

60524
90



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**"STR's COMO MARCADORES GENETICOS DE
IDENTIFICACIÓN FORENSE".**

T E S I S I N A

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
DIANA MINERVA RUIZ GARCIA

ASESOR: M. EN C. TERESA JUAREZ CEDILLO

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2003



A



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que a la alumna RUIZ GARCÍA DIANA MINERVA con número de cuenta 9560641-1 de la carrera de Q.F.B. se le ha fijado el día 03 del mes de noviembre de 2003 a las 13:00 hrs. para presentar examen profesional. que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS
VOCAL M. en C. TERESA JUAREZ CEDILLO
SECRETARIO Q.F.B. FCO JAVIER PARADA GARCIA
SUPLENTE Dra ROSALBA RANGEL CORONA
SUPLENTE M. en C. RAQUEL RETAINA UGALDE

Handwritten signatures on a lined background.

El título de la tesis que se presenta es: "STR's como Marcadores Genéticos de Identificación"

Opción de titulación: Paquetes de educación continua

ATENTAMENTE "POR MI RAZA HABLARÉ EN ESTE IDIOMA" México, D.F. a 06 de octubre de 2003. Mtro. JUAN FRANCISCO SANCHEZ RUIZ DIRECTOR GENERAL DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" DIRECCION

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Handwritten signature and stamp of Jefe Robert Opatowicz, Director de la Unidad de Exámenes Profesionales.

B

DEDICATORIA

*A la memoria de mis abuelitos Lucy y Dimas.
Por haber abierto la brecha, para comenzar a caminar.*

*A mi abue Lucy,
haber sido una mujer de gran fortaleza espiritual
y un ejemplo de amor a la vida.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

AGRADECIMIENTOS

*A Dios,
por todas las grandezas que ha dado a mi vida
y no abandonarme en ningún momento.*

*A Ma. Luisa y Jesús, mis padres,
por su inmenso amor, su apoyo, comprensión y
la libertad para decidir mi forma de vivir.
Este es su logro. Los amo.*

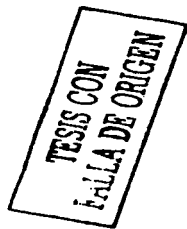
*A Aidé, Nayelli, César y Alejandro, mis hermanos,
por su solidaridad en lo que he emprendido y
en los buenos y no tan buenos tiempos, los quiero.*

*A Mary, Saúl, Miguel y Lino, mis tíos,
y sus respectivas familias por su cariño, confianza y
apoyo en todas mis locuras.*

*A mi primo Miguel Ángel
por ser siempre mi amigo, mi confidente,
sobre todo hermano y creer en mí.*

*A mi Asesora la M. en C. Teresa Juárez,
por su paciencia, su amistad y su confianza.
Por ser mi cómplice en este proyecto y permitirme
cerrar una etapa más en mi vida.
Gracias, Tere.*

*A mis sinodales,
Q. B. P. Gustavo Miranda
Q. F. B. Fco. Javier Parada
Dra. Rosalva Rangel
M. en C. Raquel Retana
por el tiempo dedicado, por sus observaciones
y sus sugerencias para mejorar la
calidad de este trabajo.*



*Al Q.F.B. Valentín Islas,
Por su labor en la creación de otra opción
más para titulación y permitirme ser parte de la
primera generación que vive esta experiencia.*

*A mis Profesores.
por compartirme sus conocimientos.
y formar mi base profesional.*

*A Claudia, Olga y Honorio, mis amigos,
compañeros de pupitre, confidentes, cómplices. Por
hacerme más ligero el paso por la Universidad.
No importa el camino que tomen nuestras
vidas, sabremos donde encontrarnos.*

*A Silvestre, un ángel-amigo.
por impulsarme a culminar esta empresa.
por su inmenso apoyo y confianza.*

*A Angélica, Magdalena y Ramses,
por estar siempre presentes y compartir
alegrías, tristezas, y sueños.*

*A Rogelio J.
por estar conmigo en uno de los momentos más
dificiles de mi vida, y en este que es uno de los
más hermosos.
¡Sígues tú!*

*A todos y cada uno de mis amigos, por su total confianza y
apoyo incondicional en alguna etapa de mi camino,
fundamental para este éxito.
Gracias por ser mis pilares.*

*A aquellas personas que de manera directa
o indirecta contribuyeron a la realización de este sueño.*

... Gracias.



E

INDICE

	Página
INFORMACION GENERAL	1
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
OBJETIVO	8
GENERALIDADES DEL MATERIAL GENETICO	
1.1 Estructura molecular del material genético	9
1.2 Los cromosomas	13
1.3 Los genes como elemento de la herencia	14
1.4 Organización del genoma humano	16
MARCADORES GENETICOS	
2.1 Polimorfismos genéticos	18
2.2 Marcadores genéticos	19
2.2.1 Marcadores genéticos forenses	19
2.2.2 Aspectos forenses del análisis de los marcadores genéticos	20
LA INDIVIDUALIZACION DEL SER HUMANO	
3.1 Marcadores genéticos tradicionales	22
3.2 Marcadores genéticos basados en el estudio del ADN	24
3.2.1 Polimorfismos de secuencias nucleotídicas	24
3.2.2 Polimorfismos de longitud de la región variable	26
STR'S EN IDENTIFICACIÓN FORENSE	
4.1 Generalidades de los marcadores STR	28
4.2 Clasificación de los marcadores STR	28

F

4.3 Nomenclatura común para alelos STR	30
4.4 STR's tetraméricos autosómicos	31
4.5 Fundamento del uso de STR's en identificación humana	31
4.6 Localización de los STR en los cromosomas humanos	32
4.7 Marcadores STR's en el cromosoma Y	33
4.8 Ventajas de la aplicación de los STR	33
4.9 Bases de datos poblacionales y poder de discriminación	34
4.10 Aplicaciones de los polimorfismos en Genética Forense	35
MARCADORES STR DEL CROMOSOMA Y	
5.1 Estructura y características del cromosoma Y	37
5.2 Marcadores STR en el cromosoma Y	37
5.3 Antecedentes y desarrollo del empleo de marcadores hipervariables del cromosoma Y en la identificación forense	38
TIPIFICACION FORENSE DE LOS STR	
6.1 Extracción del ADN	41
6.2 Técnicas de cuantificación	43
6.3 Amplificación de loci STR's	44
SISTEMAS DE ANALISIS LOS STR's	
7.1 Electroforesis	47
7.2 Electroforesis en soporte de gel	47
7.3 Electroforesis capilar (EC)	50
7.4 Tinción con plata	52
MARCADORES FLUORESCENTES USADOS EN TIPIFICACIÓN DE ALELOS STR	
8.1 Características de los fluoróforos	54
8.2 Plataformas de detección de fluorescencia en alelos STR	55

PROCEDIMIENTO DE GENOTIPIFICACION AUTOMATIZADA DE STR's	
9.1 El proceso de genotipificación	58
9.1.1 Fragmentos de ADN	59
9.1.2 Análisis de los fragmentos y software de genotipificación	60
9.2 Factores que afectan los resultados de genotipificación	61
9.2.1 La importancia de la precisión en genotipificación	61
9.2.2 Procedimientos de ajustes de algoritmos	62
9.2.3 Alelos fuera de líder	63
9.2.4 Perfiles parciales de STR	64
9.2.5 Interpretación de muestras	64
OTRAS TECNOLOGIAS EN EL ANALISIS DE IDENTIDAD GENETICA	
10.1 MICROCHIP portátil para Electroforesis Capilar	65
10.2 Determinación de STR's por hibridación en serie	65
10.3 Instrumentos de electroforesis capilar en serie	66
10.4 Espectroscopia de masas MALDI-TOF	67
CODIS Y MARCADORES POLIMORFICOS DE TIPO STR	
11.1 Generalidades	69
11.2 CODIS	70
11.3 Polimorfismos STR's	71
CONCLUSIONES	74
SUGERENCIAS	75
REFERENCIAS	76
GLOSARIO	79
ANEXO	85

INFORMACION GENERAL

El crimen surgió con el hombre mismo, y éste, conciente de la punibilidad de su acción siempre ha intentado ocultar su autoría. La sociedad se encontraba y se encuentra ahora con el problema de determinar la identidad de la persona que ha cometido una acción. La investigación de un hecho delictuoso es una de las actividades que realiza el Órgano Jurisdiccional (Ministerio Público, Policía Judicial y autoridades jurisdiccionales) con la finalidad de proporcionar una adecuada administración y procuración de justicia. Este problema se ha ido solventando gracias a la aplicación de los conocimientos existentes en cada momento histórico, posibilitando y exigiendo el nacimiento de ciencias especializadas.

La perfecta identificación de las personas es requisito previo exigido en la gran mayoría de las actuaciones judiciales, independiente de la esfera que se considere; no se puede impartir justicia si el culpable no está plenamente identificado.

Por lo que el término ADN, además de lo que realmente significan estas siglas, evoca y encierra una y mil sugerencias, reflexiones, posturas y actitudes. El ADN está ligado a nuestro pasado, a nuestro futuro, a nuestro destino como "humanidad", a nuestra seguridad como ciudadanos, a nuestra identificación como seres únicos e irrepetibles y a nuestro patrimonio biológico. ^(1,2)

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	ARN mensajero
ASO	Oligonucleótidos alelo-específicos
C	Citosina
CODIS	Banco nacional de perfiles de ADN
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfato
EC	Electroforesis capilar
FRLP	Fragmentos de restricción de longitud polimorfa
G	Guanina
ISFH	Sociedad Internacional de Haemogenética Forense
LDIS	Sistema local de archivos de ADN
LINES	Elementos interespaciadores largos
NDIS	Sistema nacional de archivos de ADN
PAGE	Geles de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDIS	Sistema estatal de archivos de ADN
SINES	Elementos interespaciadores cortos
STR	Cortas repeticiones en tándem
T	Timina
TWGDAM	Grupo técnico de trabajo en métodos de análisis de ADN
UR	Unidades de repetición
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem

RESUMEN

Siendo los indicios de naturaleza biológica, los que con mayor frecuencia se encuentran en la escena del delito y una vez que esta muestra ha sido suministrada a los laboratorios y posterior a una estricta metodología de rutina que permite una clasificación previa de la evidencia colocándola cada vez dentro de un grupo más restringido y que la hacen diferente de los demás, entonces la meta del científico forense es determinar a través del análisis genético, si el indicio biológico pertenece a un individuo en particular, ya sea de la víctima o del sospechoso, conduciendo esto a la identidad única y específica de la evidencia. A este procedimiento se le denomina individualización.

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

La inclusión del análisis de los polimorfismos del ácido desoxirribonucleico (ADN) en la medicina legal y forense ha supuesto el mayor avance en la identificación criminal desde que se estandarizó el uso de las huellas dactilares.

Por tanto se recopiló e integró toda la información acerca de los STR's o microsátélites, utilizados recientemente como marcadores genéticos en la individualización de indicios biológicos, identificación de individuos con fines forenses y en la investigación biológica de la paternidad.

La información genética está contenida en la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN), formada de nucleótidos que se repiten millones de veces con una estricta periodicidad. El ADN repetido lo puede estar en tándem o de forma dispersa en el genoma. Es particularmente interesante el ADN repetido en tándem clasificado como minisátélite o microsátélite (STR's, short tandem repeats) motivo de este trabajo. Los STR's tienen de 2 a 7 pares de bases y son muy abundantes en todo el genoma, además de que son extremadamente polimórficos poseen una herencia mendeliana simple, lo que los hace muy adecuados para la tipificación de individuos en el área forense. Las ventajas de estos marcadores genéticos son su estabilidad y la posibilidad de amplificación simultánea hasta 16 loci microsátélites a partir de cualquier vestigio biológico aún en cantidades traza, muy degradados o antiquísimos, sin importar el origen del espécimen a analizar, así como la automatización de la cual ya gozan y de la creación de bancos de datos de perfiles genéticos.

Estos marcadores se han convertido rápidamente en la herramienta legal y forense que aporta confiabilidad a los resultados y rapidez al proceso de investigación.

INTRODUCCION

La identificación de la especie humana es una necesidad social que se remonta a los primeros siglos de la humanidad, y día a día se hace más indispensable, sobre todo en el cambiante mundo en que vivimos, lo cual nos ha obligado a buscar la manera más eficiente de obtenerla.

Las cuestiones relacionadas con la identificación e individualización de las personas se hicieron más patente en el campo de procuración de justicia debido al incremento acelerado de la delincuencia y a la reincidencia de los delinuentes.⁽²⁾

Entre las ciencias forenses se encuentra la criminalística donde se aplican los sistemas de identificación tales como la antropometría física, el retrato hablado, la dactiloscopia (situada en la sociedad desde su descubrimiento como el símbolo único y permanente para diferenciar a una persona y otra), etc.; mismas que han servido a través de la historia para la identificación de personas vivas, muertas o de hallazgos corporales, contando con la intervención de las correspondientes instituciones de investigación y procuración de justicia, para corroborar o en su caso determinar con gran certeza, mediante un detallado análisis de las evidencias físicas y biológicas obtenidas de la intervención de uno o varios sujetos y por lo tanto la identidad de los mismos.

Una herramienta importante de la criminalística son los Laboratorios Forenses, los cuales utilizan un gran número de técnicas biológicas, inmunológicas, bioquímicas, químicas, matemáticas, microscópicas y físicas.

A mediados de los 80's, se incorpora el uso de técnicas moleculares en las Ciencias Forenses, surgiendo así una nueva etapa en la historia dando lugar a la creación de la Genética Forense, área altamente especializada en trabajar con los diversos tipos de muestras biológicas con el objetivo de aportar valiosos, certeros y confiables datos en el proceso de confrontación de especímenes biológicos, así como la continua búsqueda, desarrollo y mejora de procesos analíticos e instrumentales incrementando la rapidez del estudio y facilitando la interpretación de resultados.⁽³⁾

La genética forense trabaja básicamente con la tecnología del ADN (el cual puede ser extraído virtualmente de todas las formas biológicas de evidencia) definida como DNA fingerprinting (huella genética), utilizada para lograr la identificación inequívoca de personas independiente de estado físico en que se encuentren: vivas, muertas, parcialmente quemadas, ahogadas, putrefactas y descarnadas.

Esta tecnología permitió la utilización de los marcadores genéticos como son secuencias hipervariables presentes en el genoma humano, pueden detectarse ya sea en la secuencia nucleotídica misma a través de sustituciones de nucleótidos, o en la misma longitud generada por una misma secuencia que se repite un número diferente de veces, como fuera demostrado por primera vez por Wyman y White.⁽³⁾

En orden cronológico, puede decirse que el inicio de los análisis de ADN se produce en abril de 1985, cuando el primer caso judicial es resuelto por aplicación de técnicas moleculares de caracterización de secuencias hipervariables en el ADN.

Los resultados obtenidos mediante el estudio de las Huellas Digitales Genéticas (HDG) o "DNA-Fingerprinting" permitieron aclarar una disputa por inmigración a gran Bretaña. Poco tiempo después, una corte civil inglesa acepta la evidencia de ADN en un caso de paternidad discutida.

La aplicación de esta prueba en la investigación criminal se produce en octubre de 1986, en un caso de homicidio en el que se comprobó la inocencia del principal sospechoso.

A partir de 1987, las pruebas de ADN son admitidas como evidencia en las cortes criminales de Gran Bretaña y de Estados Unidos. (2, 6, 31)

En 1988, se desarrollan técnicas de amplificación de ADN de pequeñas regiones variables del genoma, partiendo de sólo 1700 células diploides, equivalentes a unos 10 nanogramos de ADN.

Estas técnicas denominadas genéricamente reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction o PCR), emplean iniciadores o primers, que son secuencias de ADN complementarias de las zonas flanqueantes de interés, las cuales son amplificadas por una enzima ADN polimerasa durante ciclos térmicos adecuados, lográndose millones de copias de la región.

En 1989, y a causa de estudios de dudosos valores de probabilidad de que un material genético proceda de un individuo determinado en comparación al resto de una población concreta, efectuados por la empresa americana Lifescodes Corp., en un caso criminal, se discute en Estados Unidos la validez científica de estas pruebas para uso forense, resultando en una revisión crítica de las técnicas utilizadas por los distintos grupos de investigadores.

En 1990, El U. S. Congress Office of Technology Assesment concluye que la identificación de individuos basada en las pruebas de ADN es científicamente válida, siempre que se disponga de la certeza metodológica de su realización. La estandarización de las mismas es llevada a cabo, entre otros, por los laboratorios del FBI.

La razón fundamental de la amplia difusión de estas técnicas estriba en el hecho de que, mientras la serología clásica y los marcadores genéticos evaluables fenotípicamente presentan un número muy limitado de genotipos posibles, el continuo descubrimiento de nuevas regiones hipervariables en el ADN resuelve el problema de la identificación certera de individuos y del establecimiento de vínculos biológicos de parentesco.

En los primeros trabajos la utilización de las técnicas de PCR, si bien permitían evaluar regiones de una muestra de ADN que podía estar muy degradada, la escasa variabilidad entre los individuos componentes de la población general impedía la certeza incriminatoria del análisis: era factible que una evidencia coincidente con un sospechoso por azar, y mucho más aún, que a un hombre le fuera atribuida erróneamente la paternidad biológica de un descendiente putativo.

A partir de los 90's, la posibilidad de evaluar un gran número de sitios variables localizados en diferentes zonas del genoma, permitió analizar, aunque fuera parcialmente, muestras de tejido humano quemado y en estado de putrefacción.

Posteriormente, la incorporación de un número aún mayor de sistemas hizo posible el establecimiento de vínculos biológicos de parentesco a través de ADN de muy pequeño tamaño, con lo cual se ha logrado la identificación de cadáveres momificados, con reducción ésea total o quemados.

Así, los sistemas de análisis de ADN pueden dividirse en dos grandes grupos: los basados en diferente longitud de la región variable, como lo son VNTR's (Variable Number Tandem Repeats, repeticiones en tandem de número variable) y todavía los más recientes son los STR's (Short Tandem Repeats o pequeñas repeticiones en tandem) y los basados en la secuencia nucleotídica.

Los polimorfismos de longitud pueden ponerse de manifiesto mediante enzimas de restricción (RFLPs) o por amplificación de la región variable con la PCR.

Los análisis mediante PCR fueron ganando espacio, debido a la relativa simplicidad de sus técnicas, menor costo e interpretación sencilla de los resultados, pero sobre todo por requerir de ínfimas cantidades de ADN para evaluar cada uno de los sistemas. En algunas muestras constituye la única posibilidad de lograr una caracterización genética.

Las unidades de repetición corta (STR's) representan una rica fuente de marcadores altamente polimórficos en el genoma humano, incrementando la designación de alelos en una población encuestada sobre las bases de su secuencia de ADN, además de ser utilizados para el mapeo físico y genético del genoma humano, diagnóstico de enfermedades e identificación personal en las ciencias médica y forense. ^(2, 4, 6)

El sistema de identificación por medio de repeticiones cortas en tandem proporciona un método que ofrece la posibilidad de discriminar a un individuo con un alto grado de confianza en una población determinada. Los resultados obtenidos a partir de estos marcadores sumados a los datos obtenidos a partir del análisis con los marcadores tradicionales, aumentan considerablemente la confiabilidad del resultado en el caso de que se trate de incluir o excluir a un individuo, pero sobre todo incluirlo como dueño de la evidencia biológica recuperada de algún hecho delictivo. ^(2, 4, 6)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la incorporación de los más recientes marcadores genéticos los STR's, con fines legales en los laboratorios de Genética Forense de las distintas procuradurías de Justicia de México, se hace necesario contar con información conjunta referente a ellos, con el propósito de esclarecer dudas surgidas por los involucrados en un proceso de Administración de Justicia (juces, ministerio público, abogados y peritos) para evitar la mala interpretación de los resultados, así como contar con la certeza de los mismos al conocer que cada acción realizada por el profesional esta debidamente fundamentada.

Por ende, la realización de esta monografía tuvo como principal reto la recopilación e integración de información acerca de los STR's, utilizados como marcadores genéticos dado su alto poder de discriminación, lo que permite incrementar el grado de probabilidad en la individualización de indicios biológicos e identificaciones forenses, así como dar un panorama general sobre la tecnología actualmente aplicada para su estudio y la que se encuentra en investigación para ser utilizada en un futuro no muy lejano.

OBJETIVO

Realizar una monografía que proporcione un panorama general de la tipificación del ADN usando como marcadores genéticos al sistema STR, así como de la metodología empleada en su análisis, la tecnología aplicada, además de establecer su importancia desde el punto de vista forense.

GENERALIDADES DEL MATERIAL GENETICO

La unidad fundamental de la vida es la célula, por lo que cada una de las células que conforman cualquier ser vivo tiene núcleo, que va a tener en su interior el ADN necesario para desarrollarse y cumplir la misión encomendada por la naturaleza. El conjunto del ADN que posee cada célula se denomina genoma. Sin embargo, existen unas células muy específicas, que no tienen núcleo y que, por lo tanto, no poseen ADN, por ejemplo, los eritrocitos.

Según su localización y estructura existen con dos tipos de ADN en el organismo, el ADN nuclear, (al cual nos enfocaremos) y el ADN mitocondrial, localizado en el interior de un organelo celular denominado mitocondria.

Ambos tienen interés forense y poseen características que los hacen complementarios a la hora de la identificación y de investigar las relaciones familiares. ⁽²⁾

La estructura de una determinada molécula de ADN está definida por la "secuencia" de las bases nitrogenadas en la cadena de nucleótidos, residiendo precisamente en esta secuencia de bases la información genética del ADN. El orden en el que aparecen las cuatro bases a lo largo de una cadena en el ADN es, por tanto, crítico para la célula, ya que es este orden el que constituye las instrucciones del programa genético de los organismos.

Conocer esta secuencia de bases, es decir secuenciar un ADN equivale a descifrar su mensaje genético.

1.1 Estructura molecular del material genético

Los elementos básicos del ADN se aislaron y analizaron mediante ruptura parcial del ADN purificado. Tales estudios demostraron que el ADN estaba compuesto sólo de cuatro moléculas básicas, llamadas nucleótidos, idénticas entre sí, excepto en que cada uno contiene una base nitrogenada diferente.

Cada nucleótido contiene tres entidades diferentes y fundamentales:

un anillo heterocíclico de átomos de carbono y nitrógeno (la base nitrogenada),
un azúcar de cinco átomos de carbono en forma de anillo (una pentosa), llamada desoxirribosa, y
un grupo fosfato en la posición 5' del azúcar.

