de los loci de secuencias repetidas es que el número de unidades repetidas, diferentes entre individuos, dan origen a arreglos de longitud variable. Los marcadores genéticos basados sobre número variable de repeticiones en tándem (VNTR's) son potencialmente muy polimórficos por el gran número de alelos que pueden existir. Los VNTR's más polimórficos (minisatélites) tiene unidades de repetición de entre 9 a 100 pares de bases y un arreglo total de 0.5 a 3 Kb. La mayor limitación de los minisatélites VNTR's es que ellos tienden a ser agrupados cerca de los telómeros y son por lo tanto de valor restringido en la construcción de un mapa genético completo. ⁽¹¹⁾

ANÁLISIS DE LOS MICROSATÉLITES

En un espacio de 5 años desde que el primer reporte informativo, miles de microsatélites han sido caracterizados y una alta resolución del mapeo de correlación genética del genoma humano se ha logrado. Los microsatélites han sido la herramienta clave en la investigación de enfermedades de herencia autosómica recesiva ya sea en laboratorios clínicos o de investigación. ^(9,12)

Las repeticiones cortas en tándem (por sus siglas en inglés Short Tandem Repeats STR's) son utilizadas en la ciencia forense, pruebas de identidad y el análisis de la estructura poblacional ^(2,7,17). Los marcadores STR son muy abundantes, con un alto grado de polimorfismo y técnicamente muy sencillos de analizar. ⁽¹²⁾

El primer polimorfismo de ADN que ha sido explotado en estudios de correlación genética fueron las variaciones en las secuencias de simples pares de bases, lo cual ocurrió dentro de los sitios de reconocimiento de una endonucleasa de restricción. Este polimorfismo podría ser fácilmente detectado en las secuencias variantes creadas o abolidas por los sitios de reconocimiento de la enzima o el tamaño de los fragmentos de restricción de longitud variable. Bolstein et al, propuso la construcción de mapas genéticos utilizando los fragmentos de restricción de longitud variable (RFLP's). Los RFLP's son ampliamente distribuidos a través del genoma, su utilidad es limitada en el área forense en virtud de la cantidad de ADN requerida para realizar el estudio. Los RFLP's son sólo dimórficos, la máxima heterocigocidad del 50% solo ocurre cuando ambos alelos son igualmente representados en una población. ⁽¹²⁾

os 80's una subclase de loci repetitivos fueron descritos con una unidad repetitiva de sólo 2 pares de bases – por eso les llamaron microsatélites --. Y no fue sino hasta 1989 que la naturaleza polimórfica de los microsatélites fue reconocida. Como con los VNTR's, los microsatélites varían entre individuos en el número de repeticiones en el arreglo. Su nomenclatura es informal y tal loci es diversamente llamado C's, o marcador de secuencia variable pequeña (VSSMs), simple secuencia repetida (SSRs), repetición dinucleótida. La unidad de repetición puede ser de 2 a 7 pares de bases y la repetición más común de los microsatélites es AC, AAAT, AG y AT, aún y cuando el más reconocido es la repetición dinucleótido (dC-dA/dG-dT), los microsatélites son extremadamente abundantes, encontrándose una frecuencia promedio estimada de 1 STR cada 6 Kb en la secuencia del genoma humano. Los microsatélites tienen claras ventajas sobre otros polimorfismos descritos. Los STR's comúnmente tienen múltiples alelos y muchos tienen una frecuencia de heterocigocidad de 70% o más, haciéndolos muy informativos para el análisis genético. En resumen, los loci son suficientemente pequeños y fáciles de analizar se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa. La importancia de este hecho fue ampliamente reconocido y los microsatélites rápidamente llegaron a ser marcadores de elección para muchas aplicaciones. ⁽⁹⁾

TIPIFICACIÓN DEL ADN

SISTEMAS DE TIPIFICACION (VNTR's y STR's).

Una larga porción de genoma humano consiste de secuencias repetitivas de ADN cuya característica polimórfica inherente, provee un banco molecular de datos que genera información para el diagnóstico médico e identificación forense. ⁽¹²⁾

Las secuencias repetitivas en tándem del ADN de una longitud que va de los dos pares de bases a miles de pares exhiben una alta variabilidad en el número de copias de estas repeticiones. Muchas de estas secuencias son polimórficas debido a la variación en la longitud de estas secuencias y han sido denominadas con varios nombres. ⁽¹²⁾

Los minisatélites de ADN, los cuales consisten de repeticiones polidispersas de un monómero de longitud intermedia (aproximadamente 9 a 100 pares de bases) usualmente miden unos pocos pares de bases en total y han sido utilizados para el desarrollo de marcadores de peso molecular basados en fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's). ⁽¹²⁾

Los microsatélites son pequeñas secuencias del ADN (menores a 300 pares de bases) que están compuestas por repeticiones en tándem de monómeros de 2 a 7 pares de bases de longitud que se encuentran dispersos a lo largo del genoma humano y que actualmente han llegado a ser el foco de atención en procedimientos de discriminación entre individuos. ⁽¹²⁾

... y cuando en análisis del ADN basado en los RFLP's ofrece un alto grado de discriminación, presenta algunas limitaciones. Cantidades relativamente altas (50 a 500 ng) de material genético no degradado son requeridas para el proceso, además, de ser necesario varios días o tal vez semanas para detectar los perfiles alélicos seguido esto, de una hibridación secuencial con sondas marcadas. Consecuentemente la tipificación del ADN basado en los RFLP's es un procedimiento lento y no fácil, que no puede ser realizado de forma automatizada. ⁽¹²⁾

... desarrollo de la tipificación del ADN con oligonucléotidos STR's, presenta incluso una ventaja sobre muchos de los sistemas de tipificación de AMP-FLP's y es su alta sensibilidad, debido a que el pequeño tamaño de los productos amplificados resultantes es más eficiente a partir de muestras altamente degradadas. ⁽¹²⁾

... unos minisatélites (VNTR's) y todos los microsatélites (STR's) pueden ser amplificados a través de un típico régimen de PCR y en este caso han sido referidos como fragmentos amplificados de longitud variable (AMP-FLP's) y Repeticiones cortas en tándem (STR's) respectivamente. ⁽¹²⁾

... utilización de los AMP-FLP's y STR's en la tipificación del ADN ofrece numerosas ventajas sobre el análisis convencional de RFLP. Primero, mínimas cantidades de ADN patrón, aún degradado, pueden ser utilizadas como una fuente de material inicial para el análisis. Segundo, largos tiempos de exposición autorradiográfica son necesarios para obtener resultados con los protocolos de RFLP. Los productos de los AMP-FLP son fácilmente resueltos en geles de poliacrilamida y detectados inmediatamente mediante tinción con plata. Debido a la longitud corta de los STR's los alelos pueden ser resueltos en geles secuenciales (poliacrilamida 6% [acrilamida-bisacrilamida 19:1]/ Urea 8M) ⁽¹³⁾,

ando oligonucléotidos radiomarcados, tinción con plata e identificación fluorescente ^(9,14). Tercero, los sistemas AMP-FLP y STR's pueden automatizarse. ⁽¹²⁾

repeticiones cortas en tándem (STR's) se clasifican en base al número de bases que los componen (ejemplo: en diméricas, triméricas, tetraméricas, etc. y se presentan en cada 300 a 500 kilobases en el cromosoma X humano y aparecen intercaladas con esta frecuencia a lo largo del genoma humano (aproximadamente 400 millones de loci). Numerosos sistemas de Repeticiones Cortas en Tándem (STR's) han sido documentados y muchos de estos sistemas han sido utilizados para estudiar el polimorfismo dentro de varias poblaciones. Se estima que el genoma humano contiene aproximadamente 500,000 STR's; de las cuales 6,000 a 10,000 consisten de repeticiones triméricas y tetraméricas, cada uno caracterizado dentro de un número limitado de alelos fácilmente identificables, los cuales colectivamente ofrecen un potencial ilimitado dando un alto poder de discriminación. ⁽¹²⁾

Amplificación de los STR's por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es procedimiento sencillo y fácil, debido a que el pequeño tamaño de las repeticiones cortas en tándem facilita el estudio simultáneo bajo una reacción múltiple de PCR, en el cual dos o más loci son amplificados en una serie de ciclos a partir de una sola muestra. ⁽¹²⁾

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Clonación de segmentos de ADN con el propósito de secuenciar nucleótidos era habitualmente un proceso laborioso. Sin embargo, en 1985 se desarrolló una técnica *in vitro*, llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para reproducir grandes cantidades de cualquier secuencia de ADN sin necesidad de clonar en organismos vivos. Este método que fue inventado por Kary Mullis, y finalmente aplicado por un grupo en el Departamento de Genética Humana de Cetus para la identificación de la secuencia β -globina y para el diagnóstico prenatal de anemia de células falciformes.

La capacidad de amplificar segmentos de ADN, es posible por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es un método *in Vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, utilizando dos cebadores que hibridan a cadenas opuestas flanqueando la región de interés en una cadena de ADN. Una serie repetitiva de ciclos envuelve la desnaturalización, alineación y la extensión de los oligonucleótidos por la ADN polimerasa, que resulta en una acumulación exponencial de fragmentos específicos cuyas terminaciones están definidas por el cebador final 5'. Debido a la hibridación del cebador unido a una cadena simple de ADN, esta nueva cadena sirve como base para el próximo, dando un número doble de copias de ADN en cada ciclo, por lo tanto en 20 ciclos de PCR producirán cerca de 1 millón de copias. ^(15,16)

Originalmente la PCR utilizó la ADN polimerasa de *E. coli* para polimerizar los oligonucleótidos alineados. Esta enzima era inactivada por altas temperaturas necesarias para separar las dos cadenas de ADN y por lo tanto en cada ciclo de la reacción era necesario adicionar enzima fresca. ⁽¹⁵⁾

introducción de la ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa) aislada de *Thermus aquaticus* transformo la PCR en una reacción simple y robusta la cual podría ahora ser automatizada utilizando un termociclador. Los componentes de la reacción (ADN, primers u oligonucleótidos, Taq polimerasa, dNTP's y buffer) podrían ser incorporados en la reacción de amplificación completándola con ciclos de temperatura. El uso de la Taq polimerasa simplifica el proceso de PCR además de incrementar la especificidad y el rendimiento de la reacción. ⁽¹⁵⁾

y cuando la PCR es considerada como un método primordial para la producción de copias de secuencias específicas, también es una vía poderosa y precisa para alterar una secuencia particular. Una propiedad importante de la PCR, particularmente en aplicaciones diagnósticas, es la capacidad de amplificar una secuencia de preparaciones de ADN nativo, así como de muestras ADN degradado. El ADN de una muestra no necesariamente debe ser químicamente puro para servir como patrón, pero debe contener ciertos inhibidores de la Taq polimerasa que no permite que se lleve a cabo la amplificación. ⁽¹⁷⁾

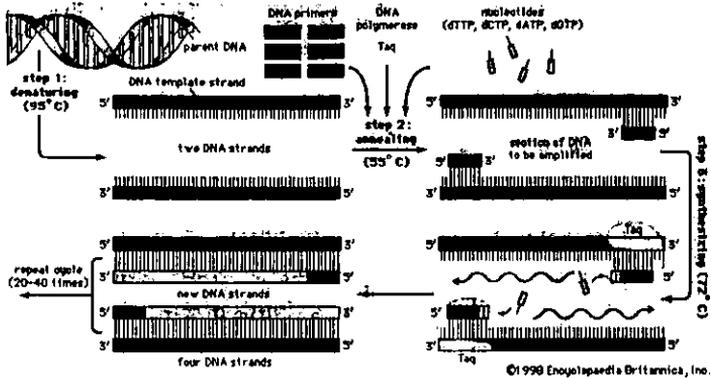
La posibilidad de contaminación en la reacción de amplificación puede ser una consecuencia con muchas implicaciones tanto para el área de investigación como para el área de diagnóstico, dada la capacidad de la PCR de sintetizar millones de copias de ADN, la contaminación de la muestra ya sea por productos o muestra de una previa reacción, material de una fuente exógena es un problema potencial, particularmente en aquellas reacciones iniciadas con solo una pequeña cantidad de la ADN. ⁽¹⁷⁾

pocos años desde su introducción la Reacción en Cadena de la Polimerasa ha llegado a ser una herramienta indispensable en muchas técnicas de investigación y su popularidad se debe principalmente a su aparente simplicidad y a la alta probabilidad de éxito. ⁽¹⁷⁾

En los próximos años, es probable que la técnica incremente su aplicación en muchos aspectos de clonación molecular. De hecho, una limitación del método es relativamente el alto nivel de no-incorporación. La Taq polimerasa carece de funciones editadas e incorpora un nucleótido incorrecto en un valor de 2×10^4 nucleótidos por ciclo en la reacción en cadena de polimerasa, este valor es cuatro veces más alto que el obtenido a partir de los fragmentos clonados por la ADN polimerasa I de E. coli. Este valor de no-incorporación se traslada en una frecuencia de error total de 0.25% en 30 ciclos de amplificación. La frecuencia de error aparece aumentada cuando hay la presencia de altas concentraciones de dNTP's y Mg^{++} . Esta no-incorporación ocurre a lo largo del producto amplificado y consiste en una transición o una transversión (pero no largas deleciones, mosaicos o inserciones). Estos errores ocasionales no son un problema cuando los productos de la entera reacción de amplificación son utilizados como sondas de hibridación o patrones para la secuenciación de ADN. Cualquier secuencia obtenida de esta manera debe ser confirmada, ya sea, por secuenciación de un número de clones recombinantes independientes, preferentemente generados de las dos últimas reacciones de amplificación separadas, o por la secuenciación de una mezcla de cadenas simples de ADN derivadas de 100 a 200 clones recombinantes. Esto elimina la posibilidad de que la no-incorporación no ocurra durante las tempranas descargas de la amplificación que puede aparecer en un clon derivado de una particular reacción de amplificación. ⁽¹⁷⁾

Para hacer evidentes los productos de la reacción enzimática, es necesaria, la aplicación de técnicas adicionales que nos permitan determinar la longitud de los productos obtenidos.