Las bases nitrogenadas son de dos tipos: Las purinas que poseen un anillo de cinco y seis lados fusionados; las pirimidinas que tienen un anillo de seis lados. Las cuatro bases son adenina, guanina (purinas), citosina y timina (pirimidinas). Los nombres químicos completos de los nucleótidos son 5'-monofosfato de desoxiadenosina (o desoxiadencilato o DAMP), 5'-monofosfato de desoxiguanosina (desoxiguanilato o DGMP), 5'-monofosfato de desoxicitidina (dexcitidilato

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

o DCMP) y 5'-monofosfato de desoxitimidina (desoxitimidilato o DTMP). Sin embargo resulta más conveniente referirse a cada nucleótido por la abreviatura de su base (A, G, C y T, respectivamente). En ausencia del grupo fosfato, la base y la desoxirribosa forman un nucleósido en lugar de un nucleótido. ^(7, 8, 9)

Estructuralmente el ADN es un polinucleótido, producto resultante de la condensación de nucleótidos. Esta polimerización se lleva mediante enlaces 3'5' fosfodiéster, ya que uno de los residuos nucleotídicos adyacentes como resultado de la esterificación de dos de los tres grupos hidroxilo del ácido fosfórico. Por ejemplo, en la desoxirribosa se encuentran dos grupos hidroxilo libres en los carbonos C-3' y C-5'.

Como se observa en la figura 1.1, el esqueleto de azúcar-fosfato-azúcar-fosfato se localiza en el exterior de la molécula con las bases proyectándose hacia el centro. ^(7, 8, 9)

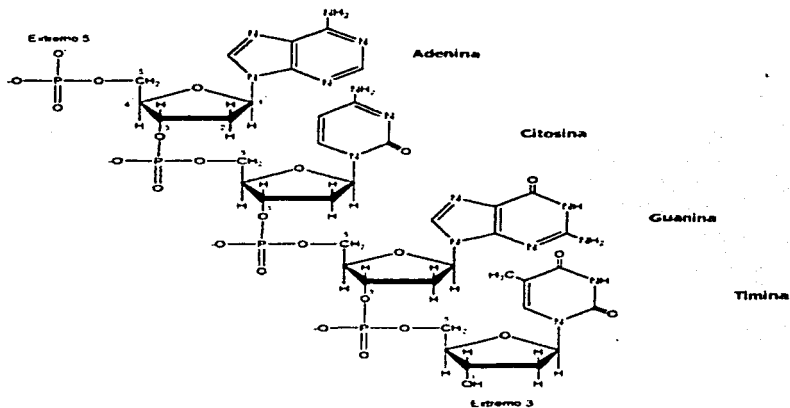


Figura 1.1 Estructura de un segmento polinucleotídico de ADN.

FINIS CON
FALLA DE ORIGEN

La estructura que diseñaron James Watson y Francis Crick en 1953, es una doble hélice de rotación derecha que se enrolla alrededor del mismo eje. Las dos cadenas se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno que están presentes entre cada base de una cadena con una base asociada a la otra, en los que dos átomos electronegativos comparten un protón, entre las bases. Los puentes de hidrógeno se producen entre átomos de hidrógeno con una pequeña carga positiva y átomos con una pequeña carga negativa.

Como se ve en la figura 1.2, los puentes de hidrógeno se forman entre pares de bases. Cada par de bases consiste en una purina y una pirimidina, emparejadas de acuerdo con la regla siguiente: G empareja con C, y A lo hace con T. ^(7, 8, 9, 16, 17)

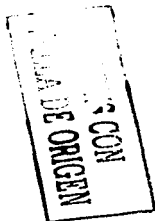
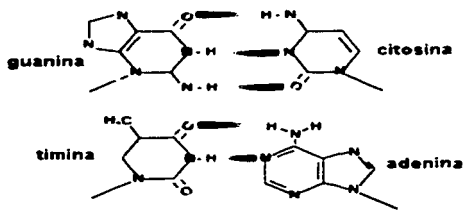


Figura 1.2 Muestra los puentes de hidrógeno formados entre las pares de bases correspondientes entre sí

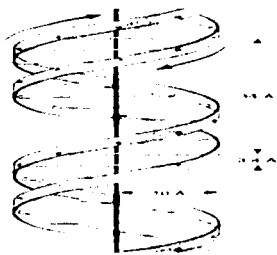
La distancia entre el átomo de fósforo del esqueleto y el centro del eje es de 10 \AA . (por lo tanto el ancho de la doble hélice es de 20 \AA).

El ancho de 20 \AA de la fibra requiere que una pirimidina de una cadena siempre se aparee con una purina de la otra cadena (cadena complementaria), si no la asociación de dos purinas se extendería más allá del ancho requerido. ^(7, 8, 9, 16, 17)

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

Las dos cadenas comprenden una doble hélice y las cadenas corren en direcciones opuestas, es decir son antiparalelas. En otras palabras, si una cadena esta alineada en la dirección 5'-3', su cadena asociada debe alinearse en dirección 3'-5'. (7, 8, 9, 16, 17)

La doble hélice da una vuelta completa cada 10 residuos (34 Å) ó 150 vueltas por millón de peso molecular. Cada par de bases tiene un giro de -36° alrededor del eje de la hélice con respecto al par de bases siguiente. Por lo tanto ~ 10 pares de bases completan una vuelta de 360° . El giro de las dos cadenas, una alrededor de la otra, forma una doble hélice con un surco menor (~ 12 Å) y un surco mayor de alrededor de 22 Å. Como se observa en la figura 1.3, la doble hélice es dextrógira; es decir, da vueltas en el sentido de las manecillas del reloj si se mira a lo largo de la hélice. Estas características corresponden al modelo aceptado para la forma llamada forma B del ADN. (14, 15, 16, 17)



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 1.3 Modelo simplificado de la Estructura helicoidal del ADN.

El orden en que se unen los nucleótidos, se denomina secuencia. No existe ninguna restricción en la secuencia de bases de una determinada cadena de una molécula. Sin embargo, una vez que la secuencia en particular se especifica en una cadena, la secuencia de la otra cadena se determina automáticamente.

Es crucial que el material genético se reproduzca con exactitud: como las dos cadenas polinucleotídicas sólo están unidas por puentes de hidrógeno, son capaces de separarse sin necesidad de romper enlaces covalentes. La especificidad de los pares de base permite que, una vez separadas, cada una de las cadenas pueda actuar como molde para la síntesis de una cadena complementaria. Por medio de unas enzimas llamadas polimerasas, sobre el molde que supone las cadenas simples, unen uno a uno los nucleótidos, formando una nueva cadena complementaria e igual a la cadena que estaba anteriormente unido a la misma. De esta forma, la estructura del ADN contiene la información necesaria para perpetuar su secuencia. (7, 8, 9, 13, 14)

1.2 Los cromosomas

De manera general, el genoma humano contiene aproximadamente 6×10^9 pares de bases por célula somática o diploide y 3×10^9 pares de bases por células gaméticas o haploides; este ADN está repartido en 44 cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales (XX o XY) respectivamente, para cada tipo de célula. ⁽¹⁸⁾

Los cromosomas no tienen un grosor uniforme en toda su longitud, sino que presenta una constricción o porción más estrecha llamado centrómero, este es el responsable del movimiento de los cromosomas durante la división nuclear; este tiene diferentes posiciones a lo largo del cromosoma. Como se muestra en la figura 1.4, el centrómero divide al cromosoma en 2 brazos, siendo p el más corto y q el más largo. Esta nomenclatura y las técnicas de bandeado cromosómico, permitieron ubicar y ordenar por regiones los genes a lo largo de cada cromosoma ⁽⁹⁾

ESTRUCTURA GENERAL DEL CROMOSOMA

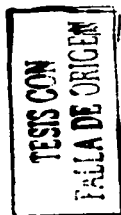
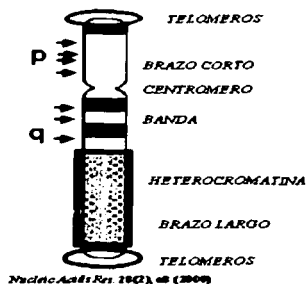


Figura 1.4 Esquema representativo de un cromosoma

Para que cada cromosoma representara una doble hélice de ADN, las hélices deberían estar muy enrolladas y compactas, puesto que la cantidad de ADN presente en cada núcleo es tal que si estuvieran completamente extendidos sumarían varios metros. ¿Cómo es posible empaquetar el ADN?, si las células son muy pequeñas. El empleo de la microscopía electrónica permitió estudiar en forma más detallada a la cromatina que consiste en el empaquetamiento del ADN con proteínas, formando un complejo para hacerlo más manejable y compacto en la célula. El componente proteico principal de la cromatina son las histonas, estas son proteínas básicas con carga parcial positiva ricos en residuos de lisina y arginina desempeñando un papel importante en la fijación del esqueleto azúcar-fosfato que tiene carga negativa. ^(9,19)

En 1975, Oudet y colaboradores determinaron que el primer paso de la condensación comprende la formación de los nucleosomas, estas estructuras son cuentas que contienen 2 vueltas de ADN y son la parte fundamental de la cromatina. Hasta 1977, Finch y colaboradores determinaron que cada nucleosoma está compuesto por las histonas (nucleoproteínas) H2A, H2B, H3 y H4 formando un octámero donde existen aproximadamente 146 pb de ADN, los nucleosomas adyacentes están separados por un ADN de enlace de 54 pb y unida por una quinta histona llamada H1 propiciando que la condensación sea mucho mayor y haciéndose notar como una fibra de 30 nm de diámetro que parecen cuentas ensartadas en un hilo, así, la cromatina queda condensada 8,000 veces en relación con el ADN extendido de forma natural. Se ha estimado que hay aproximadamente 3.4×10^7 nucleosomas repartidas en los 46 cromosomas donde aproximadamente tendrán 2.6×10^8 pares de bases por cromosoma autosómico. ^(9, 20)

Algunas regiones del cromosoma son activas y otras inactivas. La cromatina inactiva se le conoce como heterocromatina y hay dos tipos, la constitutiva y la facultativa. La heterocromatina (condensada e inactiva) se encuentra en regiones cercanas al centrómero y en los extremos del cromosoma (telómeros). La heterocromatina facultativa en ocasiones está condensada pero otras veces es transcrita activamente y por consiguiente no está condensada apareciendo como eucromatina. Un ejemplo es el de los dos cromosomas X en las hembras de los mamíferos, un cromosoma X está casi completamente inactivo para la transcripción y en los machos está completamente activo. ^(9, 22)

1.3 Los genes como elemento de la herencia

Los rasgos heredados se definen por su capacidad de pasar de una generación a la siguiente de una forma predecible. El gen es la unidad de la herencia. La biología molecular que lo estudia, desde el punto de vista molecular, lo define como "la secuencia de ADN cromosómico que contiene la información requerida para fabricar un RNA y, a través de éste, una proteína". Se estima que existen unos 32,000 genes, y que en total abarcan aproximadamente sólo el 10 % del ADN, ignorándose el significado del ADN restante. ^(7, 13)

Un gen es una entidad estable, pero está sujeto a cambios ocasionales de secuencia. Tales cambios se denominan mutaciones ⁽⁷⁾, éstas pueden o no tener efectos negativos; o bien no reflejarse en el fenotipo aun cuando el cambio se presente en el genotipo. ⁽¹⁸⁾ La mutación en la cadena del ADN constituye el proceso fundamental de la genética ya que son transmitidos de los antecesores a los descendientes, este cambio ocurre constantemente en todo el organismo ya que es una característica ligada al proceso de la vida. ⁽²³⁾

Los atributos esenciales del gen fueron definidos por Mendel hace más de un siglo. Como resumen de sus dos leyes, el gen fue reconocido como un "factor discreto" que pasa inalterado de los padres a la descendencia. Normalmente consideramos la genética desde la perspectiva del organismo, pero la alternancia de generaciones también permite contemplar al organismo por el medio por el que el gen se expresa y perpetúa. ⁽⁷⁾

Estructura del gen

El gen posee varias partes funcionales, que controlan su actividad. Se dividen en tres grupos:

1. Secuencias que en conjunto componen el llamado promotor, que señala a partir de que nucleótido el gen comienza a transcribirse y que inicia la transcripción.
2. Otras secuencias, denominadas reguladoras, que determinan en que momento el gen comienza a transcribirse y cuantas veces debe hacerlo en un tiempo dado. Existen dos tipos de reguladores, los amplificadores y los inhibidores.
3. Finalmente en la cercanía del extremo 3' del segmento codificador, el gen posee una sección de ADN llamada secuencia de terminación.⁽⁵⁾

En el segmento codificador, muy pocos genes poseen una secuencia de nucleótidos totalmente utilizables, ya que en la mayor parte de los casos presentan tramos de nucleótidos ociosos, llamados intrones. Como se observa en la figura 1.5, estos sectores "superfluos" de ADN se hallan intercalados entre los segmentos provechosos, a los que se denominan exones. La molécula completa de ARN surgida de la transcripción lleva el nombre de transcripto primario: En ella no solo han sido copiados los exones sino también los intrones. Antes de abandonar el núcleo, los intrones son removidos del ARN del transcripto primario por un proceso que incluye cortes entre los intrones y los exones y ulteriores empalmes entre los extremos libres de estos últimos, lo que elimina las secuencias inútiles y crea una molécula de ARN maduro continua en la que las secuencias aprovechables se hallan alineadas en forma consecutiva.

Los intrones no poseen función codificadora. Estas secuencias, que probablemente constituyen la mayor parte del ADN, están sometidas a presiones evolutivas de carácter diferente a las impuestas por la necesidad de codificar una secuencia de aminoácidos.^(7,13)



Figura 1.5 Representación esquemática de un gen eucariótico.
Tomado de Devlin, T.M (Ed). Bioquímica

CON
ORIGEN

Código genético

La síntesis del ARN (ácido ribonucleico), usa como molde el ADN, se denomina transcripción, mientras que la síntesis de la proteína, cuyo molde es el ARNm, lleva el nombre de traducción. Como se observa en la figura 1.6, este flujo de información se conoce como el "dogma central" de la biología molecular. ^(7, 8, 9)

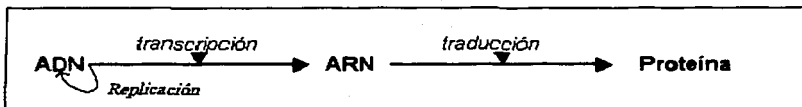


Figura 1.6 Este flujo de información se conoce como el "dogma central" de la Biología Molecular

Cuando un gen contiene la información necesaria para generar un ARN o una proteína suele decirse que el gen codifica a una de esas moléculas. Esta expresión se debe a que las instrucciones trasladadas del ADN al ARN, y en el caso del ARNm, de éste a la proteína, son transmitidas en forma de código. ^(7, 11, 13)

El sistema de códigos utilizado por las células se basa en el orden en que se encuentran los nucleótidos en el ADN, que determina el ordenamiento de los nucleótidos en el ARN, y por ende la secuencia de los aminoácidos en la proteína.

El código genético se lee en grupos de tres nucleótidos, cada uno de los cuales representa un aminoácido. Cada secuencia trinucleotídica se denomina codón. Un gen contiene una serie de codones, que se leen en serie desde el punto de iniciación situado en un extremo hasta el punto de terminación situado en el otro extremo. ^(7, 11, 13)

1.4 Organización del genoma humano

El ADN contiene secuencias de ADN codificante o no repetitivo y ADN no codificante o repetitivo.

Las secuencias no repetitivas del ADN, se componen de secuencias de nucleótidos que fluctúan entre 800 a 2000 pares de bases. Como se observa en la figura 1.7, esta fracción tiene la mayor parte de la información genética para la producción de proteínas; A esta familia se le conoce como la familia multigénica que estrictamente sólo existe una copia por genoma y constituye solamente menos del 10 % del genoma. La parte complementaria es la más abundante de todo el genoma y tiene la función de espaciador de regiones exónicas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El ADN expresivo o codificante, a pesar de ser el más interesante desde el punto de vista médico, posee poca variabilidad entre las personas, con excepción de ciertas regiones, como la que informa para el sistema HLA.

El ADN no codificante o ADN repetitivo, son cortas secuencias repetidas en forma de copias idénticas o parecidas. Las dos clases de ADN repetitivo poseen diferentes características:

- ADN moderadamente repetitivo. A esta subagrupación le denominan elementos interspaciadores cortos conocidos como SINES que comprenden a los polinucleótidos mayores de 300 pares de bases y menores de 500 pares de bases en longitud y los elementos interspaciadores largos llamados LINES que comprenden a polinucleótidos mayores de 500 pares de bases y menores de 800 pares de bases.
- ADN altamente repetitivo, suele estar formado por secuencias muy cortas que están repetidas en tándem, formando grandes agrupamientos. Debido al corto tamaño de la secuencia repetida, a menudo se le denomina ADN de secuencia sencilla o se define como VNTR's o STR dependiendo del número de bases que se repitan en tándem.

1.
Puede variar bastante la longitud de secuencias altamente repetitivas, de 2 hasta menos de 300 pares de bases. A este tipo de secuencias en tándem se le conoce como ADN satélite, que como ya dijimos tiende a localizarse en la heterocromatina constitutiva de los cromosomas, en particular en los centrómeros. (2, 7, 16, 20, 21)

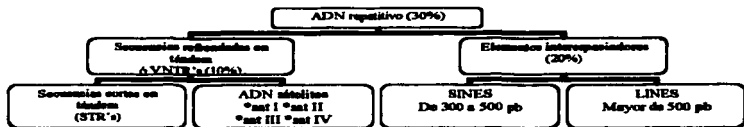


Figura 1.7 organización del genoma humano.

La subagrupación de los VNTR's están formados por el ADN satélite, que integran a polinucleótidos mayores de 10 pb y menores de 300 pb en longitud. El ADN minisatélite comprende a polinucleótidos mayores de 7 pb y menores de 10 pb en longitud, y el ADN microsatélite que está formado por polinucleótidos de 2-6 pb en longitud, llamados también STR's o repeticiones cortas en tándem. (2, 7, 16, 20, 21)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MARCADORES GENETICOS

2.1 Polimorfismos genéticos

Se define polimorfismo como la frecuencia en la población de dos o más formas alternativas y distintos fenotipos que resultan de la variación alélica en un *locus*. En otras palabras, expresa la variabilidad que existe dentro de un fragmento de ADN. Como regla general, cuantos más alelos haya, mayor polimorfismo y por ende, mayor poder de identificación. ^(2, 23)

Con anterioridad al desarrollo de las técnicas de bandas, ya se habían establecido variaciones en la morfología de algunos segmentos cromosómicos, sin que esto necesariamente repercutiera en una patología específica. Estas variantes reciben el nombre de polimorfismos. Así, Donahue y colaboradores informaron del primer gen localizado en un cromosoma humano asociado a un polimorfismo: el grupo sanguíneo Duffy en el cromosoma número 1 asociado a la presencia y segregación familiar del polimorfismo de su constricción secundaria (variante 1gh+). ^(2, 6)

El polimorfismo del ADN está determinado por regiones hipervariables, que involucran un cambio de base o un número determinado de bases repetidas en tándem o secuencias específicas de diversas longitudes; estos polimorfismos tienen una gran variedad de alelos existentes

El ADN codificante es, en general, poco polimórfico, con excepción de la región HLA. En cuanto, al ADN no codificante, es altamente polimórfico.

Existen dos tipos de polimorfismos:

1. Polimorfismos de sitio o de secuencia. En donde la variabilidad alélica, como se observa en la figura 2.1a, es debida a diferencias en sitios específicos de la molécula de ADN. En estos *loci* polimórficos la presencia de varias bases químicas (secuencias polindrómicas) particular del ADN confiere susceptibilidad a la acción de corte por unas tijeras químicas (enzimas) conocidas como endonucleasas de restricción. La forma alternativa del gen el cual carece de esta secuencia química particular, es decir, la ausencia del sitio de restricción no permite el corte por la endonucleasa en este sitio. Así la presencia o ausencia de sitios de restricción dan como resultado fragmentos cromosómicos de longitud de los cromosomas del padre y de la madre. Los fragmentos resultantes del tratamiento enzimático se separan por tamaño bajo una corriente eléctrica a través de un gel (electroforesis) y utilizando un ADN que tenga una secuencia similar al ADN que es hibridizado (acoplado). Estos polimorfismos de sitio son mejor conocidos como fragmentos de restricción de longitud polimórfica o FRLP. ^(23, 25)

2. Polimorfismos de longitud. Pueden presentarse en repeticiones múltiples de segmentos de corta longitud de ADN. En cada uno de los segmentos repetidos de la secuencia es similar, como se observa en la figura 2.1b, pero el segmento de longitud varía. Estos *loci* son

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conocidos como número de repeticiones en tándem (VNTR) o repeticiones cortas en tándem (STR's). Las secuencias en tándem se consideran que son alelos de longitud de bases. ⁽²⁷⁾

Para un locus VNTR o STR, un individuo tiene dos alelos, uno en cada cromosoma. Los dos alelos pueden ser de la misma longitud o ser diferentes; así, para un locus VNTR o STR simple, cada individuo tiene una banda (homocigoto) o dos bandas (heterocigoto). Las secuencias repetitivas pueden presentarse en loci múltiples sobre varios cromosomas. ^(23, 24)

a) --TGTCACATA C GGAGCATACG--
--TGTCACATA G GGAGCATACG--
b) --AATCGT CACACA GTAACCTTACGCT--
--AATCGT CACACA GTAACCTTACGCT--
--AATCGT CACACACACA GTAACCTTACGCT--

Figura 2.1 Polimorfismos en el ADN. a) presenta un cambio en el par de bases C por G. b) presenta las secuencias de bases -CA- repetidas en tándem: (Davies,1992)

2.2 Marcadores genéticos

La individualidad genética de la raza humana es el dogma central de la biología humana. Esta individualidad se define por la combinación de marcadores genéticos que un individuo hereda de sus padres.

Los marcadores genéticos se pueden analizar al nivel de variación de proteínas o de variación en la secuencia de ADN.

El objetivo de los marcadores genéticos es determinar que alelos están presentes en un loci genéticamente variable.

Una clara ventaja de la determinación de los genotipos de los diversos marcadores genéticos es el potencial de detectar variación genética más allá de la que resulta de un cambio sobre una propiedad física. ^(27, 28)

2.2.1 Marcadores genéticos forenses

Los individuos pueden distinguirse por su perfil de marcadores genéticos. Si el número de marcadores fuera ilimitado, más diferencias entre los individuos serían reveladas, sin embargo, no todos los marcadores genéticos son adecuados para aplicaciones forenses, por lo que éstos deben seleccionarse cuidadosamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los criterios para evaluar los marcadores genéticos para uso forense son diversos; como se observa en la tabla 2.1, algunos factores se relacionan con el método de análisis y otros con la naturaleza del marcador. Las ventajas de la selección de los marcadores genéticos forenses son que incrementan el poder de discriminación para obtener información útil de muestras forenses.
(37)

CRITERIOS PARA EVALUAR LOS MARCADORES GENÉTICOS ADECUADOS

Método de análisis	Naturaleza del marcador
Confiable, rápido y simple de llevar a cabo.	Heredado de otros marcadores a ser analizados.
Consumo poco material.	Polimórfico con un alto grado de heterocigocidad.
Detecta diferencias cualitativas no ambiguas entre alelos.	Datos de frecuencia poblacional conocidos.

Tabla 2.1 Criterios para evaluar los marcadores genéticos adecuados (Turgeon M. L. 1989).

Vale la pena remarcar la importancia de tener disponible un método analítico que requiera sólo una pequeña cantidad de material para tipificación de muestras forenses. Frecuentemente la cantidad de material encontrado como evidencia disponible para análisis es muy pequeña e irremplazable. Mientras menos cantidad de muestra se consume en el análisis, habrá más oportunidades de tipificar la muestra y analizar marcadores adicionales. Además, es deseable retener una porción de la muestra para pruebas subsecuentes; esta práctica, se realiza como parte del sistema de chequeo y balance en todas las ciencias que comprenden el sistema judicial. (29)

Los tres criterios relacionados con la naturaleza de un marcador genético útil están basados en la información que se puede obtener a partir de estudios genéticos y análisis estadísticos de las frecuencias del gen (alelo). (23, 27)

Los marcadores considerados como polimorfismos genéticos son aquellos donde la frecuencia del genotipo excede el 1 % de la población, excluyendo a muchos sistemas genéticos de interés en medicina como los errores congénitos del metabolismo cuya frecuencia en ningún caso es superior al 1% estipulado.

2.2.2 Aspectos forenses del análisis de los marcadores genéticos

El objetivo principal del análisis forense del ADN es obtener una identificación confiable del donador de la evidencia. Por lo que el análisis debe emplear marcadores genéticos altamente informativos y debe desarrollarse de forma fácil en un laboratorio forense típico en donde, los

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

fluidos biológicos son en mayor frecuencia los elementos clave en la investigación de muchos tipos de crímenes.

La finalidad de los estudios criminalísticos que lleva el perito en Genética Forense es determinar, por medio de la tipificación de marcadores genéticos si la evidencia biológica pudo originarse a partir de un individuo en particular, ya sea de la víctima o del sospechoso. Decidir que pruebas de tipificación deben ser aplicadas basándose en el origen, tiempo y condición de las muestras, seleccionando aquellas pruebas que proporcionen una mayor discriminación.

Si un único marcador genético obtenido a partir de la evidencia no concuerda con el marcador de referencia del individuo en cuestión, entonces el sujeto puede excluirse como el donador del fluido biológico con absoluta seguridad. Si, por otra parte, los marcadores genéticos del individuo concuerdan con todos aquellos obtenidos a partir de la evidencia entonces un origen común es posible.

Una concordancia en la tipificación genética, no constituye una identificación, ya que una porción de la población en general puede también compartir el mismo arreglo de los tipos de marcadores genéticos en cuestión. Por lo tanto, mientras más grande sea la porción de la población excluida, más grande será el peso de la evidencia.

El perito presenta los resultados de las pruebas de tipificación junto con la interpretación estadística apropiada al jurado o al juez, quienes entonces consideraran esta evidencia junto con otras circunstancias del crimen para rendir su veredicto. ^(CS 4, 6, 30, 31)

LA INDIVIDUALIZACION DEL SER HUMANO

3.1 Marcadores genéticos tradicionales

Los marcadores genéticos adoptados en el área legal y forense deben, volvemos a reiterar ser polimórficos, es decir, que se encuentren más de dos alelos de un gen en particular dentro de una población determinada. Se dice que un *locus* es polimórfico si las frecuencias de los alelos más comunes son menores del 95 %.^(2, 4, 31)

Las técnicas bioquímicas de identificación de individuos, previas al conocimiento actual del ADN, se basan en la comparación de productos de expresión de diferentes genes. Estas proteínas, como los antígenos eritrocitarios (grupos sanguíneos), enzimas eritrocitarias, proteínas plasmáticas y antígenos de histocompatibilidad (HLA), son marcadores que se transmiten obedeciendo a las leyes mendelianas de la herencia.^(2, 6)

En los grupos sanguíneos sus antígenos se hallan en la superficie de los glóbulos rojos, y sus correspondientes anticuerpos forman parte de las inmunoglobulinas del plasma.

Los antígenos del sistema ABO se hallan también en otras células y en fluidos corporales (saliva, orina, semen, leche) en individuos secretores. Al sistema ABO, descubierto en 1901 por Landsteiner, se fueron agregando posteriormente otros, como el RH, MNS, Duffy, Lewis, Kidd, Lutheran, etc.^(6, 30, 31)

Los grupos sanguíneos fueron los primeros marcadores en emplearse en el sistema forense; sin embargo tienen la desventaja de que no presentan un alto polimorfismo, la tipificación se realiza con antisuero y en ocasiones se dificulta la identificación del grupo cuando la cantidad de muestra es relativamente pequeña o de mala calidad.⁽³²⁾

En conjunto, presentan un rango de probabilidad de exclusión (es decir, de excluir la paternidad biológica de padres falsamente alegados), de alrededor del 75 %.⁽⁶⁾

La segunda generación de marcadores genéticos incluye a las enzimas eritrocitarias y enzimas plasmáticas, ambas presentan gran polimorfismo y se determinan por variantes electroforéticas; se requieren de muestras que no estén desnaturalizadas y de cantidades razonables para su análisis.⁽³⁰⁾ Se ha estimado que solamente el 28 % de las proteínas son polimórficas.⁽³³⁾

Las más frecuentemente utilizadas como marcadores genéticos en las pruebas de filiación son la haptoglobina, alfa-1- antitripsina, transferrina, proteínas grupo específicas Gc, alfa 1glicoproteína ácida, factor B del sistema properdina, fracción C3 del complemento, alotipos Gm y Km, de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas. Su rango de probabilidad de exclusión es de alrededor de 71 %.^(6, 30)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Otros marcadores genéticos son las enzimas eritrocitarias siendo la fosfatasa ácida eritrocitaria (EAP) la que presenta mayor polimorfismo, pero también se encuentran la adenilato kinasa (AK), transaminasa glutámico-pirúvica (GPT), fosfoglucomutasa (PGM), esterasa D (EsD), adenosín deaminasa (ADA), fosfogluconato dehidrogenasa (PGD) y glioxalasa (GLO). El rango de probabilidad de exclusión oscila en el 61 %.^(6, 30)

Las proteínas antigénicas del HLA serológico están codificados por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, ubicados en los loci A, B, C, D, DR, DQ y DP del brazo corto del cromosoma 6.^(6, 23, 30)

Los antígenos HLA-A, B y C están presentes en todas las células nucleadas del organismo; en cambio los HLA-D y R se distribuyen en forma más limitada: sobre linfocitos B, macrófagos, espermatozoides, células de Langerhans, etc. Presentan en su conjunto un rango de probabilidad de exclusión de aproximadamente 95 %.^(6, 23, 30)

Las pruebas de HLA en estudios de paternidad comenzaron a ser aceptadas en las Cortes a partir de principios de los '70, aunque su origen científico se sitúa unos 15 años antes por su utilidad en otra área de la identificación humana; la determinación de la compatibilidad entre dador y receptor de un trasplante de órganos.^(6, 30)

El total de exclusión para los 4 sistemas anteriores es del 99.7 % para la población del valle de México.⁽³⁰⁾

Se han realizado estudios de frecuencias fenotípicas en diferentes grupos sociales que han contribuido a conocer la distribución de frecuencias alélicas y genéticas, que han sido empleadas para la identificación de personas y en las determinaciones de parentesco biológico.^(34, 35)

Las muestras biológicas de procedencia de escenas de delitos consisten principalmente de manchas sanguíneas, manchas seminales o de algún otro fluido donde la mayoría se encuentran en las superficies de las prendas; a partir de estas muestras es posible identificar al autor (cs) del supuesto delito, aplicando los marcadores genéticos tradicionales siempre y cuando las muestras biológicas sean de buena calidad y suficiente para realizar el análisis.⁽³²⁾ sin embargo la gran mayoría de las evidencias biológicas están expuestas a la agresividad del medio ambiente como la luz solar, la temperatura, humedad, microorganismos, enzimas proteolíticas de los fluidos, y el tiempo entre otros factores que ocasionan la desnaturalización de las proteínas propiciando resultados erróneos, difíciles de interpretar o haciendo imposible la determinación del marcador.^(32, 36) En las determinaciones de paternidad, la identificación del supuesto padre se realiza por la intersección entre la frecuencia de los marcadores empleados en la población y hasta ese momento se trata de una correlación.⁽³⁷⁾

Los marcadores tradicionales no se pueden aplicar en muestras de fluidos contaminados como es el producto de una violación, en tejido muscular, tejido óseo, en cabellos de raíz, en muestras de tejido parcialmente calcinado y momificado, marcando de esta manera algunas desventajas respecto a las características de la muestra para su identificación.^(32, 36, 38)

3.2 Marcadores genéticos basados en el estudio del ADN

La tipificación de un marcador genético amplificado por PCR se basa en la detección de variaciones en la secuencias de ADN. Un tipo de polimorfismos es el cambio de una simple base. El segundo es la variación de las secuencias repetitivas, VNTR's o STR's de genes específicos o polimorfismo de longitud. Algunos de los minisatélites y todos los microsatélites pueden ser amplificados por esta técnica de PCR, llamándose también como fragmentos amplificados de longitud polimórfica (AMP-FLP's) a los VNTR para diferenciarlos cuando se hace la tipificación del ADN con base en los fragmentos de restricción de longitud polimórfica ó RFLP's. ^(2, 31)

Existen en la actualidad kits que contienen todo lo necesario para llevar a cabo la técnica de PCR y que son específicos para determinado marcador genético. Algunos de estos sistemas son el, HLA DQ A1, Polymarker, D1S80 éstos son todavía ampliamente utilizados debido a su variación alélica que presenta dentro de la población. Se han llevado a cabo estudios para determinar la frecuencia de marcadores genéticos en diferentes poblaciones del mundo, donde los resultados revelaron una alta heterocigocidad y un alto poder de discriminación.

A diferencia de la tipificación de polimorfismos en la secuencia de un gen, el análisis de los VNTR's y actualmente de los STR's ofrecen una mayor ventaja pues hay más alelos en la población y por lo tanto un mayor número de combinaciones pueden obtenerse. ⁽²⁸⁾

3.2.1 Polimorfismos de secuencias nucleotídicas

Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA región DQalfa)

El polimorfismo de secuencia se puede detectar de una manera fácil y rápida empleando sondas de oligonucleótidos alelo-específicos (ASO). Bajo las condiciones adecuadas, este tipo de sondas solo hibridan con las secuencias con las que se aparean perfectamente.

Dentro de este tipo se encuentra el sistema DQ A1, el cual es un gene que pertenece al complejo mayor de histocompatibilidad clase II y contienen una región polimórfica dentro del segundo exón. La tipificación de la región DQ A1 no solo es indispensable en la investigación de enfermedades del sistema inmunitario y la tipificación de tejidos para el transplante de órganos, sino que se ha convertido en una herramienta imprescindible en la identificación de individuos. Este fue el primer sistema que se utilizó con fines forenses aplicando la PCR. Se han observado en la región DQ A1 seis alelos (DQA 1.1, 1.2, 1.3, 2, 3 y 4) cuya combinación definen 21 genotipos. La identificación de este sistema como ya dijimos, se realiza con sondas de oligonucleótidos alelo-específicas (ASO) que están fijadas en membranas de nylon, dichas sondas son complementarias a la secuencia amplificada. A este método se le conoce como reverse del dot blot. La hibridación de las sondas con el producto amplificado se lleva a cabo bajo condiciones estrictas de lavados y temperatura, ya que se utiliza una enzima conjugada que produce la reacción de color la cual revela el alelo presente en una determinada muestra.

Este método es específico ya que permite observar cualquier variación alélica, debido a que en el soporte de nylon se encuentran las secuencias que son complementarias para cada uno de los alelos posibles.^(31, 36)

Polymarker

Este sistema incluye la tipificación simultánea de cinco loci genéticos como lo son: receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), Glicoforina A (GYPA), Gammaglobina Hemoglobina G (HBGG), D7S8 y componente específico de grupo (CG). Los alelos así como su localización en los cromosomas se enuncian en la tabla 3.1, incluyendo HLA DQalfa.

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

Tabla 3.1 Tomado del protocolo de ampliación del kit forense de polymarker. Perkin Elmer.

A pesar de que los seis loci génicos sólo poseen 2 ó 3 alelos por cada locus, este sistema es muy útil en la identificación forense de evidencia biológica y en pruebas para la determinación de paternidad, y de igual forma que en el sistema HLA DQ A1. Se utiliza el método reverse dot blot para la obtención del genotipo.⁽³⁶⁾

Variantes de ADN mitocondrial

Dentro de los sistemas cuya variación reside en la secuencia de nucleótidos, merece especial atención el estudio del ADN presente en las mitocondrias. En el año 1981, Anderson y col. Publican la secuencia completa del ADN mitocondrial (Anderson et al., 1981), de aproximadamente 16,5 Kb, que presenta una región no codificante, denominada D loop, donde se encuentra el origen de replicación, y que se caracteriza por presentar sitios con elevado índice de mutación.

Debido a que la información contenida en la secuencia mitocondrial es heredada a partir de la vía materna exclusivamente esto permite establecer un vínculo de parentesco entre individuos maternalmente relacionados. El análisis de la secuencia permite diferenciar un individuo de otro de distinto linaje materno.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Esta característica, sumada a que cada célula contiene una gran cantidad de mitocondrias y por ello el genoma mitocondrial se halla mucho más representado que el contenido en el núcleo celular, hace que este sistema sea de suma utilidad, principalmente en los casos de material ampliamente degradado.

A partir del análisis de esta secuencia han sido caracterizados restos arqueológicos de varios miles de años de antigüedad en los que fue factible obtener ADN mitocondrial relativamente bien conservado. ^(6, 31, 41)

3.2.2 Polimorfismos de longitud de la región variable

Minisatélites ó Número de Variaciones Repetidas en Tándem (VNTR's)

Los minisatélites como ya dijimos en el capítulo anterior son regiones del genoma no codificantes, en los que involucran de 10 a 100 unidades repetidas, cada una presenta, por lo general, entre 9 y 100 pares de bases con un arreglo total de 0.5 a 3 Kb. Existen miles de loci distribuidos a través del genoma de un amplio rango de eucariontes y muchos de ellos son hipervariables por lo que son apropiados para la identificación individual. La mayor limitación de los VNTR's es que ellos tienden a ser agrupados como telómeros y son por lo tanto de valor restringido en la construcción de un mapa genético completo. ⁽⁴³⁾

Sistema D1S80

La tipificación en este sistema es un ejemplo en la detección de secuencias repetitiva VNTR's o minisatélites que se localizan en el locus D1S80. Este locus (identificado por la sonda pMCT118) contiene como secuencia base un segmento de ADN constituido de 16 pb que se repiten de 14 a 41 veces. Cada alelo es determinado por el número de veces en que se repite la secuencia base (core), es decir, que el alelo 14 se define así porque la secuencia base se repite 14 veces, y así sucesivamente para los demás alelos. Como puede observarse esta región posee una alta variabilidad alélica, ya que se han encontrado hasta el momento 29 alelos que definen 435 genotipos. ⁽³⁹⁻⁴²⁾

Estudios realizados en familias revelan que el D1S80 se hereda de manera autosómica codominante. En general se dice que un buen marcador genético se transmite por este mecanismo. ⁽³⁹⁻⁴²⁾

Para poder observar los alelos presentes en las muestras biológicas y llevar a cabo la caracterización genética se aplica la técnica de electroforesis con geles de poliacrilamida (PAGE), esta técnica permite separar los alelos VNTR's dependiendo de su tamaño, así cada alelo mostrará un recorrido electroforético distinto. ⁽³⁹⁻⁴²⁾

Microsatélites ó Repeticiones cortas en tándem (STR`s)

En los 80`s una subclase de loci repetitivos fueron descritos con una unidad repetitiva (UR) de sólo 2, 3, 4, 5, 6 o 7 pares de bases -por eso se les llamaron microsatélites- Y no fue sino hasta 1989 que la naturaleza polimórfica de los microsatélites fue reconocida, permitiendo superar la mayoría de las limitaciones que ofrecían los sistemas VNTR en la genética forense. Miles de microsatélites ya han sido caracterizados y sean convertido en la herramienta clave de la investigación de enfermedades genéticas en el laboratorio clínico, de mapeo del genoma y en el campo de la identificación genética humana. ^(21, 42)

STR's EN IDENTIFICACIÓN FORENSE

4.1 Generalidades de los STR's

Todos los genomas eucarióticos contienen regiones de ADN repetitivo, llamado STR (Short Tandem Repeats) o microsátélites, las cuales consisten en repeticiones en tándem de un pequeño número de bases (2-7). El número de repeticiones de un *locus* STR puede ser altamente variable entre individuos, resultando polimorfismos de longitud que pueden ser detectados con un simple ensayo de PCR. La nomenclatura es informal y tales loci son diversamente llamados STR's (por sus siglas en inglés Short Tandem Repeats), o marcador de secuencia variable pequeña (VSSM's), simple secuencia repetida (SSR's), o repetición dinucleótida. ^(31, 40, 49, 49)

La unidad de repetición puede ser de 2 a 7 pares de bases y la repetición más común de los microsátélites es AC: AAAT: AG y AT, aún y cuando el más reconocido es la repetición del di nucleótido (dC-dA/dG-dT). Los microsátélites son extremadamente abundantes y numerosos STR's ya han sido caracterizados, con la finalidad de desarrollar mapas genéticos humanos.

Las repeticiones cortas en tándem se clasifican de acuerdo al número de bases que los componen, por ejemplo: en diméricas, tetraméricas, pentaméricas, etc., y se presentan en cada 300 a 500 Kb en el cromosoma por humano y aparecen intercaladas con esta frecuencia a lo largo del genoma humano (aproximadamente 400 millones de loci) es decir, con una frecuencia promedio estimada de 1 STR cada 6 Kb en la secuencia. Los microsátélites 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 altamente informativos para el análisis genético, por lo que ahora son los marcadores de elección para propósitos de identificación humana. ^(31, 40, 49, 49)

Aunque la variabilidad de los STR deriva fundamentalmente de la diversidad en el número de repeticiones en tándem, también su polimorfismo puede ser consecuencia de una microvariación de la secuencia de las unidades de repetición. ⁽³¹⁾

4.2 Clasificación de los de marcadores STR's

Las secuencias repetidas de los STR son nombradas por el tamaño de las unidades de repetición. Las repeticiones dinucleótidas tienen dos nucleótidos por unidad de repetición (UR). Los trinucleótidos tienen tres nucleótidos en la unidad de repetición, los tetranucleótidos tienen cuatro, los pentanucleótidos tienen cinco, y los hexanucleótidos tienen seis nucleótidos en la repetición base. Teóricamente, hay 4, 16, 64, 256, 1024, 4096 posibles secuencias de las unidades de repetición para mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, y hexanucleótidos, respectivamente. En todo caso, debido a que los microsátélites son repeticiones en tándem, algunas UR son actualmente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

equivalentes a otras. Se aplican dos reglas para identificar cuando una unidad de repetición "A" es equivalente a una unidad de repetición "B". Primero, la UR "A" es considerada equivalente a una UR "B" cuando "A" es inversamente complementaria a una secuencia "B", y segundo, cuando "A" es diferente de "B" o cuando la secuencia complementaria de "B" es producida por un cambio de nucleótidos. Por ejemplo, (GAAA)_n es equivalente a (AGAA)_n, o (AAGA)_n, o (AAAG)_n o (TTT)_n, (TTCT)_n, (TCTT)_n, o a (CTTT)_n. En otras palabras, las ocho secuencias son equivalentes. Note que (AGAG)_n es considerada una repetición dinucleotídica en lugar de unidad tetranucleotídica.

Debido a esta equivalencia, se considera que solamente hay 2, 4, 10, 33, 102 y 350 posibles secuencias de repetición para mono, di, tri, tetra, penta, y hexanucleótidos, respectivamente. ^(31, 41)

- Repeticiones mononucleotídicas (2):

A y C

- Repeticiones dinucleotídicas (4):

AC, AG, AT Y CG

- Repeticiones trinucleotídicas (10):

AAC, AAG, AAT, ACC, ACG, ACT, AGC, AGG, ATC y CCG.

- Repeticiones tetranucleotídicas (33):

AAAC, AAAG, AAAT, AACC, AACG, AACT, AAGC, AAGG, AAGT, AATC, AATG, AATT, ACAG, ACAT, ACCC, ACCG, ACCT, ACGC, ACGG, ACGT, ACTC, ACTG, AGAT, AGCC, AGCG, AGCT, AGGC, AGGG, ATCC, ATCG, ATGC, CCCC Y CCGG

Para las repeticiones pentanucleotídicas (102) y hexanucleotídicas (350) no es posible nombrar todas las secuencias de las unidades de repetición. Por razones que se considerarán más adelante, las repeticiones tetranucleotídicas son los marcadores más populares para la identificación humana.

Las secuencias STR no solamente varían en la longitud de las unidades de repetición y en el número de repeticiones, si no también en el rigor con el que ellos se conforman para un incremento en su repetición patrón. En base a esto los STR son divididos en diferentes categorías:

- Repeticiones simples. Contienen unidades de longitud y secuencia idéntica.
- Repeticiones compuestas. Compuestas de dos o más repeticiones simples adyacentes. Con variación en la secuencia de las unidades de repetición.
- Repeticiones complejas. Pueden contener diferentes repeticiones en bloques de unidades de longitud variable como también secuencias intermedias variables.
- Repeticiones hipervariables complejas. Difieren en el tamaño de pares de bases y secuencia, provocando una reproducibilidad genotípica.