Esquema de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.



ELECTROFORESIS

Electroforesis es el nombre que recibe el transporte de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Es una técnica de separación, en la que las partículas cargadas son separadas por su diferente velocidad de migración cuando les es aplicado un gradiente de potencial. Las velocidades de migración son función de la densidad de carga por lo que se podrán separar unas partículas de otras de acuerdo a esta propiedad. A su vez, la densidad de carga de la partícula será función de una serie de parámetros que marcan las condiciones experimentales de la electroforesis: pH, fuerza iónica, intensidad de voltaje, interacciones con el soporte, etc. ⁽¹⁸⁾

FACTORES QUE AFECTAN LA MIGRACIÓN DE PARTICULAS

EFFECTO DEL pH DEL TAMPON (carga neta de la partícula)

La carga neta de las partículas en solución está determinada por el pH del tampón en que se encuentran, que es lo que decide el grado de ionización de las mismas y es el balance entre las cargas positivas y negativas de una partícula en solución. De acuerdo con este hecho, cuando una solución de partículas se coloca en el seno de un campo eléctrico, éstas migrarán hacia el ánodo o cátodo en función de la carga neta que posean, carga que depende del pH de la solución en la que se encuentran.

FUERZA IÓNICA DEL TAMPÓN

En la electroforesis, la corriente es acarreada por los iones presentes, tanto del tampón como las partículas en solución; por lo tanto, cuando más concentrado es el tampón mayor es la proporción de corriente transportada por los iones de éste, y menos por las propias partículas, que migrarán más rápido. Por otro lado, los iones en solución se encuentran rodeados por una nube iónica de los iones del tampón y se mueven todos juntos; si la concentración de los iones del tampón es muy alta, este fenómeno hará que las partículas que nos interesan migren más lentamente. ⁽¹⁸⁾

En resumen, la concentración del tampón que se elige para un proceso electroforético es la suficiente para que el tampón cumpla su doble función, que consiste en mantener un pH constante y transportar la corriente; una concentración mayor de la aconsejada provoca una migración más lenta de las partículas y una peor separación. ⁽¹⁸⁾

TAMAÑO Y FORMA DE LA PARTÍCULA

En el tipo de electroforesis, el tamaño y la forma de las partículas que se quieren separar pueden tener mayor o menor importancia y ser incluso factores más definitivos que la propia carga que poseen. Esto ocurre cuando para la electroforesis se emplean como soportes aquellos que permiten el paso selectivo de las moléculas según su tamaño, reteniendo las más grandes y dejando pasar las más pequeñas. ⁽¹⁸⁾

POTENCIAL DEL CAMPO ELÉCTRICO

Como hemos dicho que, para conseguir que las partículas en solución se muevan, vamos a aplicar una diferencia de potencial entre dos electrodos. También hemos dicho que la movilidad de la partícula es proporcional a su carga y al potencial del campo eléctrico; cuando más alto sea el potencial aplicado, más rápidamente se moverá la partícula. ⁽¹⁸⁾

EFEECTO SALINO

Un exceso de sales ya sea, en la mezcla de polimerización o en la muestra pueden afectar el pH del medio. Las muestras preparadas en soluciones salinas o en muestras preparadas por precipitación deben ser previamente desalinizadas por diálisis o cromatografía antes de la electroforesis. ⁽¹⁸⁾

GENÉTICA DE POBLACIONES

El Estudio de la Genética de Poblaciones

La genética de poblaciones es el estudio del comportamiento de los genes de las poblaciones. La genética de poblaciones implica la investigación de la adaptación de los organismos a ambientes estables o cambiantes, y por consiguiente el estudio del mecanismo de evolución. La evolución puede estudiarse a muchos niveles distintos, mediante diferentes aproximaciones, pero reducida a sus términos más sencillos es un proceso de cambio en la frecuencia de los genes. Por tanto, la ocupación central de los estudios de genética de poblaciones es la investigación de la dinámica del cambio de la frecuencia génica ⁽¹⁹⁾.

Algunos de los datos sobre las bases genéticas pueden ser utilizados para identificar a un individuo midiendo la raza, el color del cabello, la altura y/o el peso ⁽⁹⁾.

Algunas de estas características han sido bien establecidas sobre bases genéticas (ejemplo la raza) mientras que otras, tales como el peso tienen una contribución genética y del desarrollo. Estos datos son útiles para la identificación de un individuo en particular y dependen de que tan comunes son estas características en la población. Por ejemplo, el conocimiento de que un individuo tenga cabello café no puede ser utilizado para distinguirlo de otro individuo en una población típica ⁽⁹⁾.

De manera similar, la información contenida en el genotipo de una muestra encontrada en la escena del crimen puede ser exitosa para la identificación del criminal, solo si, un pequeño grupo de individuos en la población presenta ese genotipo. Los métodos utilizados para determinar las frecuencias o

La variabilidad de genotipos de individuos puede ser objetiva y calculable a partir de los principios básicos de la genética ⁽⁹⁾.

El proceso de definir estadísticamente la variación de un genotipo particular encontrado en una población biológica de interés cae dentro de la disciplina de la genética de poblaciones. La frecuencia de los genotipos son usualmente calculados por la regla de productos que consiste en un cálculo basado en la genética de poblaciones que permite multiplicar frecuencias alélicas y genotípicas individuales para generar un perfil genético. La aplicación de esta regla requiere de dos principios de la genética de poblaciones siendo obedecida la ley de Hardy Weinberg y la condición del equilibrio de correlación ⁽⁹⁾.

Los laboratorios asumen que la ley de Hardy Weinberg y el equilibrio de correlación son obedecidos cuando se calcula la variación genética de un locus en particular encontrado en la población de referencia. Por esta razón, es de suma importancia que los métodos científicos comúnmente aceptados para probar esta asimilación sean aplicados para la utilización de bases de datos en la ciencia forense.

LA LEY DE HARDY WEINBERG

El modelo de Hardy Weinberg es uno de los conceptos fundamentales en la genética de poblaciones ⁽¹⁰⁾. Establece que hay una relación predecible entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas en un simple locus. Esta es una relación matemática que permite estimar las frecuencias genotípicas en una población aun si este genotipo no se ha observado en la población actual ⁽²⁰⁾.

que se cumpla con el equilibrio de Hardy Weinberg se deben cumplir ciertas condiciones:

Que el tamaño de la población sea infinitamente grande y los apareamientos sean al azar. ⁽²¹⁾

No existe selección, cada genotipo bajo consideración puede sobrevivir tan bien como cualquier otro (no hay mortalidad diferencial) y cada genotipo es igualmente eficiente en la producción de la progenie.

La población es cerrada, es decir, no hay inmigración de individuos de otra población y tampoco se permite emigración de la población en estudio. ⁽²¹⁾

No hay mutación de un estado alélico a otro. Se permite la mutación si la tasa de mutación hacia adelante y la retromutación son equivalentes. ⁽²¹⁾

La meiosis es normal de tal forma que la probabilidad es el único factor que opera en la gametogénesis. ⁽²¹⁾

Supongamos que estamos tratando de un locus A, A' en el cual la frecuencia génica de A es p y la frecuencia de A' es q, de manera que $p + q = 1$. Existen tres genotipos AA, AA', A'A'. Sea la frecuencia de los genotipos d, 2h y r respectivamente, de manera que $d + 2h + r = 1$. Entonces cualesquiera que sean las frecuencias génicas y genotípicas que estén presentes de cumplirse que $p = d + h$ y $q = h + r$. Este es un punto importante; la notación simplemente afirma que la frecuencia génica p o q es el número total de alelos de este tipo expresado como fracción del número total de alelos presentes ⁽¹⁹⁾.

Cuando hay apareamiento al azar, cada individuo puede aparearse con un individuo de cualquiera de los tres genotipos con una probabilidad que depende de sus frecuencias genotípicas. El único otro proceso que tiene lugar es la segregación de la progenie en apareamientos entre progenitores distintos. Cuando las contribuciones de cada una de las clases de progenie se suman, las frecuencias AA, AA',

en la primera generación son respectivamente $(d + h)^2$, $2(d + h)(h + r)$ y $(h + h)^2$. Por lo tanto
 $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

EQUILIBRIO DE CORRELACION

El equilibrio de correlación se define como una condición de equilibrio en una población, donde la frecuencia genotípica multi-locus es el producto de cada locus por separado. Esto permite estimar el perfil del genético sobre numerosos loci, aun si el perfil no se ha observado en la población en estudio. Los genes que físicamente se encuentran cerca unos de otros en el mismo cromosoma se dice que son genéticamente correlacionados, los dos genes son unidos por una secuencia de ADN. Usualmente, los dos genes son reconocidos como una sola unidad, recibiendo la progenie donde un par es heredado a partir de la madre y otro del padre. Ocasionalmente, durante el proceso de la formación del gameto, el ADN entre los genes se romperá y un cromosoma híbrido se creará de los cromosomas maternos y maternos. Este proceso es denominado recombinación y es más factible que pase cuando los cromosomas se encuentran alejados ⁽⁹⁾.

Los humanos tienen 22 pares de cromosomas conocidos como autosomas los cuales son heredados independientemente de cada pariente y dos cromosomas sexuales. Hay dos formas de estos cromosomas el X y el Y, donde la mujer tiene dos copias del cromosoma X, mientras que los hombres poseen un cromosoma X y uno Y. El cromosoma Y tiene muy pocos genes, por lo tanto, los hombres tienen sólo una copia de cualquier gene encontrado en el cromosoma X y las mujeres dos copias de cada gen. Cuando los alelos de dos loci diferentes son estadísticamente independientes, se dice que ellos se encuentran en equilibrio de correlación. La correlación genética y el equilibrio de correlación no son el mismo concepto, aún y cuando, teóricamente están relacionados ⁽⁹⁾.

ANTEAMBIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales problemas en la administración y procuración de justicia es la identificación del individuo responsable de un presunto hecho delictuoso. Originalmente se utilizaban características observables como los rasgos fisonómicos para indiciar a una persona; sin embargo, estas características son mutables o temporales, por lo que el proceso de identificación era inconsistente y poco confiable. Después de mucho tiempo se inició con el estudio de " marcadores genéticos ". Entre los cuales se encontraban los grupos sanguíneos del sistema ABO y la tipificación enzimática de algunas proteínas que se presentaban en diferentes variantes polimórficas como la fosfoglucomutasa, la estearasa y la glioxilasa ^(16,20). La aplicación de estos sistemas de identificación dio entrada a la ciencia en el área forense a través de la bioquímica de proteínas, por lo que los resultados obtenidos fueron en adelante reproducibles y el grado de confiabilidad aumentó dramáticamente ^(9,20).

Sin embargo, la aplicación del estudio de las proteínas fue limitada, en virtud de que era necesario que la muestra se encontrara preservada en condiciones adecuadas para evitar la desnaturalización térmica, añadiendo a esto, los marcadores mencionados no se encuentran en todas las muestras biológicas, y por último, el grado de polimorfismo que permite únicamente excluir a un individuo como responsable de un presumible hecho delictuoso, pero presenta problemas si se le requiere adjudicar la responsabilidad ⁽²¹⁾. Esto, dicho en otras palabras indica que la aplicación del análisis de proteínas o marcadores proteicos es altamente confiable en la exclusión del presunto responsable, pero es muy poco confiable en el proceso de inclusión del individuo como responsable de un hecho delictuoso ⁽²¹⁾.

En 1985 se desarrolla una nueva tecnología de identificación de individuos basado en el estudio del ADN, denominada Reacción en Cadena de Polimerasa cuyas ventajas y aplicaciones son innumerables

Esto hizo que la mayor parte de muestras, incluso aquellas que no rindieran información proteica, sean susceptibles de ser analizadas. A partir del desarrollo de esta metodología se han realizado múltiples esfuerzos por diseñar técnicas más depuradas que permitan identificar de manera más fiable. Actualmente en el laboratorio de Genética Forense de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Jalisco se aplica la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y se analizan los genes polimórficos del HLA, LDLR, GYPA, HBGG, GC y un VNTR (D1S80).

Obstante, de que se tiene un alto poder de discriminación del 99.972% (Saavedra C. G. 1996, Luján S. 1998) el mismo proceso exige que la identificación se acerque más al 100%, por lo que es necesario que se estudie la distribución de frecuencias alélicas de marcadores con alto grado de polimorfismos.