Esta última categoría de marcadores STR no es comúnmente usada en la tipificación de ADN forense debido a dificultades con la nomenclatura de los alelos y a la variabilidad de resultados entre laboratorios. ^(31, 41)

No todos los alelos de un locus STR contienen unidades de repetición completas y se les nombra como microvariantes. Un ejemplo común de esta microvariación es el alelo 9.3 del locus TH01, el cual contiene nueve repeticiones tetranucleotídicas y una repetición incompleta de tres nucleótidos porque en la séptima repetición es extraviada una adenina de la unidad de secuencia base.

4.3 Nomenclatura común para alelos STR

Para asegurar una reproducibilidad entre laboratorios y la posibilidad de comparaciones de datos, fue desarrollada una nomenclatura común dentro de la comunidad forense. Con la creación de una base de datos donde contribuyen laboratorios de todo el mundo con información hace crucial el designar una nomenclatura aceptada internacionalmente para los alelos STR.

Reconociendo la necesidad de estandarizar la nomenclatura en repeticiones STR, un comité de científicos forenses, conocido como Comisión de ADN de la International Society of Forensic Haemogenetics (ISFH) fue asignado crear esta nomenclatura. La denominación de los alelos de los STR se debe realizar de acuerdo al número de unidades de repetición (UR) comparados con los láderes alélicos. En el caso de que un determinado alelo presente una UR incompleta será designado por el número de UR completas y el número de pares de bases de la UR incompleta, separando estos dos números por un punto. ^(31, 41, 49)

Otras recomendaciones de la ISFH con respecto a la nomenclatura de los alelos son las siguientes:

1. Los láderes de referencia deben de estar secuenciados y deben contener todos los alelos más comunes.
2. Para STR compuestos (con variación en la secuencia de la unidad de repetición) la designación de los alelos se realizará también de acuerdo al número total de UR que contiene el alelo.

3. Para STR complejos, la nomenclatura de las UR debe guardar una relación matemática con el tamaño en pares de bases del alelo consenso.
4. Para STR hipervariables los alelos deben ser identificados de acuerdo con su tamaño en pares de bases mediante comparación con ládres secuenciador.

4.4 STR tetraméricos autosómicos

Una de las cuestiones fundamentales que se debe tener en cuenta en el criterio de selección de marcadores STR analizados mediante PCR en el campo de la Genética Forense es la especificidad y fidelidad de la amplificación. El análisis de los productos de amplificación de marcadores STR permite detectar, además del alelo real, otros productos de amplificación minoritarios denominados bandas stutter (ruido) que se forman durante el proceso de amplificación como consecuencia del fenómeno de slippage de la ADN polimerasa. En el caso de STR diméricos este tipo de productos artefactuales de PCR es muy marcado, lo que hace muy difícil la designación de los alelos. Por el contrario, los STR tetraméricos no presentan este tipo de resultados de manera tan acentuada, y en la mayoría de los casos el artefacto de amplificación se limita a la aparición de una única banda minoritaria (menor al 10% del alelo real), que presenta una unidad de repetición menos que el fragmento mayoritario que representa el alelo real. Consecuentemente, los STR tetraméricos se han convertido en los marcadores genéticos de elección en el campo de la identificación genética humana, ya que sus productos de amplificación son altamente reproducibles y fácilmente interpretables. ^(31, 51)

4.5 Fundamento del uso de STR'S en identificación humana

La capacidad de identificación por medio de marcadores STR's se basa en la amplificación, análisis e interpretación de regiones (*loci*) altamente polimórficas o hipervariables de secuencias cortas repetidas en tándem, específicas en longitud y localización para cada persona. Además, de que son muy abundantes en todo el genoma, la variedad de alelos presentados por la población para cada STR aumenta el poder de discriminación entre individuos, potenciándolo con el hecho de estudiar varios *loci* STR's simultáneamente. ^(31, 41, 49, 55)

Para el propósito de identificación humana es importante tener marcadores de ADN que exhiban una alta variación o marcadores con un alto grado de polimorfismos, que pueden ser combinados para habilitar un elevado poder de discriminación entre muestras. ⁽³¹⁾

4.6 Localización de los STR en los cromosomas humanos

Los cromosomas humanos cuentan con infinidad de marcadores genéticos, en la tabla 4.1 se mencionan los marcadores usados con fines forenses siendo los de mayor proporción los loci STR. Sin embargo, únicamente de 13 a 18 STR's son utilizados de forma rutinaria, en la tipificación de material biológico (señalados en la tabla con caracteres más oscuros). Los STR's del cromosoma Y se utilizan en casos específicos como los detallaremos en el siguiente capítulo.

<i>Cromosoma</i>	<i>Marcador STR</i>	<i>Marcadores VNTR (RFLP)</i>	<i>Otros Marcadores (PCR)</i>
1	F13B, RENA4, D1S1171	D1S7, D1S339	D1S80
2	TPOX , APOB, D2S410, D2S436, D2S1242, D2S1338	D2S44	upo-B
3	.D3S1349, D3S1352, D3S1358 , D3S1359, D3S1744, ACPP		
4	FGA (FIBRA) , FABP, GABARBI5	D4S139	GC (PM), GYPA (PM)
5	CSF1PO , D5S373, D5S815, D5S818	D5S110	
6	F13A1, ACTBP2 (SE33), FOLP123, D6S366, D6S502, D6S965		DQa
7	D7S460, D7S809, D7S820 , D7S1517, D7S1520		D7S8 (PM)
8	LIPOL (LPL), D8S306, D8S320, D8S323, D8S344, D8S347, D8S639, D8S1179		
9	D9S52		
10	D10S89	D10S28	
11	TH01 (TC11) , APOA11, D11S554, UGB		HBGG (PM)
12	VWA , CD4, PLA2A1, D12S67, D12S391, D12S1090	D12S11	
13	D13S308, D13S317		
14	D14S306	D14S13	
15	FES/FP5, CYAR04 (P450), Penta E		
16	D16S539 , D16S537	D16S85	
17	D17S976	D17S79, D17S26	D17S5, YNZ22
18	MBP, D18S51 , D18S535, D18S849		
19	D19S253, D19S433		LDLR (PM)
20	D20S85, D20S470		
21	D21S11 , Penta D		
22			
X	HPRTB, ARA, STRX1, DXYS156		AMELOGENINA
Y	DYS19, DYS385, DYS389a, DYS389b, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DXYS156		AMELOGENINA A
mtADN			HVI ν HV2

Tabla 4.1 Localización cromosómica de marcadores útiles en la tipificación del ADN. (31, 72)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.7 Marcadores STR's en el cromosoma Y

En los últimos años la comunidad científica internacional ha dedicado tiempo y esfuerzo a la incorporación de polimorfismos en el cromosoma Y a la rutina forense. Los microsatélites del cromosoma Y han irrumpido con gran fuerza en el panorama de los marcadores genéticos de uso forense, debido a sus importantes aplicaciones en un tipo de pericias muy definido. Entre ellas destaca la determinación de la paternidad en aquellos casos en los que el progenitor está ausente y los hijos supuestos son varones, la identificación del agresor en delitos contra la libertad sexual, la identificación cadavérica y la determinación del sexo en grandes catástrofes, etc.

Si bien en un principio se creía que el cromosoma Y contenía muy escasas secuencias variables, se demostró que los STR's que posee son igualmente polimórficos que sus contrapartes ubicadas en cromosomas autosómicos. (6, 31)

4.8 Ventajas de la aplicación de los STR

Las ventajas de la tipificación del DNA con el sistema STR's en el área forense, que han hecho que su análisis sea realmente una revolución en identificación son las siguientes: (31, 41)

- Se pueden estudiar indicios biológicos de cantidad muy pequeña (trazas), de muestras muy degradadas, algunas de ellas de tejidos en estado de putrefacción o de mucho tiempo de antigüedad.
- Son de amplificación más sencilla debido a su menor tamaño alélico. Los problemas de amplificación que se presentaron en un primer momento ya están superados. Actualmente los STR que se usan en Genética Forense pertenecen fundamentalmente al grupo de las secuencias tetranucleotídicas polimórficas; tras experiencias iniciales con otros STR, en particular los de tipo dinucleotídico que plantean más problemas de amplificación y tipificación.
- El pequeño tamaño de los microsatélites hace que el fenómeno de pérdida alélica (allelic dropout) y amplificación preferencial, a causa de la degradación y de diferencias de longitud importantes entre los alelos, no se produzcan habitualmente.
- Al igual que ocurre con los minisatélites, los alelos pueden ser fácilmente clasificados en función del número de repeticiones que contienen y no de su peso molecular, facilitando enormemente la estimación de frecuencias. Además, tras la amplificación de los STR pueden ser separados utilizando electroforesis convencional sobre gels de poliacrilamida y la detección de variantes alélicas no precisa el uso de métodos isotópicos, bastando una sencilla tinción con plata.

- Por último, realizar una PCR múltiple, o amplificación simultánea de varios de estos loci microsatélito a partir de una muestra única, es mucho más sencillo. En el momento actual existen ya en el mercado sistemas para conseguir un perfil de STR en una única amplificación por PCR. El resultado es un patrón de 12 y hasta 16 STR polimórficos detectables simultáneamente, con lo que se alcanza un poder de discriminación enorme a partir de una única reacción.⁽³¹⁾
- La tecnología en cuanto a la amplificación, separación, detección y análisis de resultados, permite al laboratorio forense adaptarse en cuanto al costo, rapidez de análisis, así como a la carga de trabajo.
- Se han podido crear perfiles genéticos con un alto poder discriminatorio en una sola reacción debido a la condición de la amplificación simultánea de diversos loci STR.

4.9 Bases de datos poblacionales y poder de discriminación

Un requisito básico para poder aplicar los polimorfismos ADN, y en el caso que nos ocupa los polimorfismos STR, en el campo de la genética forense es realizar previamente un estudio en una muestra representativa de la población de referencia (grupo poblacional en el que se va aplicar el marcador) para determinar los siguientes aspectos:

1. Grado de variabilidad del marcador y frecuencias de las distintas variaciones (frecuencias alélicas) en la población de referencia. Cuanto mayor sea el número de alelos y más homogéneamente estén distribuidas las frecuencias alélicas de un *locus* STR, mayor será su poder de discriminación.
2. Proporción de genotipos en la población de referencia, es decir, si ésta es la que cabría esperar asumiendo un cruzamiento al azar entre los individuos (proporción o equilibrio Hardy-Weinberg).
3. Equilibrio de ligamento de los distintos *loci* STR en estudio. Por tanto, determinar si la frecuencia de un genotipo *multilocus* es igual al producto de las frecuencias de cada *locus*.
4. Homogeneidad de la población o, por el contrario, determinar si esta compuesta de subpoblaciones (subestructuración de la población) con distinta distribución de frecuencias alélicas.

En la actualidad existe un gran número de estudios sobre la distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos STR en diferentes poblaciones de todo el mundo. Todos estos estudios muestran el grado de polimorfismo de los marcadores STR y como consecuencia su alto poder de discriminación en el campo de la identificación humana.

9.10 Aplicaciones de los polimorfismos STR's en Genética Forense

Las dos grandes áreas de aplicación de los polimorfismos .ADN, y más concretamente de los polimorfismos STR, en el campo de la Genética Forense son la investigación de vestigios biológicos de interés criminal y la investigación biológica de la paternidad.

La identificación o exclusión de individuos acusados de cometer agresiones sexuales es, sin duda, una de las aplicaciones más importantes de la tecnología del ADN dentro de la investigación de vestigios biológicos de interés forense. En este tipo de casos lo que se hace es comparar el perfil genético a partir de una muestra de referencia (sangre, saliva, pelos, etc.) del presunto violador. La aplicación de los polimorfismos STR a la identificación genética de restos de semen es de especial conveniencia en los casos en los que el ADN espermático extraído de la evidencia (tomas de muestra vaginales, anales, ropas manchadas, etc.) se encuentre a una baja concentración y/o dicho ADN se encuentre degradado, ya que, por un lado, las técnicas de amplificación genética (PCR) utilizadas para el análisis de STR ofrecen una gran sensibilidad (permiten obtener resultados incluso a partir de picogramos de ADN templado) y, por otro lado, el pequeño tamaño de los alelos de los STR (100-300 pb) permite abordar el análisis de muestras que presenta un ADN en avanzado estado de degradación. No hay que olvidar, además, la posibilidad de aplicar los STR del cromosoma Y en casos límite en los que el recuento de espermatozoides obtenidos de la evidencia es muy bajo y se encuentran mezclados con un gran número de restos celulares de la víctima.

Por supuesto los polimorfismos STR pueden aplicarse también a la identificación o exclusión de individuos acusados de cometer otros delitos mediante la comparación del perfil genético obtenido de la evidencia con el perfil genético obtenido a partir de una muestra biológica del sospechoso (en caso de que éste haya dejado algún resto biológico en la escena del delito) o de la víctima (en el supuesto de que, por ejemplo, el resto biológico se encuentre en el arma homicida que obra en poder del sospechoso).

Por otro lado, la introducción de este tipo de polimorfismos genéticos ha posibilitado la investigación biológica de la paternidad, incluso en el supuesto en que el padre haya fallecido, mediante el análisis genético de sus restos óseos o el análisis de muestras biológicas, como biopsias realizadas en centros hospitalarios u otro tipo de restos celulares del fallecido que pudieran recuperarse del entorno familiar (restos de saliva en sobres de carta manuscritas, restos celulares en peines, máquinas de afeitar, etc.). Además, gracias a la introducción de este tipo de polimorfismos genéticos la investigación biológica de la paternidad se ha convertido en un poderoso método para la identificación genética de restos cadavéricos. Es necesario mencionar aquí algunos casos de identificación de estos restos mediante el análisis de polimorfismos STR que han tenido una especial trascendencia, tales como la identificación de la familia Romanov, o la identificación de los restos cadavéricos de Joseph Mengele.

Por último, conviene apuntar que los STR son también los marcadores genéticos de elección para la creación de bases de datos nacionales de perfiles del ADN con fines de investigación criminal. El desarrollo de dichas bases de datos es ya una realidad en países europeos como el Estados Unidos, Reino Unido y Holanda. En el caso del Reino Unido, la base de datos, que es elaborada y custodiada por el Forensic Science Service (FSS), tiene el objeto de almacenar perfiles del ADN a partir de muestras de saliva de individuos procesados o simplemente sospechosos de un criminal. Su propósito es almacenar 135.000 perfiles de ADN al año.

STR's EN EL CROMOSOMA Y

5.1 Estructura y características del cromosoma Y

El cromosoma Y es un elemento acrocéntrico pequeño que solo representa al 2% del complemento cromosómico. Contiene alrededor de 6.107 pb. El 60 % de este ADN está constituido por secuencias polimórficas, altamente repetidas, y está confinado principalmente a la porción heterocromática del brazo largo, desde Yq13 a Yqter, y a la región pericentromérica, sugiriendo que estas regiones tendrían una funcionalidad limitada.

Sin embargo, recientes investigaciones demuestran la existencia de genes y familias génicas localizadas en las regiones supuestamente no codificantes presentes en este cromosoma.

Debido a la falta de un elemento homólogo (lo que determina una haploidía parcial), la mayor parte del cromosoma Y no se recombina durante la meiosis. Sólo se produce recombinación con el cromosoma X en dos pequeñas regiones pseudoautosómicas denominadas PAR1 y PAR2. La falta de recombinación determina que todas las secuencias ubicadas en esta zona se heredan como un bloque, constituyendo un grupo de ligamento.

Por otro lado, dado que en este grupo de ligamento se localizan secuencias polimórficas, estas serán cedidas de padres a hijos de forma obligada. Las mutaciones constituyen las únicas fuentes posibles de variación que pueden producirse en estas regiones.

5.2 Marcadores STR en el cromosoma Y

Hasta el presente se han descrito 23 microsátélites, evaluables mediante PCR. Sin embargo, algunas de estas regiones fueron descartadas para su uso en identificación por su escasa variabilidad o por dificultades técnicas para su análisis.

Se han seleccionado 9 microsátélites descritos en la tabla 5.1, que son aplicados regularmente en casos de paternidad discutida, así como en otras investigaciones del campo forense.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Nombre del Marcador o Sistema	Localización	Unidad de Repetición	Rango Alélico	Rango en Pares de Bases	Nº Alelos
DYS19	pY	TAGA	10-19	174-210	10
DYS385	qY	GAAA	1-13	353-405	13
DYS389 I	qY	(TCTG)(TCTA)	7-13	239-263	7
DYS389 II	qY	(TCTG)(TCTA)	23-31	353-385	9
DYS390	qY	(TCTA)(TCTG)	5-14	195-227	10
DYS391	qY	TCTA	8-13	275-291	6
DYS392	qY	TAT	7-16	236-263	8
DYS393	qY	AGAT	11-15	116-132	5
YCAII	qY	CA	1-7	147-165	7

Tabla 5.1 Características de los 9 microsátelites del cromosoma Y empleados actualmente.

Debido a que todos los STR del cromosoma Y constituyen un grupo de ligamento, no pueden emplearse las frecuencias poblacionales de cada sistema por separado para estimar el porcentaje de paternidad o de coincidencia evidencia-sospechoso. Por ello, previamente a su utilización, se llevaron a cabo estudios poblacionales, determinando la frecuencia de cada haplotipo. (6, 31, 41, 58)

5.3 Uso de los STR's del cromosoma Y en la identificación forense

Los estudios iniciales fueron enfocados hacia la región denominada "Y27H39" (conocida actualmente como **DYS19**), que demostraron su utilidad tanto en estudios antropológicos como en análisis de casos de paternidad en ausencia de progenitor masculino.

Si bien la aplicabilidad resultaba limitada por no disponer de marcadores adicionales, tal restricción pudo ser posteriormente superada. La detección y validación de un gran número de secuencias polimórficas presentes en el cromosoma Y, hizo posible la realización de estudios poblacionales más completos y su aplicación inmediata tanto en estudios de filiación deficientes como en casos forenses.

En respuesta a la exigencia judicial tendente a la identificación de restos emergentes de una explosión causada por el atentado terrorista contra una asociación judía argentina acaecida en 1994, fue indispensable el desarrollo de marcadores genéticos polimórficos localizados en cromosomas sexuales humanos.

Tal estrategia de análisis haría posible la determinación del sexo de los pequeños fragmentos humanos analizados y la caracterización parcial de los mismos. En tal sentido se seleccionaron los microsátelites HUMHPRTB, localizado en el cromosoma X, y el denominado **DYS19**, localizado en el cromosoma Y, que fueron combinados con secuencias monomórficas de este último en una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

El análisis de los productos de amplificación de los marcadores combinados permitían alcanzar el objetivo planteado en una única reacción. La aparición de productos de amplificación del **DYS19**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y la observación de una sola banda en el HUMHPRTB (hemicigosis) confirman el origen masculino de la muestra; por el contrario, la ausencia de amplificación del primero y dos bandas en el segundo corresponden indudablemente a una mujer. ^(6, 31, 41)

A los efectos de confirmar el sexo del individuo, se analiza simultáneamente con los anteriores una secuencia específica del cromosoma Y, altamente repetida y, por lo tanto, sensible, útil principalmente en los casos de mujeres homocigotas para HUMHPRTB.

Además de los sistemas anteriormente mencionados, es posible caracterizar un conjunto de marcadores polimórficos del cromosoma Y; la información obtenida constituye un haplotipo que deberá ser comparado con bancos haplotípicos poblacionales. Al incrementar el número de marcadores polimórficos usados, el haplotipo será más discriminativo y, por lo tanto, su potencial informativo será mayor.

Si se dispone de bases de datos resulta posible estimar la frecuencia de aparición de cada combinación y ese valor podrá ser considerado junto con los emergentes del análisis de los marcadores autosómicos a los efectos de determinar la probabilidad de incriminación o el índice de paternidad.

Del mismo modo, emplean el DYS19 en el análisis de evidencias de violaciones y lo recomiendan en casos de asalto sexual con muy reducida presencia de espermatozoides, donde la lisis diferencial no debería ser muy estricta para evitar la pérdida de ADN masculino; en muchas muy antiguas donde las células espermáticas están degradadas y por lo tanto no es exitosa la separación y en evidencias que contienen mezclas de sangre de personas de diferente sexo. ⁽³¹⁾

Casos de paternidad en ausencia del padre

En ausencia del progenitor masculino, si se cuenta con otro familiar masculino de la línea paterna, su cromosoma Y será idéntico al del padre no disponible y su supuesto hijo. Se estudió un caso correspondiente a una pareja de desaparecidos, en el cual se observó identidad entre un tío paterno y su sobrino allegado. ⁽³¹⁾

Un análisis detallado del cromosoma Y podría hacer innecesarias las exhumaciones para determinar paternidad de un fallecido sobre un hijo varón, si se cuenta con hermanos reconocidos, tíos o abucos paternos del supuesto hijo. ⁽³¹⁾

La limitación de estos análisis es que no distinguen entre supuestos padres pertenecientes a la misma línea paterna. En esos casos, el estudio debe complementarse con marcadores autosómicos. ^(31, 41)

Análisis de muestras forenses provenientes de delitos sexuales

En el análisis de muestras provenientes de violaciones y otros delitos sexuales es posible evitar la interferencia del material biológico femenino (víctima). En el estudio de hisopos y ropa interior, se efectúa como primer ensayo a los efectos de establecer presencia o ausencia de ADN masculino, como alternativa al sistema combinado descrito previamente.

Si el resultado es positivo, se obtiene el haplotipo del ADN masculino aislado de la evidencia, y se compara con él o los sospechosos. Si no es idéntico, la exclusión es categórica: en cambio, si hay coincidencia los resultados deben interpretarse con cautela, por cuantos hermanos varones, padre o tíos del agresor presentarán igual haplotipo. ⁽³¹⁾

Desde luego, la confirmación de la inclusión puede realizarse mediante marcadores autosómicos.

En los casos en que la víctima es un hombre, los resultados obtenidos son claros a pesar de la mezcla, y el patrón genético del violador puede interferirse restando el correspondiente a la víctima.

Resulta evidente la capacidad discriminativa de estos marcadores, pero presentan una limitación: todos los individuos de la misma línea paterna compartirán idéntica información en estos haplotipos, por lo cual no será posible desvincular individuos relacionados por vía paterna de la existencia de vínculo de parentesco o filiación, ni tampoco descartar al hermano de un sospechoso si sólo se analizan marcadores presentes en este cromosoma.