Las secuencias repetitivas en tándem del ADN de una longitud de dos pares de bases a kilobases exhiben una alta variabilidad en el número de copias en tándem de las repeticiones. Muchas de estas secuencias son polimórficas debido a la variación en la longitud de las secuencias repetidas y han sido denominadas con varios nombres. Los loci con repeticiones de pocos pares de bases (ejemplo 2 pares de bases) comúnmente se denominan microsátélites o repeticiones cortas en tándem (STR's), mientras que aquellos loci con largas repeticiones se denominan minisátélites o número variable de repeticiones en tándem (VNTR's) ⁽⁹⁾.

Las unidades de repetición corta (STR's) representan una rica fuente de marcadores altamente polimórficos en el genoma humano que pueden ser amplificadas exitosamente por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incrementando precisamente la designación de alelos en una población encuestada sobre las bases de su secuencia de ADN ^(2,7,17,21), además de ser utilizados

en el mapeo físico y genético del genoma humano, diagnóstico de enfermedades e identificación personal en las ciencias médicas y forense ⁽¹²⁾.

Numerosos sistemas de Repeticiones Cortas en Tándem (STR's) han sido documentados y muchos de estos sistemas han sido utilizados para estudiar el polimorfismo de los genes dentro de varias poblaciones. Se estima que el genoma humano contiene aproximadamente 500, 000 STR's (6,000 a 10,000 consisten de repeticiones triméricas y tetraméricas), cada uno caracterizado por un número limitado de alelos fácilmente identificables, los cuales colectivamente ofrecen un potencial ilimitado de un altísimo poder de discriminación ⁽¹²⁾.

Por tal motivo, el sistema de identificación a través de las repeticiones cortas en tándem (STR's) proporciona un método que ofrece la posibilidad de discriminar a un individuo con un alto grado de precisión en una población determinada. Los resultados obtenidos a partir de estos marcadores comparados a los datos obtenidos a partir del análisis con los marcadores que se utilizan actualmente en el Laboratorio de Genética Forense de La PGJ del D.F., aumentan considerablemente la confiabilidad del resultado en el caso de que se trate de incluir o excluir, pero sobre todo incluir a un individuo como autor de la evidencia biológica recuperada de algún hecho delictuoso.

ETIVOS

ETIVO GENERAL

Analizar las frecuencias alélicas de seis loci CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA en una población del Valle de México.

OTESIS

Ho: Si la distribución de las frecuencias alélicas de los loci CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA denotan un alto polimorfismo en la población del Valle de México con un poder de discriminación $PD = (0.84)$ un poder de coincidencia al azar $PCA = 1$ en 733,000 y una heterocigocidad $H = 70\%$, entonces, estos loci pueden ser exitosamente utilizados como sistemas de identificación individual en la Criminalística.

Ha: Si la distribución de las frecuencias alélicas de los loci CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA no denotan un alto polimorfismo en la población del Valle de México con un poder de discriminación $PD = (0.84\%)$ un poder de coincidencia al azar $PCA = 1$ en 733,000 y una heterocigocidad $H = 70\%$, entonces, estos loci no podrán ser exitosamente utilizados como sistemas de identificación individual en la Criminalística.

ETIVOS

ETIVO GENERAL

Analizar las frecuencias alélicas de seis loci CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA en una población del Valle de México.

OTESIS

Ho: Si la distribución de las frecuencias alélicas de los loci CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA denotan un alto polimorfismo en la población del Valle de México con un poder de discriminación $PD = (0.84)$ un poder de coincidencia al azar $PCA = 1$ en 733,000 y una heterocigocidad $H = 70\%$, entonces, estos loci pueden ser exitosamente utilizados como sistemas de identificación individual en la Criminalística.

Ha: Si la distribución de las frecuencias alélicas de los loci CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA no denotan un alto polimorfismo en la población del Valle de México con un poder de discriminación $PD = (0.84\%)$ un poder de coincidencia al azar $PCA = 1$ en 733,000 y una heterocigocidad $H = 70\%$, entonces, estos loci no podrán ser exitosamente utilizados como sistemas de identificación individual en la Criminalística.

DEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

DO DE ESTUDIO

Observacional

Prospectivo

Transversal

Descriptivo

LACIÓN

La muestra sujeta al estudio fue de 100 personas sin parentesco que serán invitadas a participar en dicho estudio poblacional.

Las muestras biológicas de cada individuo que se someterán al estudio serán Sangre o Saliva.

Las muestras se recolectarán de individuos nacidos en el Distrito Federal, la identidad de los voluntarios se mantendrá en total anonimato.

ERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluirá a cualquier persona haciendo caso omiso de edad, sexo, religión, etc. siempre y cuando hayan nacido en el D.F. y acceda a donar voluntariamente una de las muestras biológicas propuestas.

ERIOS DE EXCLUSIÓN

No se analizarán muestras provenientes de personas que refieran parentesco biológico entre ellos, o de personas que no hallan nacido en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

ERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras que no rindan la suficiente cantidad de material genético para realizar el estudio.

Muestras que al momento de ser analizadas muestren rastros de material biológico procedente de mas de una persona.

METODOLOGÍA

MATERIAL Y EQUIPO

EQUIPO

Termociclador 480 o Termociclador 9600 GeneAmp®
Aparato de electroforesis para geles de secuenciación
Fuente de poder
Banco de calentamiento seco, 95°C
Microcentrifuga
Rotador orbital
Vertex

REACTIVOS

ADN polimerasa
BMACOTE (Sigma, St. Louis, MO.)
Acetilacetiloxipropiltrimetoxisilano. (Sigma, St. Louis, MO.)
Suave libre de Nucleasas
MED
Aceite Mineral

SOLUCIONES

Sulfato de sodio 10 mg/ml
Solución fijadora
Solución de AgNO₃
Solución desarrolladora
Solución acrilamida-bisacrilamida al 40%
Solución (etanol 95% / ácido acético 5%)
Sulfato de amonio al 10%
 amortiguador TBE 10X

ACCESORIOS ADICIONALES

Paradores de vinil de 0.4 mm de espesor

Tran

Platos de microcentrifuga de 0.5 ml

Placas estériles de 5, 20, 100, 200 y 1000 μ l

Platos de cristal y espaciadores

EXTRACCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN CON CHELEX (25,26,27,28)

Se adiciono a un tubo estéril de microcentrifuga:

3 a 300 μ l de sangre total.

9 a 25 mm² de una porción de una mancha de sangre.

Se adiciono 1 ml de agua desionizada y estéril al tubo. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mezclar ocasionalmente por inversión o en vortex.

Se centrifugo las muestras a 15,000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente.

Se removi6 todo el sobrenadante a excepción de 30 μ l de cada muestra y deseche. Si la muestra es mancha de sangre, no remueva el soporte de la mancha.

Se adiciono Chelex al 5% hasta un volumen final de 200 μ l.

Se incubo las muestras a 56°C por 20 minutos.

Agitar las muestras en vortex de 5 a 10 segundos.

Se incubo las muestras a 100°C durante 8 minutos.

Agitar las muestras en vortex de 5 a 10 segundos.

Se centrifugo las muestras a 15,000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente.

Las muestras est6n listas para el proceso de amplificaci6n.

Se almaceno el tubo en congelaci6n.

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ADN CON AMORTIGUADOR DE LISIS CELULAR (Cell Lysis) Y PROTEINASA K

(27,28)

Se colocó dentro de un tubo estéril de microcentrifuga:

a) 300 μ l de sangre total.

b) 25 mm² de una porción de una mancha de sangre.

Se adiciono 0.5 ml de Amortiguador de lisis al tubo de microcentrifuga. Centrifugue las muestras a 10,000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente.

Cuidadosamente se removió y desecho todo el sobrenadante de cada muestra.

Con una pipeta estéril se adiciono 1.0 ml de Amortiguador de lisis para resuspender el botón. Agitar por vortex durante 30 segundos.

Se repitieron los pasos 2 a 4 en dos ocasiones más.

Se centrifugaron las muestras a 15,000 x g por 20 segundos a temperatura ambiente.

Se eliminó el sobrenadante de cada muestra por inversión del tubo.

Se adiciono 0.5 ml de Amortiguador de digestión y 3 μ l de Proteinasa K en cada muestra.

Se incubo el tubo a 60°C durante 1 hora.

Se incuban las muestras a 95°C por 10 minutos para inactivar la Proteinasa K.

LIFICACIÓN

utilizó de 1 a 25 ng de ADN de la muestra en 25 μ l de mezcla de reacción utilizando el siguiente protocolo:

se preparo la mezcla maestra de la siguiente manera:

Mezcla Maestra	Volumen por muestra μl
Agua estéril	17.35
STR 10X Buffer	2.50
Multiplex 10X primer pair mix.	2.50
Taq ADN polimerasa (asumiendo 5 u/ μ l)	0.15 (0.75 u)
Volumen total	22.50

se adiciono 22.5 μ l de mezcla maestra en cada tubo y se colocaron sobre hielo.

se adiciono de 1 a 25 ng de ADN de la muestra extraida en cada tubo.

se adiciono 2.5 μ l de ADN K562 dentro de un tubo de microcentrifuga de 0.5 ml, conteniendo 22.5 μ l mezcla maestra, que fue utilizado como control positivo en la amplificación.

se adiciono 2.5 μ l de agua estéril dentro de un tubo de microcentrifuga de 0.5 ml, conteniendo 22.5 μ l mezcla maestra, que fue utilizado como control negativo en la amplificación.

se adiciono 1 gota de aceite mineral a cada tubo y se cerraron.

se centrifugaron las muestras brevemente para llevar el contenido al fondo del tubo.

se colocaron los tubos en el termociclador.

PARÁMETROS DE LA AMPLIFICACION ⁽²⁸⁾

Se seleccionaron los siguientes parámetros para la amplificación

96°C 2 minutos, después Precalentamiento

94°C 1 minuto

Desnaturalización

64°C 1 minuto

Alineación de oligonucleótidos

70°C 1.5 minutos

Elongación de la cadena

10 ciclos, después

90°C por 1 minuto

Desnaturalización

64°C por 1 minuto

Alineación de oligonucleótidos

70°C por 1.5 minutos

Elongación de la cadena.

Por 20 ciclos

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA PARA VERIFICAR RENDIMIENTO DE AMPLIFICACION

Se preparó un gel de agarosa al 2% adicionando 2.0 g de agarosa en 100 ml de Amortiguador TAE. Se marco el nivel del líquido en el contenedor, después de llevar a ebullición se adiciono agua ionizada precalentada a 60°C para recuperar el volumen inicial.

Se enfrió la agarosa a 55°C antes de colocarla en el contenedor del gel. Asegúrese se encuentre frío. Se adiciono la agarosa y se insertó el peine, permita reposar de 20 a 30 minutos.

Se prepararon las muestras mezclando 10 µl del producto de PCR en 2.5 µl de Loading Solution

Se preparo un litro de TAE 1X como Amortiguador de corrimiento electroforético.

Se coloco la charola y el gel dentro de la cámara de electroforesis, se adiciono el amortiguador al tanque. El amortiguador debe cubrir el gel con una altura de 0.65 cm. Cuidadosamente poner el peine.

Se colocó cada una de las muestras mezcladas con Loading Solution 5X en cada uno de los respectivos pozos del gel.

Se selecciono un voltaje de 5 V/cm. Permitir el corrimiento del gel por 1 horas.

Después de la electrofóresis, teñir el gel en TAE 1X conteniendo 0.5 mg/ml de bromuro de etidio. Agitar en un agitador orbital durante 20 minutos a temperatura ambiente. Remover la solución de bromuro de etidio y reemplácela con agua. Agitar durante 20 minutos.

Utilizando un transiluminador se verificó la presencia del producto amplificado y fotografíe el gel

PREPARACION DEL GEL DE POLIACRILAMIDA ⁽²⁸⁾

El siguiente protocolo es para la preparación de un gel desnaturalizante de poliacrilamida con dimensiones de 31 cm de ancho x 38 cm de largo x 0.4 mm de espesor.

Cada uno de los cristales fue marcado en una de las esquinas con lápiz diamante para distinguir el cristal que será tratado. Se limpió los cristales con etanol al 95%.

Utilizando guantes, se aplicó 3 ml de SIGMACOTE™ al lado seleccionado del cristal largo y se extendió sobre toda la superficie del cristal mediante movimientos circulares.

Esperar 5 minutos a que seque. Se removió el exceso con una toalla saturada con agua desionizada. Finalmente se secó el cristal con una toalla.

En una campana de extracción, se preparó binding solution por la adición de 3 μ l de silano a 1 ml de ácido acético 0.5% - etanol 95% en un tubo de microcentrifuga.

Se aplicó mediante movimientos circulares sobre toda la superficie del cristal. Se limpió la superficie 4 veces con etanol al 95% para remover el exceso de binding solution.

Se ensamblaron los cristales colocando los separadores de 0.4 mm entre ellos, teniendo cuidado de que las superficies tratadas no entren en contacto para evitar la contaminación y se colocaron los cristales ensamblados en la trampa para geles.

Se preparó la solución de acrilamida de la siguiente manera:

Componentes	Gel de Poliacrilamida al 4%	Concentración final
Urea	31.50 ml	7 M
Agua desionizada	40.00 ml	--
TBE 10X	3.75 ml	0.5 X
40% acrilamida:bis (19:1)	7.50 ml	4%
Volumen total	75 ml	

Se filtro la solución de acrilamida con un filtro de 0.2 micrones.

Se adiciono la solución de acrilamida en un vaso de precipitado y además 50 μ l de TEMED y 500 μ l persulfato de amonio y se agitó brevemente.

Se adiciono la solución de acrilamida entre los cristales.

Se posiciono el gel horizontalmente, descansando sobre un soporte a un ángulo de 30°.

Se insertó el peine entre los cristales.

La acrilamida restante se puso en un tubo cónico utilizándolo como control de polimerización.

Se permitió que la polimerización durante una hora.

CORRIMIENTO DEL GEL DE POLIACRILAMIDA ⁽²⁸⁾

Se removió la trampa del gel polimerizado y se limpio los cristales con toallas saturadas con agua destilada.

Se elimino cualquier exceso de poliacrilamida de los cristales.

Se adiciono Amortiguador TBE 0.5X al recipiente inferior de la cámara de electrofóresis.

Se posiciono el gel sobre la cámara de electrofóresis.

Asegurar el gel a la cámara de electrofóresis.

Se adiciono Amortiguador TBE 0.5X al recipiente superior de la cámara de electrofóresis.

Utilizando una jeringa, se removió las burbujas de aire de la parte superior del gel y con una aguja número 19 se removió las burbujas de aire entre los cristales de la parte inferior del gel.

Se realizó el pre-corrimento hasta que la superficie del gel alcance una temperatura de 50°C.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ⁽²⁸⁾

Se preparó las muestras de PCR mezclando 2.5 μ l de cada muestra con 2.5 μ l de Loading solution

Se adiciono 2.5 μ l (50 ng) de ADN marcador pGEM a 2.5 μ l de Loading Solution.

Se adiciono 2.5 μ l de STR ladder a 2.5 μ l de Loading Solution.

Se centrifugo brevemente las muestras para llevar el contenido al fondo del tubo.

APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS ⁽²⁸⁾

Se desnaturalizó las muestras por calentamiento a 95°C por 2 minutos e inmediatamente se enfriaron sobre hielo.

Después del pre-corrimiento, se utilizó una jeringa llena con buffer para enjuagar los pozos y remover la urea.

Se aplicó 3 µl de cada muestra en sus respectivos pozos. El proceso de aplicación no debe tardar más de 20 minutos.

ELECTROFORESIS DEL GEL ⁽²⁸⁾

Cuando se terminó la aplicación, se corrió el gel utilizando las mismas condiciones que las del pre-corrimiento.

En un gel de poliacrilamida al 4% el azul de bromofenol migra al mismo tiempo que un fragmento de ADN de 40 bases.

Conociendo los rangos de tamaño de cada locus y las características de migración, detener la electroforesis cada vez que el locus de interés a pasado el punto medio del gel.

DESARROLLO CON NITRATO DE PLATA ^(12,14,28)

Después de la electroforesis, se vació el buffer de los recipientes y se removieron los cristales del nitrato.

Se colocaron los cristales sobre una superficie plana y se removió el peine y los separadores. Con la ayuda de una pala de plástico se separaron cuidadosamente los cristales. El gel debió quedar perfectamente unido a cristal corto.

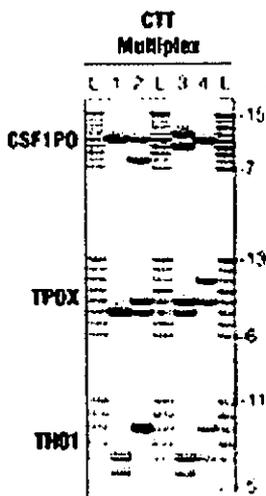
Se colocó el gel en una charola de plástico.

La tinción se desarrollo de la siguiente forma:

Paso	Solución	Tiempo
a	Solución fijadora	20 minutos
b	Agua desionizada	2 minutos
c	Repetir paso b, dos veces	2 x 2 minutos
d	Solución staining	30 minutos
e	Agua desionizada	10 segundos
f	Solución de desarrollo	5 minutos
g	Solución fijadora	5 minutos
h	Agua desionizada	2 minutos

Se permitió que el gel se seque y se analizó la información revelada.

Esquema del gel de poliacrilamida revelado con nitrato de plata conteniendo tres loci con sus respectivos alelos.



SULTADOS

determinaron las frecuencias alélicas de 100 muestras sanguíneas obtenidas a partir de personas icadas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México amplificando los loci CSF1P0, TPOX, TH01, BA01, FESFPS y vWA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y detectándolos por dio de un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.

Tabla 1.1 Frecuencias Alélicas Locus CSF1P0
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Alelo	Frecuencia	Observado
8	0.0250	5
9	0.1000	20
10	0.2400	48
11	0.3550	71
12	0.2400	48
13	0.0400	8
	1.0000	200

Gráfico 1.1 Frecuencias Alélicas de la Zona
Metropolitana de la Ciudad de México.

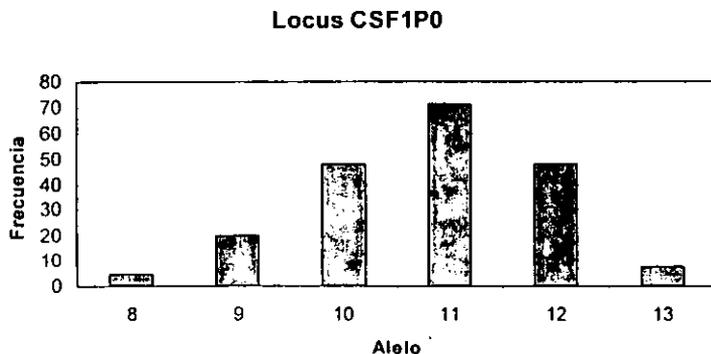


Tabla 1.2 Frecuencias Alélicas Locus TPOX
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Alelo	Frecuencia	Observado
7	0.0050	1
8	0.5500	110
9	0.0450	9
10	0.0350	7
11	0.2400	48
12	0.1200	24
13	0.0050	1
	1.0000	200

Grafico 1.2 Frecuencias Alélicas de la Zona
Metropolitana de la Ciudad de México.

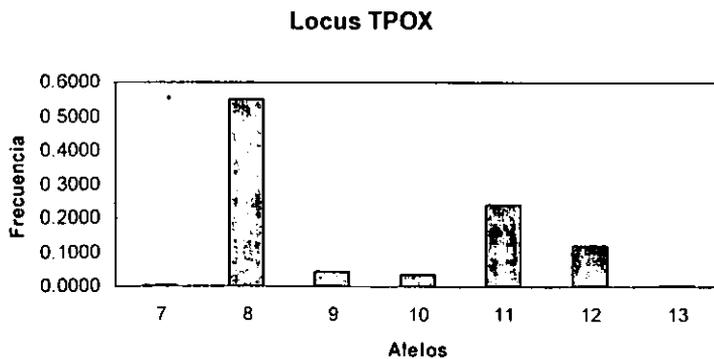


Tabla 1.3 Frecuencias Alélicas Locus TH01
 En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Alelo	Frecuencia	Observado
5	0.0150	3
6	0.2250	45
7	0.3900	78
8	0.0900	18
9	0.0800	16
9.3	0.0900	18
10	0.1100	22
	1.0000	200

Grafico 1.3 Frecuencias Alélicas de la Zona
 Metropolitana de la Ciudad de México.

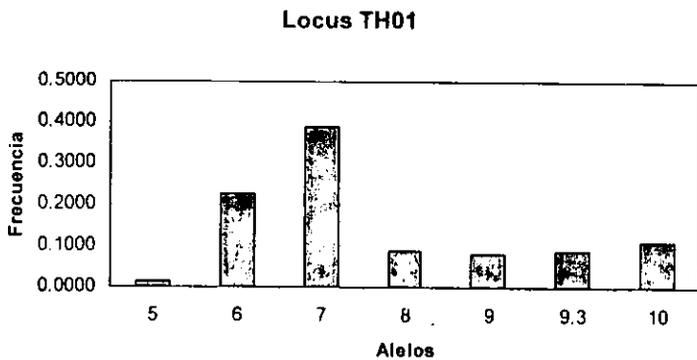


Tabla 1.4 Frecuencias Alélicas Locus F13A01
 En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Alelo	Frecuencia	Observado
3.2	0.1150	23
4	0.1000	20
5	0.2500	50
6	0.1650	33
7	0.2500	50
8	0.0800	16
9	0.0050	1
12	0.0050	1
13	0.0100	2
14	0.0050	1
15	0.0100	2
16	0.0050	1
	1.0000	200

Gráfico 1.4 Frecuencias Alélicas de la Zona
 Metropolitana de la Ciudad de México.

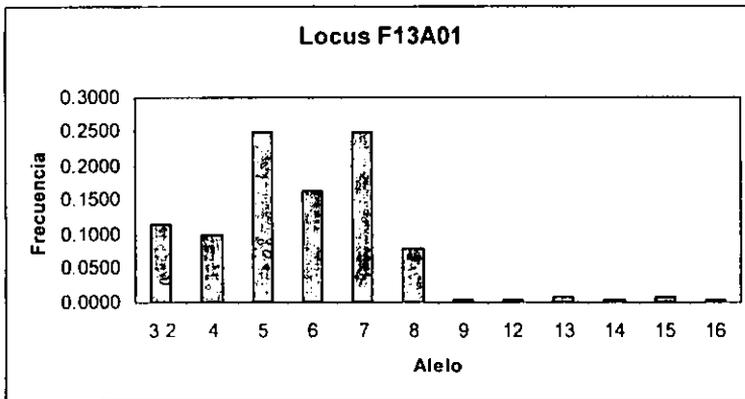


Tabla 1.5 Frecuencias Alélicas Locus FESFPS
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Alelo	Frecuencia	Observado
8	0.0050	1
9	0.0050	1
10	0.1850	37
11	0.4800	96
12	0.1900	38
13	0.1050	21
14	0.0300	6
	1.0000	200

Gráfico 1.5 Frecuencias Alélicas de la Zona
Metropolitana de la Ciudad de México.

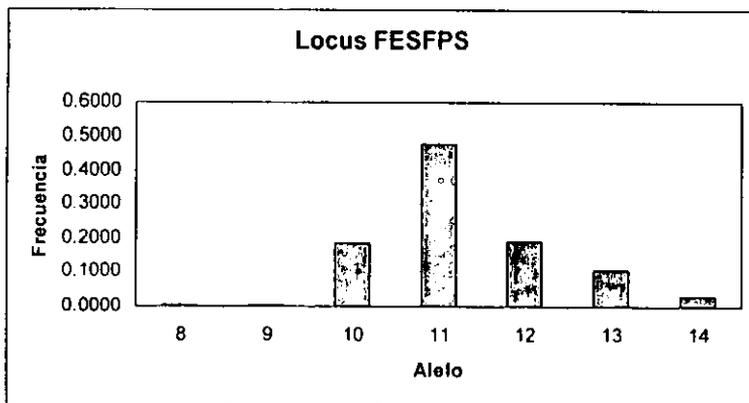
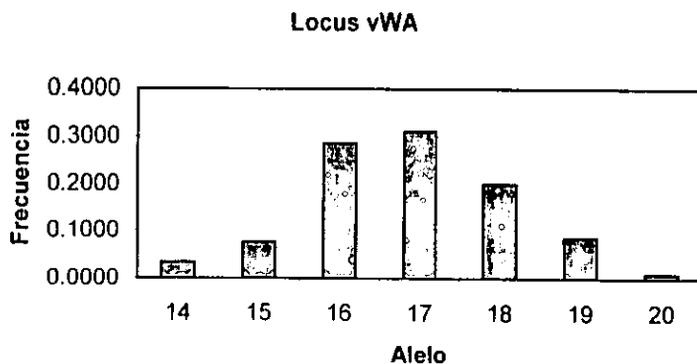


Tabla 1.6 Frecuencias Alélicas Locus vWA
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Alelo	Frecuencia	Observado
14	0.0350	7
15	0.0750	15
16	0.2850	57
17	0.3100	62
18	0.2000	40
19	0.0850	17
20	0.0100	2
	1.0000	200

Grafico 1.6 Frecuencias Alélicas de la Zona
Metropolitana de la Ciudad de México.



SULTADOS

Se han determinadas las frecuencias genotípicas de 100 muestras analizando los productos de PCR de los loci CSF1P0, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA mediante la reacción en cadena de la polimerasa obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 2.1 Frecuencias Genotípicas Locus CSF1P0
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Genotipo	Observado	Frecuencia Genotípica
8,10	1	0.010
8,11	2	0.020
8,12	2	0.020
9,9	1	0.010
9,10	2	0.020
9,11	10	0.100
9,12	5	0.050
9,13	1	0.010
10,10	6	0.060
10,11	17	0.170
10,12	14	0.140
10,13	2	0.020
11,11	14	0.140
11,12	12	0.120
11,13	2	0.020
12,12	6	0.060
12,13	3	0.030
	100	1.000

Gráfico 2.1 Frecuencias Genotípicas de la Zona
Metropolitana de la Ciudad de México.