Puede por lo tanto concluirse que estos marcadores son de enorme utilidad en la investigación de la identidad pero deberán ser, en todos los casos, evaluados juntamente con marcadores autosómicos. ^(31,41)

TIPIFICACION FORENSE DE LOS STR

Estos son los diferentes pasos de los que consta un análisis completo de ADN:

1. Extracción del ADN.
2. Cuantificación del ADN extraído.
3. Estudio de las regiones hipervariables por:
 - Amplificación por PCR.
 - Secuenciación de los STR's y por último
4. Análisis automatizado de los STR's ^(6, 31)



6.1 Extracción del ADN

Una muestra biológica obtenida de una escena del crimen en forma de mancha, ya sea, de sangre o de semen, de sangre líquida de un sospechoso o un problema de paternidad contiene un sin número de sustancias además del ADN. Una molécula de ADN puede ser separada de otros materiales celulares y posteriormente ser examinado. Las proteínas celulares que empaquetan y protegen al ADN en el medio ambiente de la célula pueden inhibir la habilidad para analizar el ADN. Por esto, los métodos de extracción son desarrollados con la capacidad para separar proteínas y otros materiales celulares de las moléculas de ADN. En resumen, la cantidad y calidad del ADN frecuentemente necesita de ser cuantificada prioritariamente a la aplicación de procedimientos analíticos para optimizar resultados. ^(41, 44)

Existen diversos procedimientos de extracción, que deben cumplir con la misión de extraer y purificar el ADN. Entre las que se encuentran: La extracción orgánica, extracción con Chelex, y con papel FTA. La extracción exacta o aislamiento del ADN varía dependiendo del tipo de evidencia biológica o condición de la misma al ser examinada. ⁽³¹⁾

1. La extracción orgánica, algunas veces referida como extracción fenol-cloroformo, fue usada por un largo periodo de tiempo y sigue siendo utilizada en situaciones en donde se requiera tipificación por RFLP o PCR. El ADN de alto peso molecular es esencial para métodos FRLP, y puede ser obtenido más eficientemente por este tipo de extracción. ^(31, 37)
2. El método Chelex de extracción para ADN es más rápido que la extracción orgánica. La extracción Chelex involucra pocos pasos y nulas oportunidades de contaminación de muestra a muestra. Sin embargo, este proceso involucra la obtención de ADN de una sola cadena y por esto es solamente una herramienta para procedimientos de amplificación por PCR-base. ^(41, 48)

Papel FTA™

Un procedimiento relativamente nuevo de extracción de ADN involucra el uso de papel FTA™. Este es un papel absorbente a base de celulosa que contiene cuatro sustancias químicas para proteger las moléculas de ADN de la degradación de las nucleasas y preservar el papel de contaminación bacteriana. Como resultado el ADN en el papel FTA™ es estable a temperatura ambiente durante un periodo de muchos años.

El uso del papel FTA™ simplemente involucra la adición de una gota de sangre en el papel y el posterior secado de la mancha. Las células son lisadas al contacto con el papel y el ADN de los leucocitos queda inmovilizado en la matriz del papel. Una pequeña parte del papel con muestra de sangre seca es removido y colocado en un tubo para su lavado. El ADN contenido puede ser purificado con lavados con disolventes que remuevan el grupo hemo y otros inhibidores de la reacción de PCR. La purificación es visualizada durante los lavados porque el color rojo del papel es removido en el sobrenadante. El pequeño pedazo de papel purificado es adicionado a la reacción de PCR directamente.

En situaciones donde se necesitan múltiples ensayos de la misma muestra, el papel purificado puede ser reusado para amplificación y tipificación secuencial del ADN. ⁽⁴¹⁾

Extracción diferencial

La aplicación de las técnicas de estudio de polimorfismos ADN ha superado muchos de los problemas que se planteaban con el uso de marcadores convencionales, pero también se enfrentaba a sus propias limitantes.

Una de sus mayores ventajas es que ofrece la posibilidad de resolver las mezclas de semen con otros fluidos biológicos procedentes de la víctima (fluidos vaginales, sangre o saliva), gracias a un método de extracción conocido como "lisis diferencial", que se basa en la resistencia de los espermatozoides a la lisis con detergente y proteinasa K en ausencia de un agente reductor. En un primer paso, la muestra se incuba en una disolución con SDS y proteinasa K, y produce la rotura de las células epiteliales, pero no de los espermatozoides, que pueden recuperarse por centrifugación. En el sobrenadante de esta primera digestión queda el ADN procedente de la víctima. El precipitado que contiene los espermatozoides íntegros, tras varios lavados se incuba de nuevo en una solución con SDS y proteinasa K, añadiendo esta vez el agente reductor ditioneitol (DTT). Tras la digestión, esta segunda fracción contiene el ADN de los espermatozoides.

Aunque la extracción diferencial resuelve las mezclas de semen con otros fluidos, no es de utilidad cuando el esperma procede de un individuo azoospermico o vasectomizado. ^(51,52)

Todas las muestras deben ser cuidadosamente manipuladas independientemente del método de extracción de ADN para evitar la contaminación entre muestras. El proceso de extracción es probablemente donde la muestra es más susceptible a la contaminación en el laboratorio que en otras etapas del proceso de tipificación del material genético. Con la extracción se debe conseguir aislar y purificar el ADN, dejándolo disponible para los posteriores análisis identificativos. Si no

se hace correctamente se puede alear sustancias contaminantes (químicos o biológicos) que luego pueden impedir la acción de enzimas diversas (restricción o polimerasas) imposibilitando completamente los estudios. ^(31, 41, 70)

El ADN extraído es conservado a -20°C, o entre -80°C por un largo periodo de tiempo, para prevenir la actividad de las nucleasas. Las nucleasas son enzimas que degradan el ADN. Estas enzimas necesitan magnesio para trabajar apropiadamente por lo que otra de las medidas para prevenir la digestión del ADN en la sangre es el uso de tubos colectores de tapón lila que contienen un conservador sanguíneo conocido como EDTA. El EDTA quela, o enmascara, todo el magnesio libre y esto previene la destrucción del ADN por las nucleasas en las muestras de sangre. ^(31, 41, 70)

6.2 Técnicas de cuantificación

Una vez que se ha logrado extraer el ADN, en mayor o menor cantidad y más o menos purificado, antes de proceder analizarlo, es necesario saber que cantidad de ADN se tiene y, cual es la calidad del mismo. La determinación de la cantidad de ADN en una muestra es esencial para la técnica de PCR porque es estrecho el rango de concentración para trabajar mejor. Por ejemplo, en los kits de las marcas comerciales ABI Profiler Plus y Cofiler multiplex STR especifican la adición de 1 – 2.5 ng de ADN templado para óptimos resultados. Los kits de Promega STR trabajan bien en un rango de concentración similar de ADN. Con mayor cantidad de material genético pueden resultar picos que salen fuera de la escala de la técnica de medición. Por el contrario una pequeña cantidad de ADN puede resultar en alelos “dropout” porque en la reacción de PCR la amplificación del ADN no se lleva apropiadamente. Este fenómeno es algunas veces referido como fluctuación estocástica. ⁽³¹⁾

Anteriormente los métodos de cuantificación involucraban típicamente la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm o determinación de fluorescencia después de tñir el gel con bromuro de etidio. Desafortunadamente estos métodos no son muy sensibles, y consumen invaluableles especímenes forenses que son irremplazables. Por lo que considerando estos problemas han sido desarrollados métodos cuantificación que disminuyen estas situaciones. Esto incluye el procedimiento spot-blot. ^(24, 31)

Cuantificación slot blot

Probablemente el método más popular en los laboratorios forenses actualmente para la cuantificación es el llamado procedimiento “slot blot”, que posee dos grandes ventajas:

1. Por un lado permite detectar cantidades muy pequeñas de ADN, como 100 picogramos.
2. Paralelamente, si se emplean sondas complementarias específicas del genoma humano, el resultado positivo de la amplificación nos indica que el ADN es humano, y no de otros animales domésticos habituales como perros, gatos, aves.

Este método involucra la captura de ADN en membrana de nylon siguiendo de una adición de sonda humano-específica. Después por quimioluminiscencia o colorimetría es observada una intensa señal que es comparada con un estándar. La cuantificación por spot blot es una medida relativa que compara una muestra desconocida y un estándar que es preparado usualmente por diluciones en serie de una muestra de ADN de concentración conocida.

Cuando se cuenta con cantidades de ADN mayores, se puede emplear cuantificaciones con geles de agarosa teñidos con sustancias como bromuro de etidio, que paralelamente a la cuantificación ofrecen información sobre la calidad del ADN. ^(2, 31, 36, 37)

Cantidad de ADN usada en tipificación de los STR por fluorescencia

La amplificación por PCR es dependiente de la cantidad de moléculas de ADN templado adicionado a la reacción. Con base en la cuantificación del ADN que resulte usando algún procedimiento como slot blot u otro, la extracción de ADN de cada muestra es ajustada a un nivel que trabaje óptimamente en la amplificación por la reacción de PCR. Comercialmente los kits de tipificación para STR trabajan mejor con 1 ng de ADN templado. ⁽⁷⁰⁾

La cantidad de 1 ng de ADN genómico humano corresponde a aproximadamente 333 copias de cada locus que van a ser amplificados. Hay aproximadamente 6 pg de ADN genómico en cada célula que contiene una sola copia diploide del genoma humano. Por lo que, un rango de 0.1 ng a 25 ng de ADN va a involucrar aproximadamente de 30 a 8330 copias de toda la secuencia de ADN. ⁽³¹⁾

Cuando el ADN ha sido extraído de los especímenes problema, y posterior a su cuantificación y determinación de la calidad con la que cuenta se procede a realizar la amplificación de los sistemas polimórficos que servirán para crear un perfil genético de la muestra analizada.

6.3 Amplificación de loci STR's

La tipificación de los microsatélites o loci STR comienza con la amplificación de dichos loci. La reacción en cadena de la polimerasa es la técnica apropiada para este caso ya que tiene la capacidad para amplificar dos o más loci STR simultáneamente en una sola reacción, llamándose a este procedimiento como PCR múltiplex. ⁽³⁹⁾

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en la acción de una enzima, la ADN polimerasa, la cual es capaz de sintetizar una nueva hebra formada por nucleótidos complementarios, tomando como modelo un fragmento específico de las hebras del ADN. La estrategia consiste en amplificar una secuencia de ADN, en presencia de dos oligonucleótidos llamados primer o iniciadores, que flanquean la región que se va a amplificar, los cuales se unen al extremo 3' de cada una de las cadenas de ADN. Esta amplificación se produce mediante varios ciclos de temperatura donde cada uno consta de 3 etapas: ^(43, 44)

- I. **Desnaturalización.**- La doble hélice de ADN se calienta a 94°C, lo que permite romper los puentes de hidrógeno existentes entre las bases de las dos hebras.
- II. **Unión a primers.**- La temperatura se disminuye hasta aproximadamente 50°C en presencia de los primers. Entonces, éstos se unen específicamente en los extremos de la región a amplificar, cada uno en la hebra que le corresponde.
- III. **Elongación.**- La temperatura se eleva a 72°C, la ADN polimerasa alarga las nuevas hebras de DNA a partir de los primers, uniendo nucleótidos trifosfato o dNTPs (dATP, dGTP, dTTP y dCTP).

Estas operaciones constituyen un ciclo de amplificación y resultan dos nuevas copias del fragmento de ADN. En el ciclo de amplificación siguiente, que pasa por las mismas tres etapas, estas nuevas hebras servirán a su vez, de matrices para la ADN polimerasa. De este modo se obtienen 2ⁿ fragmentos después de n ciclos. El aumento de moléculas de ADN es exponencial. ^(35, 47, 48)

El uso de la enzima termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, denominada Taq polimerasa para la "extensión", permitió la automatización del proceso mediante el empleo de cicladores térmicos electrónicos. ^(6, 41, 46-48, 70)

PCR-Múltiple

PCR-Múltiple se define como la amplificación simultánea de regiones específicas de diversos loci genéticos en un termociclador por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para este tipo de amplificación como para la respectiva tipificación de los sistemas múltiples de STR^s existen actualmente Kits comerciales con los reactivos necesarios para dicho procedimiento.

Algunos nombres de los kits son: ^(31, 41, 70)

- GenePrint, que amplifica simultáneamente un sistema de tres loci STR tetraméricos.
- QFailer, para 7 marcadores STR
- ProFailer, para 11 marcadores STR
- Power plex para 18 marcadores STR

Preveniones en el proceso de amplificación

La reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica muy sensible por lo que se sugiere considerar durante toda la manipulación medidas de prevención para evitar la contaminación de otros productos de PCR o de otras muestras ajenas de ADN (contaminación cruzada).

- a) El uso de guantes y su cambio frecuente.
- b) Se debe de realizar el cambio de puntas en las pipetas automáticas o usar una pipeta específica por muestra.
- c) Preservar en áreas separadas los reactivos de pre y post amplificación.
- d) Realizar en una sola área la reacción de amplificación
- e) Usar equipo y materiales exclusivos para la reacción de amplificación
- f) La reacción se debe llevar de preferencia en campanas de flujo laminar.
- g) Los reactivos deben ser cuidadosamente preparados para evitar la presencia de ADN o nucleasas contaminantes.
- h) El laboratorio debe contar con irradiación ultravioleta cuando el área no este en uso, y limpiar los espacios de trabajo e instrumentos con isopropanol y/o blanqueador al 10 % para asegurar que las moléculas extrañas de ADN son destruidas antes de la extracción del ADN o de su amplificación. ^(41, 70)

Ventajas y desventajas de la PCR con especímenes forenses

Las ventajas de la amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa para la evidencia biológica son las siguientes:

- La cantidad de ADN que puede ser usada puede ser de hasta una sola célula.
- El ADN degradado en fragmentos de solamente unas pocas pares de bases de largo pueden ser perfectamente amplificados.
- Un gran número de copias de varias secuencias específicas de ADN pueden ser amplificadas simultáneamente por PCR múltiplex.
- El ADN contaminante procedente de hongos o bacterias, no es amplificado por que los primers usados son humano-específicos.
- Los kits comerciales están disponibles para facilitar la reacción de amplificación por PCR en un solo paso.

Existen tres potenciales situaciones que pueden ser consideradas como desventajas de la PCR:

- La región flanqueada de ADN templado puede no ser amplificada debido a la presencia de inhibidores de la PCR en el extracto de ADN.
- La amplificación puede no llevarse a cabo si el primer no se une al ADN (alelos inválidos), y
- La contaminación de otro ADN humano también de evidencia forense que se este trabajando al parejo o de muestras amplificadas previamente debido al descuido técnico en el laboratorio e invalidación de los protocolos. ^(41, 70)

SISTEMAS DE ANÁLISIS LOS STR's

7.1 Electroforesis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la cual los alelos de los STR's son amplificados produciendo una mezcla de moléculas de ADN. La PCR multiplex puede producir 20 o más fragmentos de ADN que pueden determinarse de una u otra forma. En concreto, la resolución de una sola base es requerida para distinguir entre alelos de área muy limitada. (por ejemplo, del locus TH01 los alelos 9.3 y 10). El rango de longitud de una separación típica donde la resolución es de una sola base es necesario estar entre 100 y 400 pb. Adicionalmente, es importante que el método de separación sea reproducible y con rendimientos que puedan ser comparados con otros laboratorios. ⁽⁴¹⁾

Para distinguir varias moléculas entre una y otra, primeramente se lleva a cabo una separación para extraer los diferentes tamaños de los fragmentos de amplificación. La separación es comúnmente realizada por un proceso conocido como electroforesis sobre un soporte de gel o dentro de un capilar.

Este proceso de electroforesis se refiere a la carga eléctrica conducida por las moléculas. En el caso del ADN, los grupos fosfato del esqueleto de la molécula de ADN tiene carga negativa. Sobre la influencia de una corriente eléctrica, las moléculas de ADN van a migrar del electrodo negativo, conocido como el cátodo, hacia el electrodo positivo, conocido como ánodo. El movimiento de los iones en el campo eléctrico genera calentamiento. Este calentamiento puede ser disipado o absorbido por el sistema. El excesivo calor puede generar bandas no deseables o en severos casos el gel puede literalmente fundirse. La electroforesis capilar tiene la ventaja de que el calor puede disiparse más fácilmente a través del capilar, el cual tiene una gran área en relación al volumen. ^(41, 33)

7.2 Electroforesis en soporte de gel

Los soportes de gel consisten en una matriz solidificada porosa por medio de la cual las moléculas de ADN pasan durante la electroforesis. Los posillos donde se coloca la muestra en el gel se crean al incrustar los dientes de una estructura en forma de peine en la matriz del gel. Después de que el gel a solidificado es removido el peine dejando lugar para colocar las muestras de ADN. En la figura 7.1 se ve representado el sistema básico para una electroforesis en gel

Son dos los tipos de geles que son comúnmente usados en biología molecular y en laboratorios de genética forense con la finalidad de separar los el ADN. Los geles de agarosa tienen poros de diámetro mayor y son usados para separar moléculas de ADN grandes y los geles

de poliacrilamida que son usados para obtener una alta resolución en la separación en moléculas de ADN pequeñas, usualmente entre 500 o 1000 pb.

Los métodos de tipificación forense usan los dos tipos de gels. El método de restricción de fragmentos de longitud polimorfa usa gels de agarosa para separar los fragmentos de ADN de un rango de longitud de 600 pb a 23 000 pb. Las moléculas de ADN de bajo peso molecular no son bien separadas con los gels de agarosa. Por otro lado, los alelos STR resultantes de la amplificación por PCR tienen un tamaño de 100 pb a 400 pb, por lo que son mejor separados por gels de poliacrilamida. En el caso de algunos STR que tienen microvariantes, la capacidad de alta resolución de los gels de poliacrilamida es esencial para separar moléculas que pueden solamente diferenciarse por un solo nucleótido. ^(31, 41, 49)

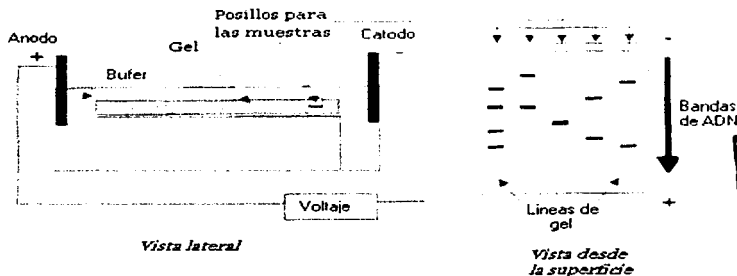


Figura 7.1 Esquema de un sistema electroforético de gel

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Gels de agarosa

La agarosa es básicamente una forma de alga marina y que contiene poros con un diámetro alrededor de 2000 Å (2000 nm). Los gels de agarosa son fácilmente preparados al pesar cierta cantidad de polvo de agarosa y mezclarlo con el buffer de electroforesis. El polvo de agarosa puede ser fácilmente incorporado al buffer al calentarlo un poco. Después la solución se enfría y se distribuye en una estructura donde termina de tomar forma y consistencia. Posteriormente se colocan los pines para formar los posillos.

El peine es retirado cuando el gel se ha solidificado por completo, quedando el lugar para colocar de 5-10 µL de muestra o más dependiendo de las condiciones de trabajo. El número de dientes en el peine condiciona el número de muestras que pueden correrse simultáneamente en el gel. Típicamente entre 8 y 24 muestras son corridas al mismo tiempo en un gel de agarosa. El estándar de peso molecular se corre paralelamente para estimar el tamaño de cada muestra de

ADN. Después el gel es sumergido en el buffer electroforético. Son dos buffers los comúnmente usados en el proceso de electroforesis, Tris-EDTA (TAE) y Tris-borato-EDTA (TBE). Las muestras antes de tomar su lugar en el gel son mezcladas con un marcador y el colorante azul de bromofenol, lo que permite observar el corrimiento de la muestra en el gel, además de que incrementa la viscosidad de la muestra y ayuda a que se quede en el gel. Posteriormente da inicio el proceso de electroforesis.

Cuando el gel es colocado en su lugar en el sistema electroforético se conectan los electrodos. El ánodo (electrodo positivo) es colocado del lado contrario donde se coloca la muestra. Comúnmente se necesitan de 100-600 volts para que las moléculas de ADN crucen de 10-40 cm de largo, avanzando de 1-10 V/cm. ^(31, 41)

En el gel las moléculas de ADN son separadas por tamaño, las pequeñas se mueven más rápidamente y fácilmente a través de los poros del gel. Cuando la separación es concluida, el gel es fotografiado o escaneado para fijar los resultados para examinación y comparación subsiguiente.

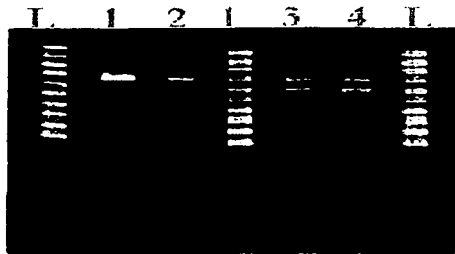
Se ha demostrado que un pequeño gel de agarosa de 10 cm de longitud por 1mm de grosor podría tener un poder de resolución suficiente para separar repeticiones tetranucleotídicas. Incluso en los dinucleotídicos en tándem se puede utilizar agarosa MetaPhor y visualizarlos tífendolos con SYBR Green. ^(41, 73)

Geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida (PA) tienen el diámetro del poro más pequeño (100-200 Å) que los geles de agarosa (1500-2000 Å). La proporción del tamaño del poro del gel es un factor importante para determinar la capacidad del soporte de gel para separar fragmentos de tamaño similar de ADN. El gel de poliacrilamida se prepara por la polimerización de acrilamida y acrilamida bis. El proceso de polimerización se inicia por la generación de radicales libres provenientes del persulfato de amonio y estabilizado por el componente TEMED (N, N, N, N – tetrametiltiendianina). ⁽⁴¹⁾

Las propiedades físicas y tamaño del poro del gel son controlados por la cantidad de acrilamida y su grado de unión. El tamaño del poro puede ser disminuido por el incremento de la concentración de acrilamida. La evaluación del total de la concentración de acrilamida en la solución del gel es comúnmente expresada en porcentaje T. Los poros muy pequeños se forman con un 5 % en peso de acrilamida. Una solución de gel para la separación de alelos STR es de 5% T u otra manera de expresar es 5% acrilamida:bis (19:1). La detección de bandas, como se observa en la figura 7.2, en geles de poliacrilamida puede ser por el uso de marcadores fluorescentes o tinción con nitrato de plata.

La desventaja del uso de la acrilamida es que es neurotóxico y se sospecha carcinógeno, por lo que hay que evitar su inhalación y el contacto con la piel, con la utilización de guantes y lentes de seguridad. ⁽⁴¹⁾



7.3 Electroforesis capilar (EC)

La electroforesis capilar (EC) es una tecnología que surge con un potencial para incrementar la rapidez en la tipificación del ADN por el hecho de haber sido automatizada. Aunque la electroforesis en soporte de gel sigue siendo aún ampliamente usada.