Locus CSF1P0

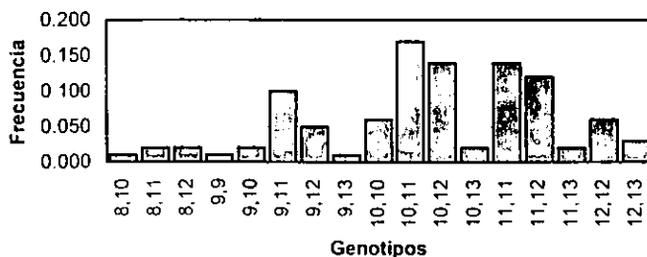


Tabla 2.2 Frecuencias Genotípicas Locus TPOX
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Genotipo	Observado	Frecuencia Genotípica
7,8	1	0.010
8,8	29	0.290
8,9	6	0.060
8,10	2	0.020
8,11	32	0.320
8,12	11	0.110
9,11	2	0.020
9,12	1	0.010
10,11	3	0.030
10,12	2	0.020
11,11	3	0.030
11,12	5	0.050
12,12	2	0.020
12,13	1	0.010
	100	1.000

Grafico 2.2 Frecuencias Genotípicas de la Zona
Metropolitana de la Ciudad de México.

Locus TPOX

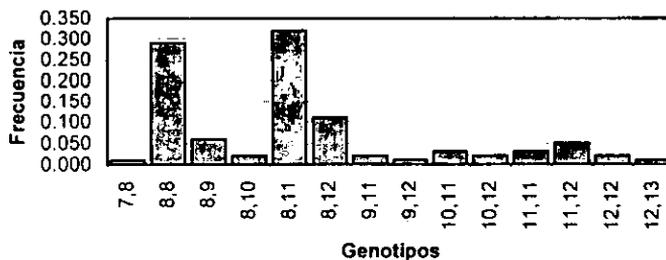


Tabla 2.3 Frecuencias Genotípicas Locus TH01
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Genotipo	Observado	Frecuencia Genotípica
5,6	1	0.010
5,7	2	0.020
6,6	6	0.060
6,7	14	0.140
6,8	3	0.030
6,9	3	0.030
6,9,3	8	0.080
6,10	4	0.040
7,7	15	0.150
7,8	7	0.070
7,9	4	0.040
7,9,3	7	0.070
7,10	14	0.140
8,9	3	0.030
8,9,3	3	0.030
8,10	2	0.020
9,9	2	0.020
9,10	2	0.020
	100	1.000

Gráfico 2.3 Frecuencias Genotípicas de la Zona
Metropolitana de la Ciudad de México.

Locus TH01

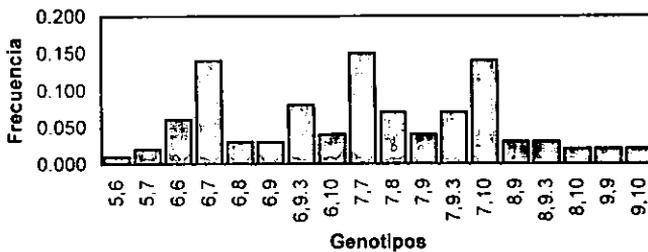


Tabla 2.4 Frecuencias Genotípicas Locus F13A01
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Genotipo	Observado	Frecuencia Genotípica
3,2,3,2	1	0.010
3,2,4	2	0.020
3,2,5	6	0.060
3,2,6	6	0.060
3,2,7	6	0.060
3,2,8	1	0.010
4,4	2	0.020
4,5	3	0.030
4,6	2	0.020
4,7	6	0.060
4,9	1	0.010
4,12	1	0.010
4,13	1	0.010
5,5	6	0.060
5,6	9	0.090
5,7	11	0.110
5,8	7	0.070
5,14	1	0.010
5,15	1	0.010
6,6	3	0.030
6,7	5	0.050
6,8	3	0.030
6,15	1	0.010
6,16	1	0.010
7,7	9	0.090
7,8	3	0.030
7,13	1	0.010
8,8	1	0.010
	100	1.000

Gráfico 2.4 Frecuencias Genotípicas de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Locus F13A01

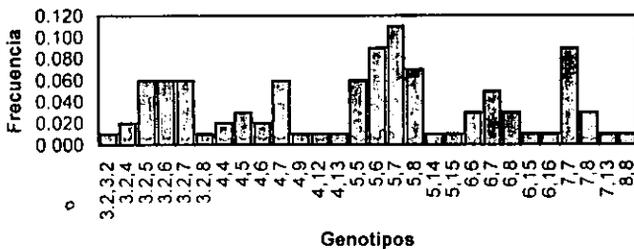
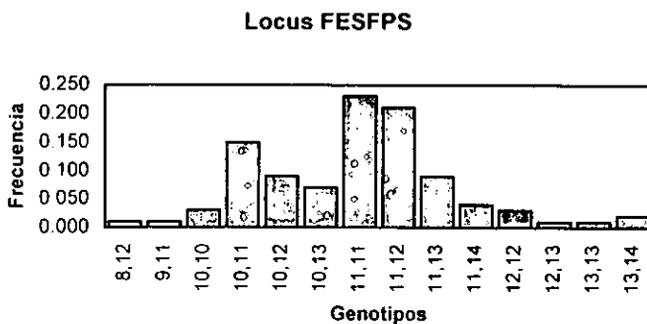


Tabla 2.5 Frecuencias Genotípicas Locus FESFPS
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Genotipo	Observado	Frecuencia Genotípica
8,12	1	0.010
9,11	1	0.010
10,10	3	0.030
10,11	15	0.150
10,12	9	0.090
10,13	7	0.070
11,11	23	0.230
11,12	21	0.210
11,13	9	0.090
11,14	4	0.040
12,12	3	0.030
12,13	1	0.010
13,13	1	0.010
13,14	2	0.020
	100	1.000

Gráfico 2.5 Frecuencias Genotípicas Locus FESFPS de la
Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

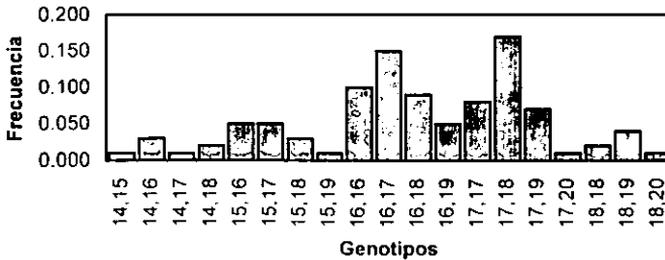


**Tabla 2.6 Frecuencias Genotípicas Locus vWA
En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.**

Genotipo	Observado	Frecuencia Genotípica
14,15	1	0.010
14,16	3	0.030
14,17	1	0.010
14,18	2	0.020
15,16	5	0.050
15,17	5	0.050
15,18	3	0.030
15,19	1	0.010
16,16	10	0.100
16,17	15	0.150
16,18	9	0.090
16,19	5	0.050
17,17	8	0.080
17,18	17	0.170
17,19	7	0.070
17,20	1	0.010
18,18	2	0.020
18,19	4	0.040
18,20	1	0.010
	100	1.000

**Tabla 2.6 Frecuencias Genotípicas de la
Zona Metropolitana de la Ciudad de México.**

Locus vWA



SULTADOS

Comparación entre las frecuencias alélicas de tres poblaciones (Afro-Americanos, Caucásico-Americanos e Hispano-Americanos) con las frecuencias alélicas obtenidas a partir de muestras de personas que radican en la Zona Metropolitana del Distrito Federal en la Ciudad de México.

Tabla 1.1 Comparación de las frecuencias alélicas de diferentes poblaciones Locus CSF1P0

Locus CSF1P0								
Alelo	Zona Metropolitana		Hispano-Americanos		Caucásico-Americanos		Afro-Americanos	
	FA	N	FA	N	FA	N	FA	N
6	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0
7	0.000	0	0.002	1	0.000	0	0.069	28
8	0.0250	5	0.005	2	0.002	1	0.069	28
9	0.1000	20	0.025	11	0.033	14	0.037	15
10	0.2400	48	0.238	103	0.254	106	0.280	113
11	0.3550	71	0.294	127	0.306	128	0.223	90
12	0.2400	48	0.361	156	0.330	138	0.267	108
13	0.0400	8	0.007	26	0.062	26	0.050	20
14	0.0000	0	0.007	3	0.012	5	0.002	1
15	0.0000	0	0.007	3	0.000	0	0.002	1
Todos	1.000	200	1.000	444	1.000	418	1.000	404

Tabla 1.1.2 Comparación de las frecuencias alélicas de diferentes poblaciones Locus TPOX

Locus TPOX								
Alelo	Zona Metropolitana		Hispano-Americanos		Caucásico-Americanos		Afro-Americanos	
	FA	N	FA	N	FA	N	FA	N
6	0.000	0	0.005	2	0.002	1	0.051	21
7	0.0050	1	0.002	1	0.000	0	0.037	15
8	0.5500	110	0.498	215	0.524	219	0.350	143
9	0.0450	9	0.090	39	0.096	40	0.186	76
10	0.0350	7	0.053	23	0.055	23	0.108	44
11	0.2400	48	0.248	107	0.285	119	0.216	88
12	0.1200	24	0.104	45	0.038	16	0.051	21
13	0.0050	1	0.000	0	0.000	0	0.000	0
Todos	1.000	200	1.000	432	1.000	418	1.000	408

Tabla 1.1.3 Comparación de las frecuencias alélicas de diferentes poblaciones Locus TH01

Locus TH01								
Alelo	Zona Metropolitana		Hispano-Americanos		Caucásico-Americanos		Afro-Americanos	
	FA	N	FA	N	FA	N	FA	N
5	0.0150	3	0.000	0	0.007	3	0.005	2
6	0.225	45	0.238	103	0.239	100	0.157	64
7	0.390	78	0.310	134	0.141	59	0.373	152
8	0.090	18	0.081	35	0.120	50	0.230	94
9	0.080	16	0.141	61	0.153	64	0.125	51
9.3	0.090	18	0.220	95	0.335	140	0.091	37
10	0.110	22	0.009	4	0.005	2	0.020	8
11	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0
Todos	1.000	200	1.000	432	1.000	418	1.000	408

Tabla 1.1.4 Comparación de las frecuencias alélicas de diferentes poblaciones Locus F13A01

Locus F13A01								
Alelo	Zona Metropolitana		Hispano-Americanos		Caucásico-Americanos		Afro-Americanos	
	FA	N	FA	N	FA	N	FA	N
3.2	0.115	23	0.225	100	0.084	35	0.087	38
4	0.100	20	0.113	50	0.041	17	0.076	33
5	0.250	50	0.227	101	0.211	88	0.342	149
6	0.165	33	0.164	73	0.285	119	0.131	57
7	0.250	50	0.227	101	0.330	138	0.195	85
8	0.080	16	0.014	6	0.017	7	0.067	29
9	0.005	1	0.000	0	0.000	0	0.009	4
10	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.005	2
11	0.000	0	0.007	3	0.000	0	0.009	4
12	0.005	1	0.000	0	0.002	1	0.011	5
13	0.010	2	0.005	2	0.005	2	0.032	14
14	0.005	1	0.005	2	0.017	7	0.021	9
15	0.010	2	0.007	3	0.010	4	0.014	6
16	0.005	1	0.007	3	0.000	0	0.002	1
Todos	1.000	200	1.000	444	1.000	418	1.000	436

Tabla 1.1.5 Comparación de las frecuencias alélicas de diferentes poblaciones Locus FESFPS

Locus FESFPS								
Alelo	Zona Metropolitana		Hispano-Americanos		Caucásico-Americanos		Afro-Americanos	
	FA	N	FA	N	FA	N	FA	N
7	0.000	0	0.002	1	0.000	0	0.009	4
8	0.005	1	0.012	5	0.014	6	0.106	46
9	0.005	1	0.010	4	0.007	3	0.050	26
10	0.185	37	0.176	74	0.285	121	0.242	105
11	0.480	96	0.452	190	0.441	187	0.355	154
12	0.190	38	0.233	98	0.222	94	0.182	79
13	0.105	21	0.110	46	0.028	12	0.044	19
14	0.030	0	0.005	2	0.002	1	0.002	1
Todos	1.000	200	1.000	420	1.000	424	1.000	434

Tabla 1.1.6 Comparación de las frecuencias alélicas de diferentes poblaciones Locus vWA

Locus vWA								
Alelo	Zona Metropolitana		Hispano-Americanos		Caucásico-Americanos		Afro-Americanos	
	FA	N	FA	N	FA	N	FA	N
11	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.007	3
12	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.000	0
13	0.000	0	0.005	2	0.000	0	0.011	5
14	0.0350	7	0.066	28	0.127	54	0.062	27
15	0.0750	15	0.100	42	0.083	35	0.213	93
16	0.2850	57	0.296	125	0.212	90	0.264	115
17	0.3100	62	0.273	115	0.267	113	0.206	90
18	0.2000	40	0.166	70	0.203	86	0.144	63
19	0.0850	17	0.078	33	0.087	37	0.073	32
20	0.0100	2	0.017	7	0.021	9	0.016	7
21	0.000	0	0.000	0	0.000	0	0.002	1
Todos	1.000	200	1.000	422	1.000	424	1.000	436

RESULTADOS

Parámetros utilizados en el Área Forense, formulas y resultados:

H = Homocigotos

Gi = Fracción de muestras con el genotipo " i "

h = Heterocigotos

Pi = Fracción de alelos del tipo Pi

Índice de Paternidad Típico = $(H+h)/2H$

Poder de Exclusión = $h^2(1-2*h*H^2)$

Probabilidad de Coincidencia al Azar = $\sum_{i=1}^n G_i^2$

Poder de Discriminación = $1 - \sum_{i=1}^n G_i^2$

$$= 1 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P_{ij}^2 - \left(\left(\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P_{ij}^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n P_{ij}^4 \right)$$

Tabla 3.1 Parámetros estadísticos utilizados en el área forense y determinación de la paternidad Determinados para la población de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México¹

Prueba	CSF1P0	TPOX	TH01	F13A01	FESFPS	VWA
PC	0.105	0.208	0.090	0.060	0.145	0.093
Expresado 1 en....	9.5	4.8	11.1	16.8	6.9	10.8
PD	0.895	0.792	0.910	0.940	0.855	0.907
ICP	0.70	0.57	0.73	0.79	0.65	0.73
PE	0.476	0.369	0.545	0.562	0.428	0.59904
IPT	1.85	1.47	2.17	2.27	1.67	2.50
Homocigotos	27.0%	34.0%	23.0%	22.0%	30.0%	20.0%
Heterocigotos	73.0%	66.0%	77.0%	78.0%	70.0%	80.0%
Alelos Totales	200	200	200	200	200	200
PDA = 99.9998%			PCT = 1 en 628,785			

Probabilidad de Coincidencia, PD Poder de Discriminación, ICP Índice de Contenido Polimórfico, PE Poder de Exclusión, Índice de Paternidad Típico, PDA Poder de Discriminación Acumulativo, PCT Probabilidad de Coincidencia Total.

Datos obtenidos fueron calculados con la ayuda del macro Powerstatsv12 proveído por la compañía Promega Corporation.

SULTADOS

El estadístico de X^2 fue calculado para determinar si los datos se encuentran o no dentro del equilibrio Hardy-Weinberg mediante la siguiente fórmula:

$$X^2 = (V_o - V_e)^2 / V_e$$

V_o = Valor observado

V_e = Valor esperado

El cálculo de la X^2 con n-1 grados de libertad nos señala el valor de p

Tabla 4.1 Cálculo de X^2 por alelo correspondiente a cada locus

Locus CSF1P0	Valor X^2	Valor p
Alelo 8	0.0657	0.79763
9	0.0000	0.99990
10	0.8953	0.89532
11	0.3725	0.54164
12	0.0173	0.89532
13	0.1736	0.67692

Locus TPOX	Valor X^2	Valor p
Alelo 7	0.0025	0.95992
8	0.2551	0.61352
9	0.2220	0.63749
10	0.1315	0.71683
11	2.2896	0.13024
12	0.2812	0.59590
13	0.0025	0.95992

Locus TH01	Valor X^2	Valor p
Alelo 5	0.8790	0.87896
6	0.2891	0.59083
7	0.0078	0.92966
8	0.9781	0.32266
9	3.4145	0.06463
9.3	0.9781	0.32266
10	1.5276	0.21648

Locus F13A01	Valor X^2	Valor p
Alelo 3.2	0.1004	0.75134
4	1.2346	0.26652
5	0.0178	0.89393
6	0.0406	0.84037
7	2.1511	0.14247
8	0.2392	0.62475
9	0.0025	0.95992
12	0.0025	0.95992
13	0.0102	0.95992
14	0.0025	0.87896
15	0.0102	0.91954
16	0.0025	0.75134

Locus FESFPS	Valor X^2	Valor p
Alelo 8	0.0025	0.95992
9	0.0025	0.95992
10	0.0785	0.77931
11	0.0003	0.98721
12	0.1571	0.69184
13	0.0119	0.91315
14	0.0957	0.75711

Locus vWA	Valor X^2	Valor p
Alelo 14	0.1315	0.71683
15	0.6574	0.41747
16	0.8489	0.35686
17	0.5665	0.45164
18	1.5625	0.21130
19	0.8630	0.35291
20	0.0102	0.91954

RESULTADOS

valor de X^2 de acuerdo a los grados de libertad es el siguiente

MARCADOR	Grados de libertad	Obtenido de Tabla	Valor observado
CSF1P0	5	11.11	1.5244
TPOX	6	12.6	3.1844
TH01	6	12.6	8.0742
F13A01	11	19.7	3.8141
FESFPS	6	12.6	0.3485
vWA	6	12.6	4.6400

gran valor de X^2 indica una desviación con respecto a H_0 y por tanto poca credibilidad para la tesis nula planteada.

$$X^2 \text{ Tabla} < X^2 \text{ Observado}$$

no podemos observar nuestros datos se encuentran dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg y por lo tanto las frecuencias alélicas y genotípicas permanecerán constantes de una generación a otra.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Locus CSF1PO

Se determinaron en la muestra seis diferentes alelos 8, 9, 10, 11, 12 y 13. El alelo de menor peso molecular encontrado es el 8 que contiene ocho unidades repetidas de la secuencia tetramérica (AT). Los alelos 6, 7, 14 y 15 presentes en el sistema no aparecen en la muestra poblacional, el más frecuente es el alelo 11 (35.5%) y menos frecuente es el alelo 8 (2.5%). La comparación de estos datos con los obtenidos para la población hispanoamericana, muestra que a excepción del alelo 6, los otros (7, 14 y 15) sí se encuentran presentes en esa población estudiada, pero la distribución de estos es muy baja, menor al 1%; cabe mencionar que el alelo más frecuente en la población hispana es el alelo 12 (36.1%) siendo el segundo más frecuente en la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México.

En la muestra poblacional se pueden presentar 17 distintos genotipos de 21 posibles de acuerdo al locus genético estudiado. Entre los 10 posibles genotipos homocigotos solo fueron observados 4, por lo que el número de genotipos heterocigotos es elevado determinado por medio del cálculo de la heterocigocidad resultando ser 70.35%, el poder de discriminación calculado es del 0.73 que responde a la capacidad del sistema para poder diferenciar a una muestra de otra elegida al azar y el poder de coincidencia al azar que corresponde a la probabilidad de que una muestra coincida aleatoriamente con otra tomada al azar es igual a 0.105, estos parámetros estadísticos utilizados en la investigación forense cuyos valores son ligeramente menores a los obtenidos para la población hispana de los Estados Unidos de Norte América.

Locus TPOX

Se determinaron en la muestra poblacional siete diferentes alelos 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13. El alelo de menor peso molecular encontrado es el 7 que contiene siete unidades repetidas de la secuencia pentamérica (AATG), el más frecuentes es el alelo 8 (55%) y los menos frecuentes son el alelo 7 (0.5%) y el alelo 13 (0.5%). Las frecuencias alélicas para los hispanos muestran la presencia del alelo 6 con un porcentaje menor al 1%, el cual no se presenta en la población estudiada por nosotros. Cabe mencionar que no se registra la presencia del alelo 13 en la población hispana, pero la población de la zona metropolitana de la Ciudad de México este alelo 13 se encuentra presente con una distribución alélica menor al 1%, de aquí se desprende que la frecuencia de alelos tales como el 6, 7 y 13 se presentan con una proporción muy baja en ambas poblaciones. Es necesario hacer notar que a simple vista en este sistema la variabilidad es menor si la comparados con la del sistema anterior CSF1PO, ya que si observamos la distribución de alelo 8 éste, esta presente en más del 50% de las muestras estudiadas, tal se refleja estadísticamente al momento de calcular la heterocigocidad, el poder de discriminación y el poder de coincidencia al azar.

En la población estudiada se presentaron 15 distintos genotipos de 28 posibles de acuerdo al locus genético estudiado, entre los 8 posibles genotipos homocigotos solo fueron observados 3, la heterocigocidad observada es 66%, menor a la de los sistemas TH01 y FESFPS que contienen el mayor número de alelos que este sistema, el poder de discriminación calculado es del 0.62 y el poder de coincidencia al azar es igual a 0.208.

us TH01

determinaron en la población siete diferentes alelos 5, 6, 7, 8, 9, 9.3 y 10. El alelo de menor peso molecular encontrado es el 5 que contiene cinco unidades repetidas de la secuencia tetramérica (TG), el más frecuentes es el alelo 7 (39%) y menos frecuente es el alelo 5 (1.5%). Al igual que los obtenidos para los hispanoamericanos el alelo 11 no está presente en la población en estudio, o el alelo 6 que se encuentra en la población de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México con la presencia del 1.5% no se encuentra registrado para la población hispana según los datos reportados en Estados Unidos de Norte de América para este sistema específico en dicha población.

En la población estudiada se presentaron 18 distintos genotipos de 28 posibles en el locus genético estudiado. Entre los 8 posibles genotipos homocigotos solo fueron observados 3, por ende el número de genotipos heterocigotos es elevado determinado por medio del cálculo de la heterocigocidad resultando ser 77 %, el poder de discriminación calculado es del 0.91 y el poder de coincidencia al azar igual a 0.090. Si verificamos la tabla que muestra la información referente a distintos parámetros estadísticos obtenidos a partir de los seis locus estudiados podemos observar que en gran parte el resultado de la discriminación del sistema y la posibilidad de que el genotipo se repita en una muestra al azar van correlacionados con la heterocigocidad.

us F13A01

determinaron en la muestra poblacional doce diferentes alelos 3.2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15 y 16. El alelo de menor peso molecular encontrado es el 3.2 que corresponde a una variación del alelo 4 donde a se presenta una no incorporación de dos bases en la secuencia tetramérica (AAAG). El alelo 10 con 307 pares de bases no aparece en la escalera alélica utilizada como referencia (manual D004 Promega Corporation) ya que se menciona que es muy raro, lo cual pudo ser comprobado ya que este alelo no se identificó en la muestra poblacional estudiada, de la misma manera que no se encuentra registrado para la población hispana radicada en Estados Unidos. El alelo 11 presente en el sistema no aparece en la muestra poblacional, para la población hispana si se presenta con una frecuencia menor al 1%. Al igual que en los datos reportados para la población hispana en nuestra población los más frecuentes son 5 (25%), 7 (25%). Un dato curioso es el hecho de que en estas dos poblaciones que se han venido comparando se presenta una distribución no proporcional entre los diferentes alelos del sistema, ya que la frecuencia (aprox. 95%) se da entre los alelos 3.2 a 8, mientras que en el rango de los alelos 9 a 16 la frecuencia es menor al (5%). Esta mayor distribución en el número de alelos encontrados en el sistema aunado a la baja frecuencia con la que se presenta da como resultado parámetros de heterocigocidad, poder de discriminación y poder de coincidencia sumamente altos.

En la muestra poblacional se pueden presentar 28 distintos genotipos de 78 posibles de acuerdo al sistema genético estudiado. Entre los 14 posibles genotipos homocigotos solo fueron observados 6, el cálculo de la heterocigocidad nos da como resultado 78%, siendo el segundo sistema más polimórfico sólo después del locus vWA, este sistema presenta el mayor poder de discriminación igual a 0.94 en comparación con los cinco sistemas restantes, esto como se menciona en el párrafo anterior se debe principalmente a la gran distribución de alelos con frecuencias bajas en la población, otra consecuencia de esto es el alto poder de coincidencia al azar igual a 0.060.

us FESFPS

determinaron en la población siete diferentes alelos 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14. El alelo de menor peso molecular encontrado es el 8 que contiene ocho unidades repetidas de la secuencia tetramérica (AT). El alelo 7 no aparece en nuestra muestra poblacional, presentándose con una proporción menor al 1% en la población hispana. Al igual que en los datos reportados para la población hispana, en esta población el más frecuente es el alelo 11 (35.5%). Como hemos podido observar en cuanto a la presencia de un alelo específico del sistema en la población sus valores estadísticos de heterocigocidad, poder de discriminación y poder de coincidencia al azar disminuyen considerablemente, un ejemplo de esto es el sistema TPOX que contiene el mismo número de alelos de este sistema cuya heterocigocidad es igual al 66%, debido en gran parte a la presencia del alelo 8 en el 50% de las muestras analizadas, si lo comparamos con el sistema FESFPS en el cual se presenta el alelo 11 en un porcentaje del 48% vemos reflejado que las herramientas estadísticas usadas en el área forense para establecer la veracidad y confiabilidad del sistema se ven afectadas.