La electroforesis capilar es el nombre que recibe el transporte de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico a través de un capilar que tiene como soporte un polímero. Es una técnica de separación, en la que las partículas cargadas son separadas por sus diferentes velocidades de migración cuando le 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 con un arreglo de 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; gradientes de voltaje; interacción con el soporte. ^(41, 53, 60)

Ventajas de EC sobre los gels.

En primera, los pasos de inyección, separación y detección pueden ser totalmente automatizados, permitiendo el corrimiento de múltiples muestras simultáneamente. En general, solo en cuestión de minutos la muestra es consumida en el proceso de inyección y puede ser fácilmente reexaminada si se necesita. Esta es una importante ventaja ya que los especímenes forenses no pueden volver a ser fácilmente obtenidos.

La separación en capilares puede ser realizada en cuestión de minutos. Otra ventaja es que la información cuantitativa es leída eficazmente en forma electrónica después de completarse una corrida. Los pasos extra como son el fotografiar o escanear el gel no son requeridos. ^(41, 60)

Desventajas de la EC

La mayor desventaja de los instrumentos de electroforesis capilar es que las muestras son analizadas secuencialmente de una por una. El equipo de electroforesis con un único capilar no esta capacitado para procesar un alto número de muestras a la vez, sin embargo ya se han desarrollado sistemas electroforéticos con capilares en serie para correr múltiples muestras simultáneamente.

Otra desventaja es que el equipo de electroforesis requiere mayor presupuesto (mas de 50,000 dólares) en comparación de el sistema de electroforético en soporte de gel. ^(41, 60)

Componentes de la EC

El elemento principal de un equipo de EC es un capilar de vidrio de 50 -100 μm de diámetro interno y de 25-75 cm de longitud, dos viales con buffer y dos electrodos conectados a la corriente eléctrica. El sistema también va a contener un láser como fuente de excitación de moléculas, un detector de fluorescencia, un automuestreador y una computadora para control de inyección y detección de muestras, como se ilustra en la figura 7.3.

Los mismos búferes que son utilizados en la electroforesis en gel pueden ser usados para la electroforesis capilar. Sin embargo, en lugar de una matriz de gel por medio de la cual pasen las moléculas de ADN, basta una solución polimérica viscosa como tamiz.

Prioritario a la inyección de cada muestra, un gel nuevo es vaciado para llenar el capilar con una alícuota fresca de solución polimérica. Una importante diferencia entre la electroforesis capilar y la de gel es que la corriente eléctrica esta en el orden de 10-100 veces mas fuerte en la EC (300 V/cm en lugar de 10 V/cm), lo cual resulta en un menor tiempo de corrimiento para electroforesis capilar.

La detección de la muestra es ejecutada automáticamente por el instrumento de electroforesis capilar por la medición del tiempo desde la inyección de la muestra a la detección de la muestra con el láser colocado cerca del final del capilar. La luz del láser esta radiándose dentro del capilar en una posición fija a través de una ventana y los fragmentos de ADN son iluminados al pasar por la ventana del capilar. Como con los geles, van a llegar al punto de detección primeramente las pequeñas moléculas después las moléculas de mayor tamaño. Los datos de la separación de la EC son proyectados como una función de la relativa intensidad de la fluorescencia observada de la emisión de la fluorescencia de los colorantes al pasar por el detector. Las señales de la emisión de la fluorescencia de los colorantes ligados a las moléculas de ADN pueden ser usados para detectar y cuantificar las moléculas de ADN. ^(41, 60, 73)

Electroforesis Capilar (EC)

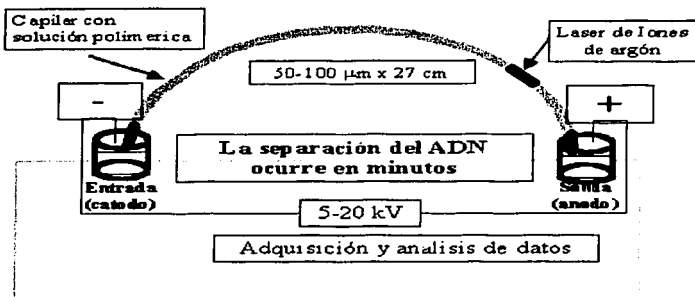


Figura 7.3 Esquema general de un sistema de Electroforesis Capilar para el análisis de ADN

7.4 Tinción con plata

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La tinción con plata en geles de poliacrilamida fue una herramienta para detección de pequeñas cantidades de proteínas y visualizar los ácidos nucleicos. Sin embargo ahora no es comúnmente usada, los procedimientos de tinción con plata fueron aplicados en los primeros kits STR comercializables por parte de Promega Corporation. El método de detección con plata es efectivo en laboratorios que realizan tipificación de ADN con un bajo presupuesto ya que no es muy caro. El instrumental no es necesariamente caro, simplemente se requiere un sistema básico de electroforesis en gel y algo de nitrato de plata.^(31,41)

El procedimiento de tinción con plata se realiza transfiriendo el gel entre recipientes con varias soluciones que exponen las bandas de ADN. Primero, el gel es transferido a un recipiente con solución de nitrato de plata al 2 %. La plata se une al ADN y es reducida con formaldehído formando un depósito de plata metálica en las moléculas de ADN en el gel. Se fotografía el gel para capturar la imagen de las cadenas de ADN teñidas con la plata para mantener el recuerdo permanente del perfil obtenido. Alternativamente, los geles pueden ser embalados y por tanto preservados.^(31,41)

Ventajas y desventajas de la tinción con plata

La tinción con plata es de bajo riesgo en comparación de los métodos de detección con marcadores radioactivos, pero no es tan conveniente como la utilización de los sistemas de fluorescencia. Los demás reactivos necesarios para aplicar la tinción con plata no son de cuidado por lo que no hay que tomar precauciones especiales al momento de manipularlos. La primera ventaja de este método es que la técnica no es cara. Los productos de PCR no necesitan de marcadores especiales o pasos adicionales como es el caso de los colorantes fluorescentes. La tinción puede ser realizada en alrededor de media a una hora con un mínimo número de pasos. La sensibilidad es de aproximadamente 100 veces mayor que la obtenida en la tinción con bromuro de etidio. Sin embargo, su mayor desventaja se encuentra en la interpretación de datos ya que las dos cadenas de ADN pueden ser detectadas en los sistemas desnaturalizados observando dos bandas por cada alelo. Además de que, solo existe un color para diferenciar los productos de PCR por lo que para la determinación simultánea de *loci* STR queda únicamente la diferenciación métodos fluorescentes

MARCADORES FLUORESCENTES USADOS EN LA TIPIFICACIÓN DE ALELOS STR

8.1 Características de los fluoróforos

La tabla 8.1 enlista los colorantes fluorescentes que son comúnmente usados para marcar productos de PCR para aplicaciones de genotipificación. Los nombres químicos de los colorantes se han agregado, además de su longitud de onda de excitación y de emisión. El kit AmpFISTR[®] de PE Biosystems usa primers que son marcados con los colorantes 5-FAM, JOE, o NED (Perkin Elmer 1998). Los kits GenePrint[®] PowerPlex[™] 1.1 y 2.1 de Promega Corporation usan primers marcados con fluoresceína y tetrametilrodamina (TMR).^(41,70)

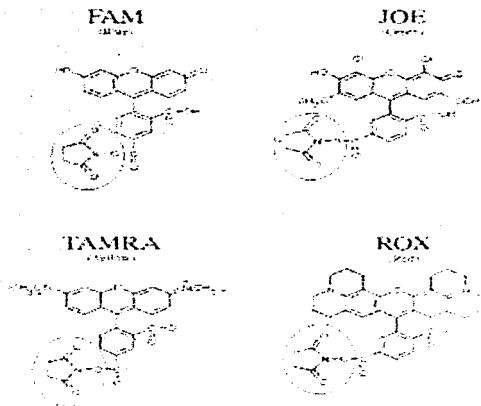
Colorante	Nombre Químico	λ de Excitación Máxima (nm)	λ de Emisión Máxima (nm)
5-FAM	5-Carboxi fluoresceína	493	522
JOE	6-Carboxi-2',7'-dimetoxi-4',5'-diclourofluoresceína	528	554
NED	Propiedad de PE Biosystems	553	575
ROX (CXR)	6-Carboxi-X-rodamina	587	607
Fluoresceína	Fluoresceína	490	520
TMR (TAMRA)	N,N,N,N-tetrametil-6-carboxi rodamina	560	583
TET	4,7,2',7'-Tetracloro-6-carboxi fluoresceína	522	538
HEX	4,7,2',4',5',7'-Hexacloro-6-carboxi fluoresceína	535	553
SYBR Green	Propiedad de Molecular Probes	497	520

Tabla 8.1 Características de los colorantes fluorescentes más comunes en los kits STR y en otras aplicaciones genotípicas

FAM y fluoresceína fluorescen en la región azul de el espectro visible, JOE en la región verde, y NED y TMR en la región amarilla. Los kits AmpFISTR[®] utilizan un cuarto colorante llamado ROX que emite fluorescencia en la región roja del espectro para marcar el estándar. Los kits PowerPlex[™] STR utilizan el fluoróforo rojo carboxi-X-rodamina (CXR) para marcar su estándar interno. ROX y CXR son en esencia los mismos colorantes.

Los marcadores 5-FAM, JOE, y NED son derivados de la fluoresceína. Las cuatro estructuras de los marcadores fluorescentes comúnmente usados de PE Biosystems son mostrados en la figura 8.2, ya que la estructura de NED es propiedad de PE Biosystems y desconoce, TAMRA, o tetrametil rodamina, fue incluida en su lugar como ejemplo de la estructura de un colorante amarillo.⁽⁴¹⁾

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
 PALMA DE ORIGEN

Figura 8.2 Fluoróforos usados por ABI para la detección de alelos STR en cuatro colores.

Cada uno de colorantes fluorescentes emiten una fluorescencia máxima a diferentes longitudes de onda. Esta característica es aprovechada para crear filtros que capturen la señal de cada marcador. Los de fluoróforos de los kits de PowerPlex™ son detectados por un escáner de fluorescencia de Hitachi FMBIO II. Cada uno de estos fluoróforos son también detectados por instrumentación óptica. Por ejemplo, por el ABI Prism 310 que usa láser de iones de argón (Ar⁺).

Cuando es requerido marcar varios fragmentos de ADN es importante usar apropiadamente la concentración de los fluoróforos a razón de obtener un balance de señales entre los *loci* del perfil genético. ⁽⁴¹⁾

8.2 Plataformas de detección de fluorescencia en alelos STR

Existen un gran número de plataformas de detección de fluorescencia con la finalidad de determinar alelos STR. Los métodos de detección más comunes actualmente para el análisis de STR son el Analizador Genético ABI 310 observado en la figura 8.3 y el escáner de gel FMBIO. Estos dos instrumentos tienen diferentes fundamentos de detección de fluorescencia en productos de PCR marcados. En general, los kits para tipificación de STR son específicos para cada sistema. ^(41, 54, 56)

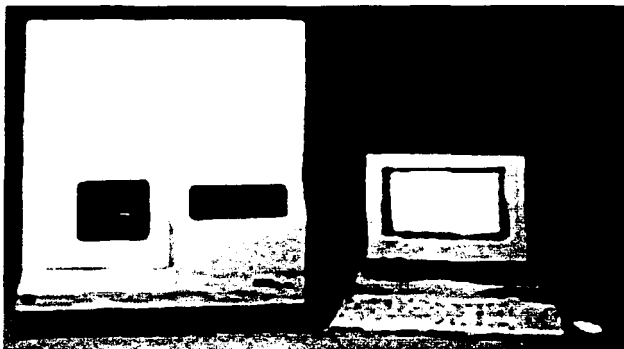


Figura 8.3 Analizador Genético ABI 310

Con el ABI 310, la detección es realizada durante la electroforesis esquematizada en la figura 8.4. Otros equipos que tienen un sistema de detección similar al ABI 310 son el ABI 373 o 377, el secuenciador ALF ADN, y el sistema LICOR. PE Biosystems creó los kits STR Profiler Plus™ y COfiler™ para trabajar con las plataformas de detección ABI 310 o ABI 377. Estos dos kits cubren los 13 marcadores STR que requiere el sistema CODIS con tres marcadores en común entre ellos con propósitos de concordancia. ^(41, 44, 72, 73)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

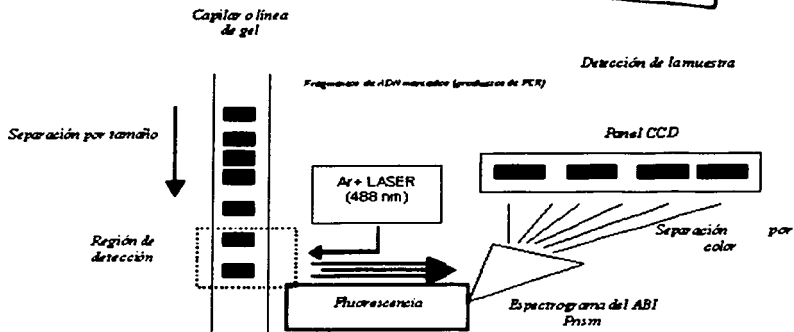


Figura 8.4 La ilustración muestra la separación y detección de alelos STR con el Analizador Genético ABI Prism 310

Con el FMBIO II o sistema de escaneo de gels, la detección es realizada posteriormente a la electroforesis. Así, varios gels pueden ser corridos fuera de línea y ser detectados rápidamente por escaneo en el sistema de imagen de fluorescencia FMBIO.

La corporación Promega ha creado dos kits STR múltiplex para trabajar en el FMBIO II: Power Plex™ 1.1 y el Power Plex™ 2.1. Estos dos kits también cubren los 13 loci STR que marca el CODIS nuevamente con tres STR's en común entre los dos kits para propósitos de concordancia. Estos STR son TH01, TPOX, y VWA. (4), (54), (55)

Estos dos métodos de separación y detección son de diferentes habilidades para separar alelos STR de varias longitudes. Todos los fragmentos de ADN viajan a la misma distancia cuando el detector está a un punto fijo relativamente a la inyección de la muestra, como en el ABI 310. Por otro lado, cuando la separación y la detección son etapas independientes, como en el escáner FMBIO, los diferentes tamaños de los fragmentos de ADN viajan distancias diferentes a través del gel. Las pequeñas moléculas productos de PCR viajan más lejos a través del gel mientras que las de mayor tamaño quedan atrás.

PROCEDIMIENTO DE GENOTIPIFICACIÓN AUTOMATIZADA DE STR's

9.1 El proceso de genotipificación

La colección de datos de una muestra a partir de los equipos ABI 310 o FMBIO II son una serie de picos que representan a los diversos alelos amplificados de una muestra de ADN. Estos picos evidencian varias localizaciones dentro de el electroferograma de una muestra y es registrada como una intensa señal fluorescente al pasar por el detector (en el caso del ABI 310) o posición sobre el gel (en el caso del FMBIO II gel imager). En la figura 9.1 son mostradas las etapas para diferenciar estos picos fluorescentes en los respectivos alelos. ^(41, 64, 72, 73)

Pasos en Genotipificación STR

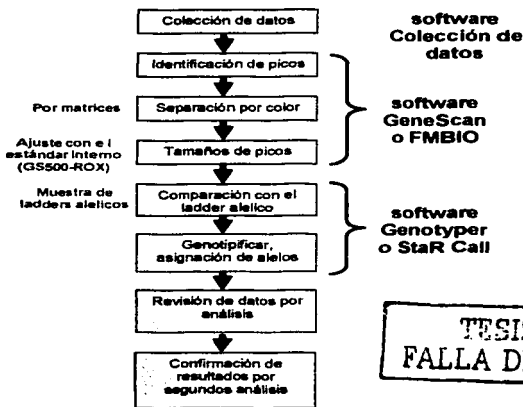


Figura 9.1 Proceso de genotipificación para determinación de alelos.

Los kits de STR múltiplex tienen la ventaja de usar fluoróforos múltiples que son solubles espectralmente. Los diferentes fluorocromos son separados y los picos que representan los fragmentos de ADN se identifican y asocian de acuerdo al color que les corresponda según el kit comercial que sea utilizado en ese momento. Los fragmentos de ADN son comparados con un estándar interno. Finalmente, la longitud de los productos de PCR de la muestra problema son

correlacionados con el líder alélico que tiene un tamaño similar al estándar interno. El líder alélico contiene alelos de repeticiones conocidas y es usado para medir o correlacionar la longitud de los productos de PCR con respecto al número de unidades de repetición presentes en un particular locus STR. De la comparación de la muestra desconocida con el bien conocido líder, es determinado el genotipo de la muestra desconocida. ^(41, 64, 70, 72, 73)

9.1.1 Fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN representados por picos en la electroforesis capilar como se muestra en la figura 9.2 o bandas en el gel son comparados con un estándar que es mezclado con las muestras de ADN. El estándar es marcado con diferentes colores de fluoróforos que pueden ser espectralmente distinguidos de los fragmentos de ADN de tamaño desconocido (Ver anexo). En el caso de los kits de ABI Prism 310 y AmpF1STR, el estándar interno es comúnmente el GS500-ROX. Este estándar contiene 16 fragmentos de ADN, con un rango de 35 pb a 500 pb, que son marcados con el colorante rojo ROX. Para el uso de FMBIO y los kits PowerPlex, el estándar interno es el ILS 600. Este estándar contiene 22 fragmentos de ADN, con un rango de 60 pb a 600 pb, el cual es marcado con el también rojo fluoróforo carboxi-X rodamida (CXR). ⁽⁴¹⁾

Datos del ABI Prism 310

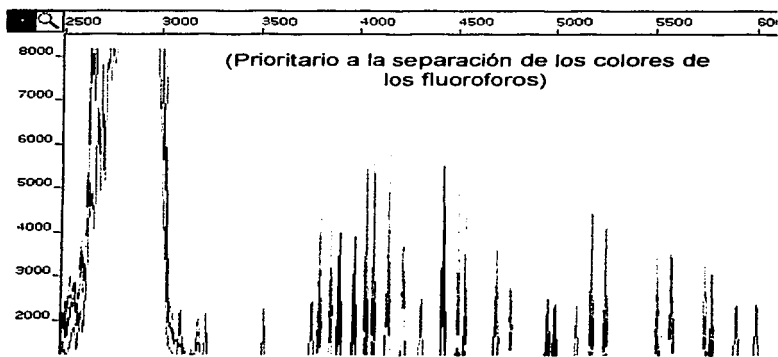


Figura 9.2 Datos generados por el Analizador Genético ABI Prism 310. La muestra fue amplificada por el kit AmpF1STR SGM Plus. Estos datos son prioritarios a la separación del color.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.1.2 análisis de los fragmentos de ADN y software de genotipificación

Un software totalmente sofisticado fue desarrollado para obtener datos electroforéticos rápidamente a través del proceso de genotipificación por el ABI 130, esto es hecho en dos pasos por dos diferentes programas de software. El software GeneScanSM es usado para obtener el espectro de los colores de los fluoróforos de cada pico y el tamaño por tanto de los fragmentos de ADN de cada muestra. El resultado de los electroferogramas son analizados por el segundo programa de software, GenotyperSM, en la figura 9.3 se observa la pagina de inicio de el programa. Este programa determina el genotipo de cada muestra por comparación del tamaño de los alelos observados dentro del líder alélico para así obtener los alelos del locus analizado de la muestra problema de ADN. ^(41, 57, 72, 73)

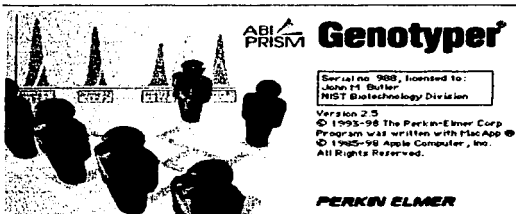


Figura 9.3 Esquema del inicio del programa GenotyperSM

Una vez que es procesado el electroferograma por GeneScanSM es importado hacia el programa de GenotyperSM, entonces un macro llamado "Kaznam", que es específico para loci STR y los líderes alélicos en cada kit AmpFISTRSM, se inicia en GenotyperSM para realizar la designación de los alelos. En este punto, el analista realiza el análisis de los picos que van a ser tipificados y con base en su experiencia puede o no editar el nombre dado por el software. Las tablas de alelos son creadas de la designación de alelos. Finalmente, los alelos pueden ser exportados a un programa de propagación, como el Microsoft Excel, para ir más allá en el análisis de datos o mandarlo a la base de datos de ADN. ^(41, 72, 73)

El FMBIO II hace la designación de bandas automáticamente, cuantificando la altura y el área del pico, y determina el tamaño de las bandas de ADN a través de la comparación con un estándar con el software para análisis FMBIOSM. El analista ajusta el color de la separación para obtener una mejor resolución de los colores de los marcadores. El color de cada banda de gel es editado manualmente dentro de un rango específico para la designación de los alelos. La genotipificación automática de los datos STR por FMBIOSM es realizada con el software de genotipificación Star CallSM. Este software hace los cálculos de las pares de bases de los alelos y convierte cada pico en el alelo apropiado basado en los cálculos del tamaño del fragmento de ADN problema comparado con el cálculo del tamaño de los alelos en el líder alélico. ⁽⁴¹⁾

9.2 Factores que afectan los resultados de genotipificación

Existen un gran número de etapas importantes para obtener resultados correctos. Algunos eventos están biológicamente relacionados y a la vez también tecnológicamente. Por ejemplo, la cantidad de picos de adiciones incompletas de 3'-nucleótidos o basura son eventos relacionados a la cantidad de ADN templado usado en la amplificación de la PCR. Por otro lado, los artefactos "Pull-up" y los resultados de los eventos umbrales de la tecnología fluorescente y el software son usados para tipificar las muestras.

Tres partes del proceso de genotipificación ilustrado en la figura 9.1 son cruciales para los sucesos de genotipificación de muestras. Esto incluye las tablas de matrices, el estándar interno, y las muestras de líderes alélicos.⁽⁴¹⁾

Las matrices son críticas para la separación del color apropiado en un electroferograma. Si los picos observados no son asociados con el color de un fluoróforo apropiado, cuando la muestra es genotipificada no es determinada correctamente. Las matrices son estabilizadas con el corrimiento de muestras que contienen cada uno de los fluoróforos de manera individual. El resultado de los corrimientos de los colorantes individuales son combinados para formar matrices matemáticas que son usadas para sustraer la contribución de otros colores dentro del espectro. Las matrices son exactas cuando las condiciones ambientales son constantes. Así, cuando el buffer electroforético se cambia, una matriz nueva tiene que ser estabilizada al grado de obtener el color apropiado entre los diferentes fluoróforos.

La calibración con el estándar interno es necesaria para la apropiada detección de fragmentos de ADN dentro de un electroferograma. Si cualquiera de los picos dentro del estándar están por debajo del umbral de detección la estabilidad de la colección de datos, el análisis del software y los algoritmos no van a trabajar apropiadamente y los alelos pueden ser designados incorrectamente. Por lo que el analista tiene que checar que los picos del estándar interno sean detectados acertadamente mientras se realiza el procedimiento de genotipificación de los alelos STR en la muestra.

El líder alélico es el estándar por el cual los alelos STR son comparados para obtener el genotipo de una muestra desconocida.^(41, 64)

9.2.1 La importancia de la precisión en genotipificación

La genotipificación de los STR es realizada por comparación del tamaño de los alelos de una muestra con el tamaño o longitud de los alelos del líder alélico de los mismos loci que los determinados en el ADN problema. Se necesita un alto grado de precisión entre las múltiples corridas dentro de un rango para llevar a cabo una correcta colección de los datos entre dos corridas, donde una la primera es para el líder y la otra es la muestra problema. La precisión para el sistema de medición es determinado por el análisis una muestra por duplicado o por el líder sobre condiciones de operación normales.

La precisión para las plataformas de separación y detección pueden ser muy baja ± 0.5 pb para distinguir exactamente entre alelos microvariantes (repeticiones parciales) y alelos de repeticiones completas que pueden diferir hasta por un solo nucleótido. En general, el alto peso molecular de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplía el error en las mediciones. Así, los más grandes alelos de los loci STR como el FGA y el D18S51 generalmente van a ampliar las variaciones de las mediciones al contrario de los pequeños alelos de los loci D3S1358 y TH01.⁽⁴¹⁾

Con el uso del ABI 310, se tiene confianza sobre el alto grado de precisión entre corridas donde un alto número de muestras son determinadas de manera secuencial a través del capilar entre cada inyección de el líder. La precisión del instrumento ABI 310 es comúnmente de 0.1 pb. Siempre a una variación de temperatura pequeña de 2 a 3° C entre el curso de los distintos corrimientos puede causar que los picos de los alelos migren ligeramente diferente al estándar interno y a diferente tiempo. Para aminorar este problema, los líderes alélicos pueden ser corridos más frecuentemente y las muestras problema pueden ser tipificadas con el resultado de la corrida de el líder más cerca.⁽⁴¹⁾

9.2.2 Procedimientos de ajustes con algoritmos

El calibrar los fragmentos de ADN con el estándar interno como se ilustra la figura 9.3. El algoritmo más común usado para determinar la proporción de los fragmentos de ADN es conocido como el método Southern (meridional). Este método usa el tamaño de dos picos conocidos y en medio uno desconocido. Usando el ejemplo de la figura 9.4, el pico de 165.05 pb es determinado con la medición del método Southern por la posición de los picos de 150 pb y 160 pb como puntos mínimos y de los picos de 200 y 250 pb como puntos máximos.

El método meridional o de Southern trabaja muy bien para la determinación exacta de la longitud de fragmentos de ADN sobre un rango de 100-450 pb cantidad necesaria para los alelos STR.⁽⁴¹⁾

Para el estándar interno GS500-ROX comúnmente utilizado en los kits AmpFISTR, solo desconoce picos arriba de las 490 pb o bajo las 50 pb y no puede aplicarse el método de Southern. Asimismo, si la intensidad de la señal para la calibración de uno de los picos en el estándar interno es de igual manera débil, cuando se tenga un pico desconocido en esa región no va a ser exactamente tipificado.

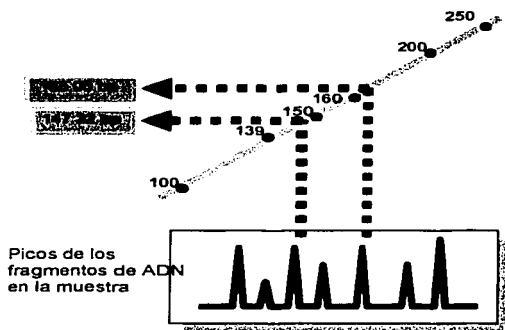


Figura 9.4 Proceso de tipificación de fragmentos de ADN por medio de un estándar interno

9.2.3 Alelos fuera del líder

Ocasionalmente las muestras pueden ser que contengan alelos que no caen entre los 0.5 pares de bases de un alelo que le corresponda a un *locus* específico de un líder alélico. Estos alelos son designados como alelos "fuera del líder" o microvariantes. El pico del alelo fuera de líder puede ser más grande o más pequeño que los alelos del rango alélico o pueden encontrarse entre los alelos del líder.

Si el alelo está a una longitud más baja que el líder, puede ser designado como el más pequeño del alelo más corto dentro del líder para propósitos de genotipificación. Por ejemplo, el alelo más pequeño del locus CSF1PO que se encuentra en el líder es el 6, por lo que si el alelo problema es más pequeño que este va a ser designado como CSF1PO<6. Sin embargo, por el contrario el alelo mayor del locus CSF1PO que se encuentra en el líder es el 15 por lo que un alelo mayor fuera del rango alélico va a ser designado como CSF1PO >15. Los alelos considerados dentro de un líder difieren entre las diferentes casas comerciales, ya que un alelo designado como fuera >15 por un kit puede ser designado por otro kit como el alelo 6. (41, 64, 72, 73)

Los alelos que son designados como fuera de un líder son designados usualmente por el número de bases adicionales o faltantes del alelo más pequeño que el anterior. Por ejemplo, un alelo del *locus* TH01 tiene tres bases solamente para poder completar otra secuencia base, el alelo 8 es el anterior a este fragmento por lo que se le va a llamar al alelo incompleto como TH01 8.3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.2.4 Perfiles parciales de STR

Si el ADN genómico en una muestra es severamente degradado o presenta inhibidores de la PCR, solamente se puede obtener un perfil parcial de STR. Usualmente los loci STR de gran tamaño en una reacción múltiple, como el D18S51 y el FGA, van a ser los primeros en causar problemas al trabajar una muestra de ADN degradada. Cuando únicamente es obtenido un perfil parcial, disminuye la significación, por que hay menos loci para comparar. ⁽⁴¹⁾

9.2.5 Interpretación de muestras

La mezcla de ADN de dos o más individuos es común en algunos casos forenses y puede interferir con la interpretación de un perfil de ADN. En la evaluación de la evidencia, el analista tiene que decir cual es la procedencia de la muestra de ADN problema si es de un solo individuo o de más personas. Esto puede complicar la examinación del número de alelos detectados de cada locus como también la altura del pico o la intensidad de la banda en el gel. Ocasionalmente la aparición de picos extra en los resultados se pueden confundir con alelos verdaderos. ⁽⁴¹⁾

OTRAS TECNOLOGÍAS EN EL ANÁLISIS DE IDENTIDAD GENÉTICA

10.1 Microchip portátil para electroforesis capilar ^(41, 72, 73)

La ventaja de analizar ADN en un equipo portátil en miniatura de electroforesis capilar (EC) es que debido a las pequeñas dimensiones de los canales, o capilares, permiten realizar aún más rápidamente una mejor separación de ADN. En lugar de utilizar un tubo capilar de vidrio de 30 cm de largo para hacer la separación del material genético, el microchip portátil de EC tiene un portaobjetos microscópico típico de vidrio con diminutos canales gravados en él que son de 10-50 μm de profundidad por 50 μm de ancho y diferentes cm de largo.

La separación es de 10 a 100 veces más rápida en el microchip CE que en la electroforesis capilar convencional. Usando solo 2 cm de distancia de capilar (comparado a los 36 cm del capilar utilizado en el ABI 310), los alelos tetranucleotídicos de los STR son separados en tan solo 30 segundos. El sistema de microchip de EC está siendo actualmente desarrollado con un formato de detección multicolor. Estos sistemas fueron hechos compatibles eficazmente con kits de STR comerciales.

También se han desarrollado microchips de electroforesis con capilares en serie con microplatos que tiene grabados 96 canales separados para aumentar el grado de muestras procesada al mismo tiempo. Estos equipos portátiles tienen la capacidad de separar 96 muestras diferentes en tan solo 2 minutos. ¡La información de genotipificación puede generarse por consiguiente a una velocidad de menos de dos segundos por muestra!

10.2 Determinación de STR por hibridación en serie ^(41, 72, 73)

Nanogen INC. está desarrollando un microchip mostrado en la figura 10.1, basado en una serie de experimentos que prometen representar la determinación de alelos STR rápidamente. Estos ensayos involucran el uso de un microchip de silicón compuesto de un grupo en serie de electrodos que actúan de manera independiente en los sitios de prueba. Un potencial eléctrico es dirigido directamente al sitio de prueba, el cual contiene una sonda única de ADN para hibridación.

La hibridación en serie de ADN se inicia con la aplicación de la muestra de ADN sobre el chip, después se realizan un par de lavados y se observa de donde se enlaza el ADN sobre la serie de sondas que contiene. La muestra amplificada por PCR va a unirse o hibridarse con su sonda de secuencia complementaria. Una "descarga eléctrica" es aplicada al sitio de cada sonda por un simple ajuste en el campo de energía eléctrica. Las muestras que no son perfectamente enlazadas a la sonda van a ser desnaturalizadas y van a ser removidas del lugar de la sonda.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cada lugar de prueba es separado de los otros. Con una señal observada en alguna de las posición en particular en la serie de sondas se indica que la secuenciación problema se ha unido a la sonda. Sondas fluorescentes pueden ser unidas a las moléculas de ADN para propósitos de detección. El software lee la posición de la serie por señales fluorescentes e interpreta los datos para determinar la secuencia presente en la muestra de ADN.

Para conocer que alelos STR están presentes en un *locus* en particular, el chip contiene los alelos conocidos para ese *locus*. Cada posición de la sonda en el chip tiene diferentes alelos. Los ensayos actuales de hibridizaciones de los STR involucran apenas dos sondas que se enlazan y flanquean las regiones de las repeticiones STR.

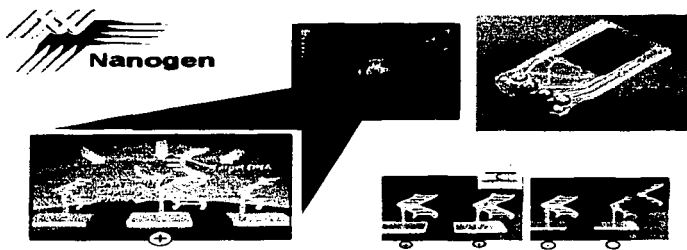


Figura 10.1 Imagen del equipo portátil de Microchip creado por NANOGEN

10.3 Instrumentos de electroforesis capilar en serie ^(41, 72, 73)

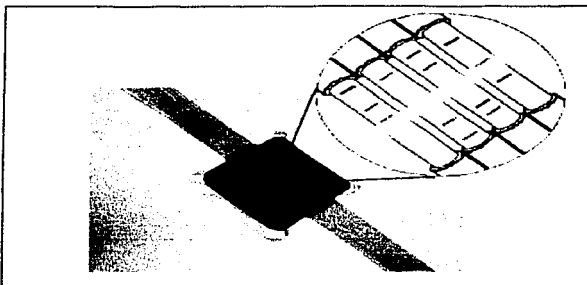
Las ventajas de la electroforesis capilar es su capacidad para automatizar la inyección, separación y detección de la muestra de ADN problema. Sin embargo, una de las mayores desventajas del equipo con un solo capilar es que el número de muestras por tiempo es limitado ya que es un proceso secuencial. La separación por electroforesis capilar paralelamente puede llevarse a cabo a través de la colocación de un mayor número de capilares creando así un sistema de electroforesis en serie (Figura 10.2). Cada capilar va a ser análogo a una línea de gel.

En 1999, dos sistemas de electroforesis de 16 capilares en serie fueron comercializados: el ABI 3700 de PE Biosystems (Foster City, CA) y el MegaBACE de Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech (Sunnyvale, CA). Estos instrumentos fueron desarrollados para apoyar la necesidad de secuenciar a gran escala debido al proyecto del genoma humano. El equipo ABI 3700 y el MegaBACE tienen 16 capilares en paralelo y tiene la capacidad de secuenciar más de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

500 nucleótidos en cada capilar en alrededor de 2 a 3 horas. Estos equipos pueden analizar potencialmente más de 1000 muestras en 24 horas.

Otra de las ventajas del uso de un equipo de electroforesis capilar en serie es que los mismos kits de amplificación de STR pueden ser usados. Los mismos cuatro colores fluorescentes existen comercialmente para estos equipos. Así, los datos de tipificación de STR de los equipos de ECS pueden ser comparados con el ABI 310 en un futuro.



Close-up image of capillary array detection cell with a stylized schematic representation of a capillary detection.

10.4 Espectroscopia de masas MALDI-TOF ^(41, 65, 72, 73)

Otro instrumento capaz de procesar muestras a gran escala es la espectrometría de masas en tiempo de vuelo. La espectrometría de masas una técnica analítica versátil que involucra la detección de iones y la medición de su proporción de carga / masa. Los iones son separados en un medio de vacío, el tiempo del análisis puede ser extremadamente rápido, al grado de segundos. En combinación con la preparación de muestras automatizada, el tiempo de vuelo de la espectrometría de masas ofrece un gran potencial en el procesamiento de miles de muestras de ADN diariamente.

Debido a la disposición de moléculas de ADN dentro de una fase gaseosa para el análisis en el espectrómetro de masas, otra técnica conocida como MALDI (matriz-asisted laser desorption-ionization) es utilizada. Cuando MALDI es acoplada con el tiempo de vuelo de la espectrometría de masas, esta técnica de medición comúnmente es referida como MALDI-TOF-MS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El análisis de ADN usando MALDI-TOF-MS se describe a continuación y se esquematiza en la figura 10.3. Una muestra de ADN líquida es combinada con los componentes (en exceso) de una matriz, que contiene ácido picotínico. Esta muestra es colocada en un plato de metal o silicón. Como la muestra se seca al aire, el ADN se cristaliza en la matriz, después el plato con las muestras es introducido en un medio de vacío en el espectrómetro de masas para su análisis. Entonces un destello producido por el láser inicia el proceso de ionización.

Cada pulsación del láser inicia la ionización de la muestra y la subsecuente separación de iones en el tubo de vuelo. Los iones de ADN viajan hacia el detector en cuestión de varios cientos de microsegundos ya que ellos se separan con base en su masa. Sin embargo, se necesitan varios segundos para analizar una muestra ya que las múltiples pulsaciones del láser son promediadas para realizar el espectro de masas final.

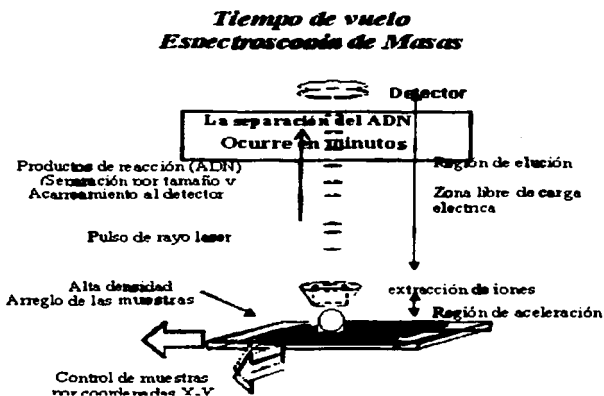


Figura 10.3 representación de las etapas de la separación y detección de los fragmentos de ADN por espectroscopia de masas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CODIS Y MARCADORES POLIMÓRFICOS DE TIPO STR

11.1 Generalidades

Desde el descubrimiento de las huellas digitales, ninguna otra aportación científica al campo de las ciencias forenses había tenido un impacto tan profundo como el desarrollo del método de análisis del ADN a partir de vestigios biológicos de interés criminal.

Las técnicas de estudio del ADN permiten fundamentalmente determinar qué individuos, de entre los sospechosos, han sido falsamente asociados con una evidencia biológica e ir reduciendo el número de sujetos potencialmente implicados a unos pocos, cuando no a uno solo.

Lo que se conoce como "tecnología ADN" incluye una amplia variedad de métodos analíticos, un gran número de estrategias de tipificación, un amplio espectro de marcadores genéticos, en definitiva, una diversidad de procedimientos que exigen también el uso de material informático especializado.

Desde el punto de vista técnico, la creación de bancos de datos de perfiles genéticos o de huellas digitales genéticas no resulta actualmente una tarea tan ardua como lo era hace una década.

Por ello algunos países como EE.UU o Inglaterra, han optado por esta creación de bancos de datos de perfiles de ADN de delincuentes, con el propósito de la resolución rápida y eficaz de un gran número de casos criminales.

En E. U. se conocen anualmente más de 300.000 delitos contra la libertad sexual. Ésta es una cifra muy elevada para un tipo de actos antijurídicos que suelen ser reincidentes en gran parte de los delincuentes que los llevan a cabo.

Partiendo de esta realidad, el Technical Working Group on DNA Analysis Methods (TWGDAM) proponía, en el año 1989, aprovechar las posibilidades de la tecnología ADN y las que otorga el desarrollo de la informática para la creación de bancos de datos que favorezcan el mejor funcionamiento de la Administración de Justicia en E. U.

El uso de estos bancos de perfiles genéticos ofrece ventajas indudables en los delitos contra la libertad sexual, al incluir conductas delictivas que con cierta frecuencia son repetitivas. Esas ventajas se pueden concretar en:

1. Se facilita la identificación del agresor, incluso en aquellos casos que antes quedaban sin resolver por no existir un claro sospechoso.
2. Se facilita la supervisión de la vuelta "condicional" a la comunidad de estos delincuentes, así como su integración definitiva en ella con ciertas garantías. ^(31, 41, 69, 73)

En este capítulo se describen los siguientes aspectos:

1. Estructura y funcionamiento de un sistema integrado de archivo de perfiles ADN que se basa en las necesidades e infraestructuras de las agencias e instituciones estadounidenses al servicio de la ley.
2. Bases y ventajas del uso de polimorfismos genéticos analizados por reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), así como criterios para la selección de los marcadores genéticos analizables por esta técnica con fines de identificación humana.

Esta información sirve de guía para la puesta en marcha de nuevos sistemas de identificación por ADN en otras naciones. ^(31, 41, 69, 73)

11.2 CODIS

El desarrollo y creación del FBI del denominado Combined DNA Index System (CODIS), o banco nacional estadounidense de perfiles de ADN, supone obtener de la tecnología ADN todo lo que ésta pueda dar de sí:

Los dos objetivos más importantes del CODIS son:

1. Otorgar asistencia a los investigadores en la identificación de sospechosos.
2. Incrementar la eficacia de los laboratorios forenses al facilitarles apoyo para la resolución de casos forenses, incluyendo la realización de cálculos estadísticos.

CODIS es una base de datos jerarquizada que contiene fichas de casos de identificación forense en los que se ha utilizado tecnología ADN. En cada ficha sólo queda registrada una parte limitada de la información concerniente al caso, es decir, exclusivamente aquella que permita la búsqueda de un perfil genético de ADN coincidente.

En general los datos recogidos por ficha son: a) un identificador del laboratorio; b) un identificador del espécimen; c) las características del ADN, y d) la información que permita clasificar y revisar la integridad del perfil de ADN.

Para ser totalmente operativo, el sistema CODIS del laboratorio del FBI está integrado en una red informática en la que participan laboratorios forenses locales, estatales y federales. De esta manera, CODIS posibilita que todos ellos puedan comparar perfiles de ADN y puedan comparar perfiles de ADN e intercambiar información con el fin de establecer conexiones entre distintos hechos criminales, aunque sean cometidos en distintos lugares y en distinto tiempo, y a veces tratándose de crímenes en serie. En definitiva, permite la identificación de potenciales sospechosos por medio de la comparación del patrón genético de individuos con antecedentes penales con el perfil de ADN de las muestras biológicas recogidas en el lugar de los hechos.

CODIS se ha incorporado como un banco de datos distribuido en tres niveles, local (Local DNA Index System, LDIS), estatal (Statal DNA Index System, SDIS) y nacional (National DNA Index System, NDIS).

Una gran variedad de estándares se han establecido para garantizar que tan sólo perfiles fiables y compatibles se contengan en los archivos NDIS. Estos incluyen estándares de calidad para la realización de análisis de ADN. Aunque en principio cualquier marcador genético puede ser incluido en LDIS, SDIS y NDIS, se requiere un grupo de *loci* específico de marcadores para cada perfil de ADN que se quiera introducir en el sistema nacional.

Las recomendaciones de la TWGDAM (Guidelines for a quality assurance program for DNA análisis) son la que se admiten y se siguen para llevar los programas de calidad. ^(31, 41, 69, 73)

11.3 Polimorfismos STR's

Los marcadores polimórficos de elección para su estudio por PCR son los denominados microsátélites o STR. Como también se ha comentado, estos marcadores están compuestos de secuencias repetidas en tándem, son altamente informativos y pueden resultar extraordinariamente efectivos a la hora de individualizar una muestra forense si se amplifican varios de ellos simultáneamente en un PCR multiplex.

El laboratorio del FBI patrocinó una iniciativa encaminada a determinar el grupo de *loci* STR que se debía utilizar para el registro nacional de perfiles de ADN. En abril de 1996 se celebró una reunión con el fin de planificar y organizar una estrategia de validación del uso de un grupo de *loci* STR en Criminalística Biológica.

Los propósitos, por tanto, eran la identificación de *loci* STR candidatos que pudieran ser analizados por medio de métodos de detección de fluorescencia, determinar las asignaciones alélicas que realizaban los distintos laboratorios participantes y cuales eran sus resultados de acuerdo con intervalos específicos. ^(31, 41, 69, 73)

Los objetivos que podían anticiparse eran: a) probar, evaluar, y/o optimizar la PCR y las condiciones de tipificación para los kits comerciales disponibles en el mercado que contiene *loci* STR candidatos; b) evaluar los protocolos para su uso por todos los laboratorios, una vez que las condiciones de tipificación deseadas sean establecido; c) crear bancos de frecuencias de datos de las poblaciones más importantes; y d) evaluar el efecto de las condiciones ambientales adversas en el análisis de estos marcadores en la rutina forense. Los STR que se evaluaron se ilustran la figura 11.1 y se mencionan a continuación: CSF1PO, F13A01, F13B, FES/FPS, FGA, TH01, LPL, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S359, D18S51 Y D21S11.