En la población estudiada se presentaron 14 distintos genotipos de 28 posibles de acuerdo al sistema genético estudiado. Solo fueron observados 4 genotipos homocigotos. El cálculo de la heterocigocidad da como resultado 70%, el cálculo del poder de discriminación nos da como resultado 0.855 y el poder de coincidencia al azar igual a 0.145.

us vWA

determinaron en la muestra poblacional siete diferentes alelos 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20. El alelo de mayor peso molecular encontrado es el 14 que contiene ocho unidades repetidas de la secuencia tetramérica (AGAT). Los alelos 11, 12, 13 y 21 presentes en el sistema no aparecen en nuestra muestra poblacional, el más frecuentes es el alelo 17 (31%), que es el segundo más frecuente en la población hispana y menos frecuente es el alelo 20 (1.0%). El alelo 13 se presenta en la población hispana con una distribución menor al 1%, no se encuentra registrado para población de la zona metropolitana de la Ciudad de México.

En la población estudiada se presentaron 19 distintos genotipos de 28 posibles de acuerdo al sistema genético estudiado. Entre los 11 posibles genotipos homocigotos solo fueron observados 3, de ahí que el número de genotipos heterocigotos es elevado determinado por medio del cálculo de la heterocigocidad resultando ser 80%, aun y cuando la distribución tan solo se basa en siete alelos observamos aquí la mayor heterocigocidad en comparación con los otros cinco loci analizados, y esto debido a una distribución más uniforme en cuanto a la presencia de los alelos en la población estudiada, presentando tendencias por debajo del 31% (TPOX alelos encontrados 7, porcentaje alelo más frecuente 55%), el poder de discriminación calculado es del 0.907 muy similar al PD encontrado en el locus TH01 en el que las distribuciones alélicas también se basan en 7 alelos encontrados, pero no mayor del PD encontrado en el sistema TPOX cuya distribución alélica es igual, el poder de coincidencia al azar es de 0.093, todos estos parámetros son semejantes a los encontrados para la población hispana.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Para los seis loci analizados CSF1P0, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA se calcularon valores estadísticos que son requeridos para emitir un dictamen por medio del análisis del ADN en el área forense, estos parámetros estadísticos nos determinan la capacidad de un sistema para diferenciar una muestra de otra tomada al azar y además nos permitir estimar la probabilidad de que una muestra coincida plenamente con otra tomada al azar. Lo que se puede observar en los resultados es que el locus con mayor atributos para ser elegido como marcador genético utilizado en el área de la genética forense es el locus F13A01 y el menos adecuado sería TPOX, en virtud de que el valor de la probabilidad de coincidencia al azar y poder de discriminación para éste último son los más bajos comparados con los otros loci analizados. Lo mismo sucede con los cálculos estadísticos realizados para un dictamen de ADN en el que tratamos de establecer la paternidad biológica. Aquí los loci vWA y F13A01 presentan, valores que nos otorgan una mayor confiabilidad en los resultados que presentamos. Es necesario mencionar que las leyes de la probabilidad se rigen por la regla del producto, donde, la frecuencia de un perfil genético determinado es el producto de la frecuencia alelopática de cada locus. Aún y cuando, alguno de los locus TPOX presenten valores relativamente bajos como lo es el caso del locus TPOX, sus probabilidades se suman a las obtenidas por los otros loci analizados, por lo tanto, el conjunto de marcadores genéticos nos brinda en consecuencia un resultado con una probabilidad de coincidencia al azar de 1 en 628,785 personas y un poder de discriminación del 99% valores muy aceptables en la emisión de un dictamen en genética forense.

CONCLUSIONES

La amplificación de 3 loci en una sola reacción de PCR y su determinación conjunta en geles de poliacrilamida permite reducir tiempo y costos en la determinación de un perfil genético.

Los sistemas CSF1P0, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA, se encuentran dentro del equilibrio de Hardy Weinberg, por lo tanto, las proporciones de los diferentes genotipos permanecerán constantes de una generación a otra.

Los loci CSF1P0, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA, presentan una heterocigocidad mayor al 70%, lo que resulta en una buena distribución de los alelos en la población, y por lo tanto una mayor diversidad de genotipos encontrados.

La Probabilidad de Coincidencia al Azar obtenido para los seis loci analizados en la población de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México es 1 en 538,000 que comparado con la población hispana que es de 1 en 733,000 muestra una diferencia significativa, por lo tanto la probabilidad de encontrar un genotipo al azar igual al analizado es mayor que el valor de PCA reportado para la población hispana en Estados Unidos de Norteamérica.

El conjunto de los loci CSF1P0, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS y vWA pueden ser utilizados de manera exitosa en la investigación criminalística y la búsqueda de responsabilidad de la paternidad en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

LOCUS CSF1P0 (29, 30, 31, 32, 36)

Definición del locus GenBank	Ubicación Cromosoma	Secuencia Repetida	Acceso GenBank
HUMCSF1P0 Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene.	5q33.3-34	AGAT	X14720

CSF1P0 GenBank Sequence
(Accession X14720)

```

5'----->
1 AACCTGAGTC TGCCAAGGAC TAGCAGGTTG CTAACCACCC
  TTGGACTCAG ACGGTCCTG ATCGTCCAAC GATTGGTGGG

41 TGTGTCTCAG TTTTCCTACC TGTAAAATGA AGATATTAAC
   ACACAGAGTC AAAAGGATGG ACATTTTACT TCTATAATTG

81 AGTAACTGCC TTCATAGATA GAAGATAGAT AGATT [ ]
   TCATTGACGG AAGTATCTAT CTTCTATCTA TCTAATCTAT

121 [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ] [ ]
     CTATCTATCT ATCTATCTAT CTATCTATCT ATCTATCTAT

161 [ ] AGGAAGT ACTTAGAACA GGGTCTGACA CAGGAAATGC
     CTATCCTTCA TGAATCTTGT CCCAGACTGT GTCCTTTACG

201 TGTCCAAGTG TGCACCAGGA GATAGTATCT GAGAAGGCTC
     ACAGGTTTAC ACGTGGTCTT CTATCATAGA CTCTTCCGAG

241 AGTCTGGCAC CATGTGGGTT GGGTGGGAAC CTGGAGGCTG
     TCAGACCGTG GTACACCCAA CCCACCCTTG GACCTCCGAC

281 GAGAAATGGGC TGAAGATGGC CAGTGGTGTG TGGAA
     CTCTTACCCG ACTTCTACCG GTCACCACAC ACCTT
  <-----

```

LOCUS TPOX (30, 34, 35, 36, 46)

Definición del locus GenBank	Ubicación Cromosoma	Secuencia Repetida	Acceso GenBank
HUMTPOX Human thyroid peroxidase gene	2p23-2pter	AATG	M68651

TPOX GenBank Sequence
(Accession M68651)

```

5'----->-----|----->-----
1  CACTAGCACC CAGAACCGTC GACTGGCACA GAACAGGCAC
   GTGATCGTGG GTCTTGCCAG CTGACCGTGT CTTGTCCGTG
      <----->
41 TTAGGGAACC CTCACTG [1] [2] [3] [4] [5] [6]
   AATCCCTTGG GAGTGACTTA CTTACTTACT TACTTACTTA
      [7] [8] [9] [10] [11]
81 [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21]
   CTTACTTACT TACTTACTTA CAAACCCGTT TATTGGGAC
      <----->
121 ACAAGGACAG AAGGGCCTAG CGGGAAGGGA ACAGGAGTAA
    TGTCCTGTG TTCCGGGATC GCCCTTCCCT TGTCCTCATT
    <----->
161 GACCAGCGCA CAGCCCGACT TGTGTTTACA AGACCTGGGA
   CTGGTGCGET GTCGGGCTGA ACACAAGTCT TCTGGACCCT
201 TTGGACCTGA GGAGTTCAAT TTTGGATGAA TCTCTTAATT
   AACCTGGACT CCTCAAGTTA AACCTACTT AGAGAATTA
241 AACCTGTGTG GTTCCCAGTT CCTCC
   TTGGACACAC CAAGGTCAA GGAGG
      <----->

```

LOCUS TH01 (23, 37, 38)

Definición del locus GenBank	Ubicación Cromosoma	Secuencia Repetida	Acceso GenBank
HUMTH01 Human tyrosine hydroxylase gene	11p15.5	AATG	D00269

HUMTH01 Sequence from Gen Bank
(Accession D00269)

```

5'----->-----|-----
1  ATTCAAAGGG TATCTGGGCT CTGGGGTGAT TCCCATGGC
   TAAGTTTCCC ATAGACCCGA GACCCCACTA AGGTAACCG
----->-----|-----
41 CTGTTCTCCTCC CTTATTTCCTC TCATTCATTC ATTCATTCAT
   GACAAGGAGG GAATAAAGGG A [ ] [ ]
----->-----|-----
81 TCATTCATTC ATTCATTCAC CATGGAGTCT GTGTTCCCTG
   [ ] [ ] GTG GTACCTCAGA CACAAGGGAC
----->-----|-----
121 TGACCTGCAC TCGGAAGCCC TGTGTACAGG GGAAGTGTGTG
   ACTGGACGTC AGCCTTCGGG ACACATGTCC CCTGACACAC
----->-----|-----
161 GGCCAGGCTG GATAATCGGG AGCTTTTCAG CCCAC
   CCGTCCGAC CTATTAGCCC TCGAAAAGTC GGGTG
----->-----|-----
----->-----|-----
----->-----|-----

```

LOCUS F13A01 (39, 40, 41, 42)

Definición del locus GenBank	Ubicación Cromosoma	Secuencia Repetida	Acceso GenBank
HUMF13A01 Human coagulation factor XIII a subunit gene	6p24-25	AAAG	M21986

F13A1 GenBank Sequence
(Accession M21986)

```

5'
1  CACTTGAACC CGGGAGGTGG AGGTTGCACT CCAGCCTTTG
   GTGAACCTGG GCCCTCCACC TCCAACGTGA GGTCCGAAAC
   →
41 CAACAGAGCA AGACTTCATC TGAAAGATAG AAAGATG
   GTTGTCTCGT TCTGAAGTAG ACTTCTATC TTTCTACTTT
   1 2 3 4
81  CTTTCTTTCT TTCTTTCTTT CTTTCTCATT TTCTTTTTTT
   1 2 3 4
121 TTAAAATTT AGGGGGAAAA TTTTCTAATT TTTGAACATG
   AATTTTAAAA TCCCCTTTT AAAAGATTAA AAACCTGTAC
161 CACTAAAATG ATTTTCAGAG AAAACCAAGT GTTATTTTCT
   GTGATTTTAC TAAAAGTCTC TTTTGGTTCA CAATAAAGA
201 AATCTGCATG GCATTATTAA AGATGTTTAC TCATCTTCCT
   TTAGACGTAC CGTAATAATT TCTACAAATG AGTAGAAGGA
241 TGGGGCTAGG CATCCCATTC CTGCAGGAAG TCTTGTGGTT
   ACCCCGATCC GTAGGGTAAG GACGTCCTTC AGAACACCAA
281 AGGCGGTGGC TGTGGCTCTG GGATGATTCA GGAATGCAGA
   TCCGCCACCG ACACCGAGAC CCTACTAAGT CCTTACGTCT

```

LOCUS FESFPS (23, 43, 44)

Definición del locus GenBank	Ubicación Cromosoma	Secuencia Repetida	Acceso GenBank
HUMFESFPS Human c-fes/fps proto-oncogen	15q25-qter	AAAT	X06292

FES/FPS GenBank Sequence
(Accession X06292)

```

5'-----
1  GGGATTTCCC TATGGATTGG AAGTGGGGCG TGAAATAGAG
   CCTTAAAGGG ATACCTAACC TTCACCCCGC ACTTATCTC

41  GAGTCAGGGG TCACTCTGGG GATTTGGCCT GGAGCAGCTG
   CTCAGTCCCC AGTGAGACCC CTAACCGGA CCTCGTCGAC

81  GAAGATGGAG TGGCTGTAA TTCATGTAGG GAAGGCTGTG
   CTTCTACCTC ACCGACAATT AAGTACATCC CTTCGGACAC

121 GGAAGAAGAG GTTTAGGAGA CAAGGATAGC AGTTCATTTA
   CCTTCTTCTC CAAATCCTCT GTTCCTATCG TCAAGTAAAT
   TTTATTTATT TATTTATTTA TTTATTTATT TATTTATTTA
161 AAATAAATAA ATAAATAAAT AAATAAATAA ATAAATAAAT

201 GAGATGTAGT CTCATTCTTT CGCCAGGCTG GAGTGCAGTG
   CTCTACATCA GAGTAAGAAA GCGGTCCGAC CTCACGTCAC

241 GCGCGATCTT GGCTCACTGC AACCTCCACC TCCCAGGCTC
   CCGCTAGAAA CCGAGTGACG TPGGAGGTGG AGGTCCGAG

281 AAGCGATTCT CTGCTCAG CCTCCCGAGT AGCCAAGTAG
   TTCGCTAAGA GAACGGAGTC GGAGGGCTCA TCGGTTTCAT

321 CTGGGACTAC
   GACCCCTGATG
  
```

LOCUS vWA (45, 46, 47)

Definición del locus GenBank	Ubicación Cromosoma	Secuencia Repetida	Acceso GenBank
HUMVWFA31 Human von Willebrand factor gene	12p12-pter	AGAT	M25858

VWA GenBank Sequence
(Accession M25858)

```

5'----->
1  CCCTAGTGGG  TGATAAGAAT  AATCAGTATG  TGACTTGGAT
   GGGATCACCT  ACTATTCTTA  TTAGTCATAC  ACTGAACCTA
      1       2       3       4       5       6       7       8       9
   TGAAGCAGATG  CAGACAGACA  GACAGATAGA  TAGATAGATA
41  ACTAGATAGA  CAGACAGACA  GACAGATAGA  TAGATAGATA
      10      11      12      13      14      15      16      17      18      19
81  GATAGATAGA  TAGATAGATA  GATAGATAGA  TAGATAGGTA
      20
121  TCCATCC  ATCCTATGTA  TTTATCATCT  GTCC
     GATAGGTAGG  TAGGATACAT  AAATAGTAGA  CAGG
<-----

```

GLOSARIO

Adenina: Una de las cuatro bases que constituyen a la molécula del DNA o RNA, designada con la letra A.

Allo: Forma Alternativa de un gene.

Frecuencia: La proporción de un alelo en particular contenido en los cromosomas de individuos de una población determinada.

Aminoácidos: Una de las 20 moléculas que por combinación da origen a las proteínas, la secuencia de aminoácidos que da origen a una proteína esta determinada por el código genético.

Amplificación: Un incremento en el número de copias de un fragmento específico del ADN, ya sea in vivo o in Vitro.

Autosoma: Cromosoma no involucrado en la determinación del sexo. El genoma humano diploide consiste de 46 cromosomas, 22 pares de autosomas y un par sexual (cromosomas X y Y.)

Base par: Dos nucleótidos complementarios unidos por enlaces de hidrógeno que se presentan entre A y T y entre G y C.

Orden de secuencia: El ordenamiento de las bases nucleotídicas en la molécula del ADN.

Biotecnología: Conjunto de técnicas biológicas desarrolladas a través de la investigación básica, ahora aplicadas a la investigación y desarrollo de productos.

Herencia autosoma: La estructura por la cual la información hereditaria es físicamente transmitida de una generación a la próxima.

Citosina: Una de las cuatro bases que constituyen a la molécula del ADN y RNA, designada con la letra C.

Desnaturalización: El proceso de separación de la doble hélice complementaria del ADN para generar cadenas simples.

Ácido desoxirribonucleico: El material genético de un organismo.

Doble hélice: La forma que adoptan las dos cadenas lineares del ADN.

Electroforesis: Técnica en la cual las moléculas son separadas por su velocidad en un campo eléctrico.

Matriz semisólida (usualmente agarosa o acrilamida) utilizada en la electroforesis para separar moléculas.

Unidad básica de la herencia; una secuencia de nucleótidos del ADN en los cromosomas.

Frecuencia: La ocurrencia relativa de un alelo en particular en una población.

Genética: El estudio de los patrones de la herencia y sus tratados específicos.

Genoma: Todo el material genético contenido en los cromosomas de un organismo particular.

Genotipo: Información genética presente en los organismos, caracterizada en uno o más loci.

Base: Una de las cuatro bases que constituyen a la molécula del DNA o RNA, designada con la letra G.

Herencia: La transmisión de las características de una generación a la siguiente.

Herocigicidad: La presencia de diferentes alelos en un mismo locus de cromosomas homólogos.

In vitro: fuera de un organismo vivo

Quilobase: Unidad de longitud para un fragmento de ADN igual a 1000 nucleótidos.

Locus: Localización específica de un gen en el cromosoma

Gen marcador: Un gene de localización conocida en el cromosoma que es utilizado como punto de referencia en el mapeo de otros loci.

Mitosis: Proceso de división nuclear en la célula que produce células hijas que son genéticamente idénticas.

Mutación: Cualquier cambio en la secuencia del DNA.

Nucleótido: Unidad del ácido nucleico compuesto por fosfato, ribosa o desoxirribosa y un base púrica o pirimidica.

Núcleo: Organelo células en eucariontes que contiene el material genético.

Oncogén: Un gene, una o más formas las cuales son asociadas con cáncer. Muchos oncogenes están involucrados directa o indirectamente en el control del crecimiento celular.

Polimerasa, DNA o RNA: Enzima que cataliza la síntesis de ácidos nucleicos sobre la base de una cadena de ácidos nucleicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Moreno, G.R.L. (1981) Manual de Introducción a la Criminalística Ed. Porrúa, México. 219pp.
- Quiroz, C.A. (1984) Medicina Forense Porrúa, México.
- Reyes, M.A. (1977). Dactiloscopia. Ed. Porrúa. México. 133 pp.
- Huguet, R.E., Carracedo, A.A., Gene, B.M. (1988) Introducción a la Investigación Biológica de la Paternidad. PPU. 260pp.
- Lorente A.M., Lorente, J.A. (1996) La tecnología del ADN en Medicina Forense: Importancia del indicio y del lugar de los hechos. Cuadernos de Medicina Forense, No. 3, Enero. España.
- Reynolds, R., Sensabaugh, G, 1991. Analysis of genetic markers in forensic DNA sample using the Polymerase Chain Reaction. Analytical Chemistry. 63(1):1-15.
- Dobzhansky, T., Ayala, F.J., Stebbins, G.L., Valentine J.W. 1981. Evolución. Ed. Omega, España. 558 pp.
- Lisker, Y.R., Armendares, S.S. 1994. Introducción a la Genética Humana. Ed. El Manual Moderno. 318 pp.
- Graham, R.T. (1997) Forensic DNA Technology, Second Edition, CRC Press, New York
- Klug, S.W. and Cummings, M.R. (1994) Concepts of Genetics, Fourth Edition, Prentice Hall, New York
- Nakamura, Y et al. (1987) " variable number of tandem repeat (vntr) markers for human gene mapping", Science 235, 1616
- Fregeau, C. J., Fournay, R.M. (1993) "DNA typing with fluorescent tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification" Biotechniques 15, 100
- Allen, C.R., and Goldberg, C.L. (1995) "Forensic application of gel electrophoresis" American Biotechnology Laboratory 1, 8
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. And Gresshoff, P. M. (1991) " fast and sensitive silver staining of dna in polyacrylamide gels" Analytical Biochemistry 196, 80
- Erlich, H. A. (1989) PCR Technology: Principles and Application for DNA amplification, Stockton Press, New York
- Reynolds, R., Sensabaugh, g. (1991) "analysis of genetic markers in forensic dna samples using the polymerase chain reaction" Analytical Chemistry 63, 1.

- Sambrook, J. et al (1998) "In: Molecular Cloning: A laboratory manual" Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, cold Spring Harbor, New York
- Dunbar, B.S. (1998) "Two dimensional electrophoresis and immunological techniques" Plenum Press, N.Y.
- Cook, L.M. (1979) "Genetica de Poblaciones", Ediciones Omega, Barcelona
- Eckert, W.G. (1996) Introduction to forensic Science, Second Edition, CRC Press, New York
- Stanfield, W.D. (1996) "Genetica", Tercera Edición, Editorial McGraw-Hill, México.
- Puers, c. et al (1994) "Allelic ladder characterization of the short tandem repeats polymorphism located in the 5' flanking region to the human coagulation factor XIII A subunit gene", Genomics 23, 260
- Pfizinger, H., Ludes, B., Kintz, P. Tracqui, A. and Mangin, P. (1995) "French Caucasian population data for HUMTH01 and HUMFES/FPS short tandem repeats (STR) system" J. Forensic Sci. 40, 270
- Urquhart, a., Oldroyd, N.J., Kimpton, C.P. and Gill, P. (1994) "Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification" Biotechniques 18, 116
- Grimberg, J. Et al (1989) "A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood", Nucleid Acids Research 17, 8390
- Miller, S. Et al. (1988) "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells" Nucleid Acids Research 16, 1215
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. and Higuchi, R. (1991) "Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material", Biotechniques 10, 506
- GenePrint STR Systems, Technical Manual, Promega Corporation
- Crouse, C.A., and Schumm, J. (1995) "Investigation of species specificity using nine PCR-based human STR system" J. Forensic Sci. 40, 952
- M. Gene, A. Carracedo, (1998) "Population genetics of the D12S391, CSF1P0 and TPOX loci in Catalonia (Northeast Spain)" International Journal of Legal Medicine 111:52-54
- G. Mertens, N. Mommers, (1997) " Allele frecuencies of nine STR systems in the Flemish population and application in parentage testing" International Journal of Legal Medicine 110:177-180
- M. Crespilo, J.A. Luque (1997) "Allele frecuency distributions of 13 PCR-based system in a population from North-East Spain" International Journal of Legal Medicine 110:223-225.
- International Human Genome Sequencing Consorciium, (2001) " Initial sequencing and analysis of the human genome" Nature 409:860-921.

-
- Anker, r. Et al. (1992) "Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyroid peroxidase (hTPO) locus", *Hum. Mol. Genet.* 1, 137
- H. Takeshita, E. Meyer (1997) "The STR loci HumTPO and HumLPL population genetic data in eight populations" *International Journal of Legal Medicine* 110:331-333.
- W. Bar, B. Brinkmann (1997) "DNA recommendatios. futher report of the DNA Commision of the SFH regarding the use of short tandem repeats systems" *International Journal of Legal Medicine* 110:175-176
- Warne, d. Et al. (1991) "tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene 2 (actbp2) detected using the polymerase chain reaction", *Nucleid Acids Research* 19, 1980.
- Tanin Bhoopat, Suthat Sriduangkaew, (1997) " An investigation of the TH01 locus in a population from norther Thailand" *International Journal of Legal Medicine* 110: 286-297.
- Nishimura, D.Y., and Murray, J.C. (1992) "A tetranucleotide repeat for the F13B locus" *Nucleid Acids Research* 20, 1167
- Polymeropoulos, M. H., et al (1991) "Tetranucleotide repeatt polymorphism at the human coagulation factor XIII A subunit gene (F13A1)", *Nucleid Acids Research* 19, 4306
- B. Glock, D.W. Schwartz, (1997) "A new allele at the short tandem repeat locus HumF13A01" *International Journal of Legal Medicine* 110:284-285.
- S. Ferudi, J. Woller, (1997) A population study of the STR loci HUMLPL, HUMF13B and HUMF13A01 in Hungary" *International Journal of Legal Medicine* 110:107-108
- J. Ricci, M. Klintschar, (1998) "Study on the STR TPOX in an Italian and Austrian populations using two different primer pairs and three different electrhophoretic methods" *International Journal of Legal Medicine* 111:212-214.
- J. Janica, W. Pepinski, (1997) "The STR systems FES/FPS and F13B in a Polish population" *International Journal of Legal Medicina.* 110:329-330
- Kimpton, C. et al. (1992) "A futher tetranucleotide repeat polymorphism in the vWA gene" *Nucleid Acids Research* 1, 287
- A. Piccinini, K. Waterkamp (1997) "Short tandem repeat HumACTBP2 (SE33) and HumVWA: population genetic study on a north Italian population" *International Journal of Legal Medicine* 110: 292-294

- H. Horst, A. Eigel (1997) "Analysis of the short tandem repeats systems HumVWA and HumF13B in a population sample from northern Thailand" *International Journal of Legal Medicine* 110:235-237
- Edwards, a. Et al. (1992) "genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats loci in four human population groups" *Genomic* 12, 241
- Schlotterer, C. And Tautz, d. (1992) "Slippage synthesis of simple sequence DNA", *Nucleid Acids Research* 20, 211
- Heame, C. M. And Todd, J. A. (1991) "Tetranucleotide repeat polymorphism at the HPRT locus", *Nucleid Acids Research* 19, 5450
- Polymeropoulos, M. H., et al (1991) "Tetranucleotide repeatt polymorphism at the c-fes/fps proto-oncogene (FES/FPS)", *Nucleid Acids Research* 19, 4018
- Sulliva, K. et al (1993) "A rapid and quantitative DNA sex test: Flourescence-based PCR analysis of X-Y homolohous gene amelongenin" *Biotechniques* 15, 636
- Zuliani, G. And Hobbs, H.H. (1990) "Tetranucleotide repeat polymorphism in the LPL gene" *Nucleid Acids Research* 18, 4958
- Kusukawa, N. et al (1997) " Agarose-based system for separation of short tandem repeat loci" *Biotechniques* 22, 976
- Demers, D.B., Kelly, C.M. and Sozer, A.C. (1998) "Multiplex STR analysis by capillary electrophoresis" *Profiles in DNA* (in press)
- Eguiarte, L. E. "Una guía para principiantes a la Genética de Poblaciones" *Ciencias*, pags.: 30-38
- N. Fukshansky, W. Bar, (1998) "Interpreting forensic DNA evidence on the basis of hypotheses testing" *International Journal of Legal Medicine* 111: 62-66
- M. Kubat, I. Furac, (1997) "Short tandem repeat polymorphism at the HUMCD4 and HUMF13B loci in a Croatian population" *International Journal of Legal Medicine* 110:230-231
- L.A. Foreman, A.F. Smith, (1997) "A Bayesian approach to validating STR multiplex databases for use un forensic casework" *International Journal of Legal Medicine* 110: 244-250
- STRBase: [http:// www.cstl.nist.gov/div831/strbase/](http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/)