Figura 10.1 Posiciones en los cromosomas de los 13 loci STR que marca el sistema CODIS

Los laboratorios que participaron en esta iniciativa fueron: FBI, Policía Montada del Canadá, Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Departamento de Policía de Detroit, Departamento de Justicia de Florida, Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad del Norte de Texas, División de Ciencias Forenses de Virginia y Departamento de Salud Pública de la Universidad de Arizona, entre otras.

En la reunión celebrada entre el 13 y 14 de noviembre de 1997 se acordaba finalmente el grupo de marcadores STR que debían utilizarse para el sistema nacional. Se eligieron un total de 13 sistemas genéticos: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S359, D18S51 Y D21S11. Todos los laboratorios participantes en esta reunión se comprometieron, además a intentar la tipificación de esos 13 sistemas genéticos cuando analizaran casuística forense. Sin embargo, entre los participantes en el proyecto de STR había diferencias iniciales de criterio en lo concerniente a la manera en la que los 13 loci serían analizados en muestras de delincuentes. Se debatieron dos estrategias diferentes:

1. Tipificar todos y cada uno de los 13 STR en cada una de las muestras de delincuentes antes de ser remitidas al NDIS.
2. Tipificar un grupo de STR inicialmente, enviar los resultados para ese grupo al NDIS y dejar el resto de los STR para resolver determinados casos.

Algunos de los factores que se tuvieron en cuenta a la hora de establecer la aproximación más idónea fueron: costo económico y ahorro de tiempo, dificultad**, posibles fuentes de error, potencial individualizador, capacidad para resolver casos de mezclas, potencial como línea de investigación policial, imagen pública, posibilidad de evitar que una casa comercial particular se

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

configure como beneficiaria al utilizar un determinado kit de estudios de STR, qué loci utilizar inicialmente, tamaño de banco de datos y crecimiento de éste.

Las ventajas de la tipificación de delinquentes por todos y cada uno de los 13 loci STR fueron: incremento del poder de discriminación (incluso en mezclas o en muestras degradadas), menos problemas de asignaciones provisionales de patrones genéticos, mejores resultados en el control de calidad, presupuesto económico más claramente definido, respuesta más rápida a las necesidades policiales, menos documentación, favorecer la compatibilidad y el intercambio de registros en todo el país, inversión posterior mínima, mensaje claro y definido a los laboratorios comerciales y datos suficientes como para obviar las diferencias que puedan surgir como consecuencia del uso de primers de diversas casa comerciales. Así, el consumo de muestra no preocupa tanto debido a que no hace falta un análisis subsiguiente.

Los factores que se consideraban a priori como no favorables fueron los siguientes: inicialmente, el costo económico, la inversión en tiempo y la laboriosidad son superiores; un menor número de laboratorios pueden participar en un primer momento y es también inferior el número de muestras posibles de tipificar; la no disponibilidad de los 13 loci STR en un kit comercial.

Los pros y los contras de la tipificación de un grupo más reducido de STR son los opuestos a los que se derivan de la tipificación del conjunto de los 13 loci. Sin embargo, es necesario considerar algunos factores adicionales en relación con el uso de un grupo menos numerosos de STR y, entre ellos, la disponibilidad de kits en el mercado. En EE.UU. las casas que comercializan los kits de STR más utilizados son: Promega Corporation, Madison, Wisconsin, y Perkin Elmer, Foster City, California. Los STR que ofertan en común las dos casas son: CSF1PO, TH01, TPOX, VWA, D5S818, D7S820, Y D13S317. Obviamente, si se seleccionan estos 7 loci como los constituyentes del grupo inicial del trabajo, se obtiene la ventaja de la compatibilidad entre varios laboratorios que favorece que en un plazo corto de tiempo se puedan incluir los perfiles de ADN en el NDIS. Sin embargo, al seleccionar estos 7 loci se podría estar obstaculizando el uso de loci STR más apropiados científicamente, más discriminativos y adecuados para las tareas de identificación.

Tras discusión y evaluación, se decidió que para evitar los registros de ADN a NDIS se deberían tipificar las muestras de delinquentes por medio de los 13 loci. En niveles inferiores al nacional, como los correspondientes a laboratorios locales y estatales, se podría elegir la tipificación de cualquier grupo de marcadores de entre esos 13.

La combinación CODIS e investigación en STR, desde una doble perspectiva científica y judicial, redonda en un incremento de la capacidad de muchos laboratorios forenses a la hora de resolver casos criminales.

La experiencia de este esfuerzo de colaboración entre distintos laboratorios ha sido muy positiva, y no sólo porque haya permitido establecer los loci que debían utilizarse para la creación del CODIS. Además, esta experiencia ha impulsado el intercambio científico entre los miembros de la comunidad forense, que ya debe ser continuo, y ha puesto las bases para la validación de la tipificación de procesos de análisis por los STR. ^(31, 41, 69, 75)

CONCLUSIONES

La información recabada en el presente trabajo bibliográfico, nos proporciona una visión general de la utilización de los STR para el análisis de vestigios de tipo biológico localizados en el lugar de los hechos de un acto delictivo o en demandas de paternidad.

Dadas las características tan desfavorables en que se encuentran estos indicios biológicos en el lugar de los hechos o al ser recabados de un cadáver en estado de putrefacción, los STR's resultan idóneos para su análisis en virtud de que no se requiere de una gran cantidad y calidad de ADN obtenido debido al tamaño tan pequeño de este tipo de marcadores preservándose intactos aún bajo condiciones que evitan completamente la aplicación de otros tipos de marcadores genéticos como el calor, la humedad, la putrefacción, etc.

En cuanto, a la probabilidad de discriminación el análisis de un número adecuado de regiones (loci) de ADN puede hacer que estas probabilidades sean muy grandes, mayor al 99.99 % muy superiores a las objetivamente necesarias, lo cual nos permite llegar a una individualización de la evidencia altamente confiable.

La automatización en el análisis de estos marcadores disminuye el tiempo en la entrega de resultados, etapa vital en la procuración de justicia.

La selección de los 13 marcadores por el sistema CODIS o de un subgrupo de estos 13 para crear un perfil genético de la evidencia biológica o perfil biológico de un delincuente permite estandarizar estos resultados y compararlos con laboratorios de otros estados o naciones, facilitando el seguimiento de una línea de investigación para la resolución de casos criminales.

SUGERENCIAS

Finalmente, con base en la investigación bibliográfica realizada, nos percatamos de la falta de información en español y principalmente en México de un tema tan actual por lo que se sugiere considerar el presente proyecto como apoyo teórico a futuros trabajos de investigación relacionados al área de la Genética Forense, así como en las actividades de rutina en el trabajo de laboratorio.

También, se sugiere que continuamente se anexe información que amplíe los capítulos propuestos en esta monografía, con la finalidad de estar actualizada, que además cumpla con el objetivo inicial y la aplicación quizás de nuevos objetivos.

Debido a la necesidad creciente de los actos delictivos y la reincidencia de los delincuentes a cometer dichos actos, se sugiere que México con apoyo de instituciones de investigación académicas y las distintas Procuradurías de Justicia cree su propia base de datos, ya que a largo plazo el gasto económico disminuye.

REFERENCIAS

1. Reyes MA. Dactiloscopia. México: Porrúa; 1977.
2. Lorente AJ, Lorente AM. El ADN en la Identificación Criminal y en la Paternidad Biológica. España: Comares; 1995.
3. Moreno GR. Compendio de Criminalística. 3ª ed. México: Porrúa; 2000.
4. Vargas AE. Medicina Legal. México: Trillas; 1999.
5. Moreno GR. Los Indicios biológicos del delito. México: INACIPE; 2000.
6. Penacino GA., Corach D. Investigación e Implementación de Sistemas de Identificación de Individuos por Técnicas de Biología Molecular. Argentina: Servicio de Huellas Genéticas; 2002.
7. Lewin B. Genes. 2ª ed. España: Reverté; 1998
8. Klug SW, Cummings. Concepts of Genetics. 4ª ed. New York: Prentice Hall; 1994.
9. Salamanca F. Citogenética Humana. México: Editorial Médica Panamericana; 1990.
10. Stryer L. Bioquímica. 3ª ed. España: Reverté; 1990.
11. Sittman D. Recombinant DNA in biochemistry. Harward Publishing; 1994.
12. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. DNA Replication, Repair and Recombination In Molecular Cell Biology. 4ª ed. Scientific American Books; 1990.
13. D' Robertis. Biología Molecular. 13ª ed. Argentina: El Ateneo; 2000.
14. Russell PJ. Lectura notes in Genetic. Gran Bretaña: Black Well; 1980.
15. Wallace R, King J, Sanders G.: Biología Molecular y Herencia. México: Trillas; 1991.
16. Karp G. Biología Celular. 2ª ed. México; 1987.
17. Lehninger AL. Bioquímica. 2ª ed. España: Omega; 1990.
18. Murray RK, Granner DK, Mayes PA. Bioquímica de Harper. México: El Manual Moderno; 1994.
19. Emery AE., Mueller RP. Genética Médica. España: Churchill Livingstone; 1992.
20. Flouler JC, Burgoyne LA, Scout AC. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) y human genome variation a concise review relevant to forensic biology. J Forensic Sci 1988; 33: 1111-1126.
21. Graham RT. Forensic DNA Technology. 2 ed. New York. CRC Press; 1997.
22. Brain Ch, Sniegowski P, Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. Nature 1994; 371:215-220
23. Guizar VJ. Genética Médica. 2ª ed. México: El Manual Moderno; 1994.
24. Roberson, Ross A, Bugoyne L. DNA in Forensic Science Techniques and Application. Ellis Hood limited; 1990.
25. Renert P, Wagner M. Chromosomes a Synthesis. U.S.A.: Wiley-Lis; 1993.
26. Miller O, Therman E. Human Chromosomes. 4ª ed. New York: Services, inc and Managed by Francine Mc Neill; 2001.
27. Reynolds r, Sensabaugh G, Blake E. Analysis of genetic markers in Forensic DNA Samples using the Polymerase Chain Reaction. Analytical Chemical 1991; 63:2-15.
28. Chakraborty R, Kidd K. The utility of DNA Typing in Forensic Work. Science. 1991; 254; 1735-1739.

29. Syvanen AC, Sajantila A. Forensic DNA Typing by the Solid Phase Minisequencing Method. *EXC Siuza*. 1993; 67, 275-280.
30. Franco DAM. *Hematología Forense y otras Técnicas Serológicas*. 3ª ed. México: Porrúa; 1999.
31. Martínez JM. *La Prueba del ADN en Medicina Forense*. España: Masson; 1999.
32. Berumen CJ. El análisis del ADN en la Identificación de individuos. México: Ciencia y Desarrollo; 1993.
33. Beaudet Chr, Artur LS, Scriver WS. Introduction to human biochemical and molecular genetics. U.S.A: Mc Graw Hill; 1990.
34. Lisker R, Pérez BR, Granados J. Gene frequencies and admixture estimates in a México city population. *Ame J Ph Antrop* 1986; 71: 203-207.
35. Lisker R, Ramirez E, Pérez BR. Gene frequencies and admixture estimates in four mexican urban center. *Human Biology* 1990; 10:791-801.
36. Budowle B, Linsay JA, Decau JA. Validation and population studies of the loci LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 and GC (PM loci), and HLA DQ alpha usin a multiplex amplification and typing procedure. *J Forensic Sci* 1995; 40: 45-54.
37. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA "fingerprints". *Nature*, 1985; 318: 577-579.
38. Department of Justice. Forensic DNA Analysis: Issues. *Criminal Justice Information Policy* 1991; NCJ-128567: 1-31
39. Sajantila A, Budowle B. PCR amplification of alleles at D1S80 locus: Comparison of a finnis and North American Caucasian population sample and forensic case work evaluation. *Am J Hum Genet* 1992; 50:816-825
40. Deka R, Chakraborty R. Population Genetic characteristics of D1S80 locus in seven human population. *Hum Genet* 1994; 94:252-258.
41. Butler J. Forensic DNA Typing. Biology and Technology behind STR markers. 2ª ed. U.S.A: Academic Press; 2003.
42. Fregeau CJ, Fournay RM. DNA typing wit fluorescent tagget short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification. *Biotechniques* 1993; 15:100.
43. Nakamura Y. Variable number of tandem repeat (vnt) markers for human gene mapping. *Science* 1987; 235:1616.
44. Gelfand DH. Taq Polymerase in PCR Technology. Principles and Application for DNA Amplification. *Stockton Press* 1990; 17-22.
45. Sarcillo AD. Plateau Effect-Understanding PCR Limitations Amplifications, A fourm for PCR users. *Issue* 1993; 9:1-7.
46. Saiki RK. Optimitation of the polymerase Chain Reaction in Polymerase Chain Reaction. *Communications in Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1990; 25-30.
47. Barrera SH, Ortiz LR, Rojas MA. Reacción en cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo* 1993; 108:50-60.
48. Mc Pherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR a practical approach. *Gran Bretaña: IRL Press* 1994; 1.
49. Naom IS, Mathew CG, Town MM. Genetic mapping with microsatellites, DNA Cloning 3. A practical approach. 2ª ed. U.S.A: Glover and B.D. Hames; 1995.
50. *Methods in Molecular Biology. Forensic DNA Profiling Protocols*. NJ: Humana Press; 1998:3.

51. Civitello A, Hammond HA, Caskey T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49:746-756.
52. Bacher J, Schumm JW. Development of Highly Polymorphic Pentanucleotide Tandem Repeat Loci with Low Stutter. *Profiles in DNA* 1998; 2:3-6.
53. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA. Validation of STR Typing by Capillary Electrophoresis. *J Forensic Sci* 2001; 46(3):661-676.
54. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA. Validation of Short Tandem Repeats (STRs) for Forensic Usage: Performance Testing of Fluorescent Multiplex STR Systems and Analysis of Authentic and Simulated Forensic Samples 2001; 46(3):647-660.
55. Fregeau CJ, Vanstone H, Borys S. AmpFISTR[®] Profiler[™] Plus and AmpFISTR[™] Cofiler[™] Analysis of Tissues Stored in GenoFix[™], a New Tissue Preservation Solution for Mass Disaster DNA Identification. *J Forensic Sci* 2001; 46(5):1180-1190.
56. Greenspoon SA, Lytle PJ, Turek BS. Validation of the PowerPlex 1.1[™] Loci for Use in Human Identification. *J Forensic Sci* 2000; 45(3):677-683.
57. Crouse CA, Rogers S, Amiot E. Analysis and Interpretation of Short Tandem Repeat Microvariants and Three-Banded Allele Patterns Using Multiple Allele Detection Systems. *J Forensic Sci* 1999; 44(1):87-94.
58. Tun Z, Honda K, Nakatome M. Simultaneous Detection of Multiple STR Loci on Sex Chromosomes for Forensic Testing of Sex and Identity. *J Forensic Sci* 1999; 44(4):772-777.
59. Andersen J, Bramble S. The Effects of Fingerprint Enhancement Light Sources on Subsequent PCR-STR DNA Analysis of Fresh Bloodstains. *J Forensic Sci* 1997; 42(2):303-306.
60. Buel E, Schwartz MB, LaFountain M. Capillary Electrophoresis STR Analysis: Comparison to Gel Based Systems. *J Forensic Sci* 1998; 43(1):164-170.
61. Jin L, Underhill PA, Buoncrisiani M. Defining Microsatellite Alleles by Genotyping Global Indigenous Human Populations and Non-Human Primates. *J Forensic Sci* 1997; 42(3): 496-499.
62. Micka KA, Sprecher CJ, Lins AM. Validation of multiplex Polymorphic STR Amplification Sets Developed for Personal Identification Applications. *J Forensic Sci* 1996; 41(4):582-590.
63. Chakraborty R, Stivers DN. Paternity Exclusion by DNA Markers: effects of Paternal Mutations. *J Forensic Sci* 1996; 41(4): 671-677.
64. Schumm JW. Why Use a Size Markert and Allelic Ladders in STR Analysis?. *Profiles in DNA* 1997; 1(1):11-13.
65. Butler JM. STR Analysis by Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Profiles in DNA* 1999; 2(3):3-6.
66. Sprecher C, Krenke Ben, Amiot B. The PowerPlex[™] 16 Systems. *Profiles in DNA* 2000; 3-6.
67. Budowle B. Str allele Concordance Between Different Primer Sets. *DNA Technology: Where Is It Going?*. *Profiles in DNA* 2000; 3(3):10-11.
68. Nagy R, Maciver I. *DNA Technology: Where it is going?*. *Profiles in DNA* 1998; 2(1):2.
69. Word CJ. STR Data goes to court: A laboratory perspective. *Profiles in DNA* 1998; 2(1):7-8.
70. Technical Manual, PowerPlex[™] 16 Systems. Madison: Promega Corporation; 2001.
71. Dunbar BS. Two dimensional electrophoresis and immunological techniques. N.Y: Plenum Press; 1998.
72. STRBase: URL: <http://www.cstl.nist.gov/>
73. URL: <http://www.promega.com/>

GLOSARIO

Ácidos desoxirribonucleico (ADN o DNA). Molécula de doble hélice constituida por una espina dorsal de nucleótidos formados a su vez por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adénina, citosina, guanina y timina). El ADN es el soporte de toda la información genética que se transmite de generación en generación (genes y regiones no codificantes). Las bases del ADN codifican el ARN mensajero (ARNm), que a su vez codifica las secuencias de aminoácidos. El ADN de una persona es el mismo en cada núcleo de cada una de sus células.

Ácido desoxirribonucleico (ADN) polimerasa. Enzima que interviene en la replicación y la reparación del ADN.

Ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante. Molécula de ADN formada por componentes procedentes de más de una molécula progenitora; por ejemplo, un inserto de ADN humano colocado en un vector plásmido.

Ácido desoxirribonucleico (ADN) repetitivo. Secuencias de ADN distribuidas en múltiples copias en el genoma. Pueden aparecer dispersas o repetidas en tándem.

Ácido desoxirribonucleico (ADN) repetitivo disperso. Variedad de secuencias de ADN repetidas en la que las repeticiones aisladas están extendidas e intercaladas por todo el genoma. Compárese con REPETICIÓN EN TANDEM.

Ácido desoxirribonucleico (ADN) satélite. Segmento de ADN cuya composición de bases es lo bastante diferente como para formar una banda distinta en una centrifugación de gradiente de cloruro de cesio; suele contener secuencias de ADN muy repetitivas.

Ácido nucleico. Una gran molécula compuesta de subunidades de nucleótidos.

Ácido ribonucleico (ARN o RNA). Molécula de un único filamento formada por un azúcar (ribosa), un grupo de fosfato y una serie de bases (adenina, citosina, guanina y uracilo). Existen tres tipos básicos de ARN: mensajero, ribosomal y de transferencia.

Adenina (A). Una de las cuatro bases del ADN.

ADNc. ADN complementario, formado mediante la transcripción inversa de ARNm purificado a partir de una muestra de células. Este tipo de ADN sólo se corresponde con una secuencia codificadora (exones).

Alelo. Abreviatura comúnmente usada del término alelomorfo. Se puede definir como las diferentes formas en las que se manifiesta un gen o locus determinado en una población concreta; Formas alternativas de un locus genético.

Aminoácido. Una cadena de compuestos proteicos de al menos 20 bases nitrogenadas, que se combinan para formar una proteína.

Amplificación. Acción de incrementar el número de copias de una secuencia diana de ADN (un locus determinado). La amplificación puede realizarse *in vivo* o *in vitro* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Análisis de secuencias de bases. Un método, algunas veces automatizado, para determinar la secuencia de las bases.

Antígeno leucocitario humano (HLA). Término utilizado para designar a los productos proteicos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorradiografía. Es la forma en que se visualizan los resultados en múltiples técnicas de análisis genético. Imagen generada tras la exposición a una película de rayos X de un conjunto de fragmentos de ADN que han sido hibridados con una sonda marcada radiactivamente.

Célula. Estructura o unidad orgánica fundamental de los seres vivos, capaz de realizar procesos esenciales de la vida.

Célula somática. Células distintas a las de la línea germinal formadora de gametos. En seres humanos, la mayoría de células somáticas son diploides.

Cigoto. Óvulo fecundado diploide.

Citosina (C). Una de las cuatro bases del ADN.

Clon. Conjunto de fragmentos idénticos de ADN creados mediante técnicas de ADN recombinante. Con este término también se designa a las células idénticas que descienden de un único ancestro común.

Centrómero. Una región especializada del cromosoma en la cual los husos de las fibras se conectan durante la división celular.

Código genético. La secuencia de nucleótidos, codificada en tripletes (codones) a lo largo del mRNA, que determina la secuencia de aminoácidos en la síntesis de proteínas. La secuencia de ADN de un gen puede usarse para predecir la secuencia de mRNA, el código genético entonces puede usarse para predecir la secuencia de aminoácidos.

Codominantes. Par de alelos que se expresan ambos cuando aparecen juntos en estado heterocigoto.

Codón. Grupo de tres bases o triplete que especifica, cuando se traduce, un aminoácido.

Cromosomas. La estructura genética con capacidad de autoreplicación de células conteniendo el ADN celular que porta en su nucleótido un arreglo de genes en forma de secuencia. En procariontes, el ADN cromosomal es de tipo circular y todo el genoma es portado por un cromosoma. En eucariotes, los genomas consisten de un número de cromosomas cuyo ADN está asociado con diferentes tipos de proteínas.

Cromosomas autosómicos. Los 22 pares de cromosomas que no son cromosomas sexuales (X e Y).

Cromosomas homólogos. Un par de cromosomas conteniendo la misma secuencia lineal de genes, cada uno derivado a partir de uno de los padres.

Cromosomas sexuales. Cromosomas X e Y en seres humanos. Compárese con **CROMOSOMAS AUTOSÓMICOS**.

Deleción. Pérdida de material cromosómico.

Digestión por restricción. Proceso en que se expone el ADN a una enzima de restricción, causando su escisión en fragmentos de restricción.

Diploide. Un conjunto completo de material genético consistiendo de cromosomas apareados, uno de los cromosomas procedentes de cada conjunto parental; Posee dos copias de cada cromosoma. En los seres humanos, el número diploide es 46. Compárese con **HAPLOIDE**, **POLIPLOIDE**.

Doble hélice. Describe la forma de escalera enrollada de la molécula de ADN de doble filamento.

Dominante. Alelo que se expresa de forma idéntica en copia única (heterocigotos) o en copia doble (homocigotos). Compárese con **RECESIVO**.

Duplicación. Presencia de una copia adicional de material cromosómico. Compárese con **DELECIÓN**.

Electroforesis. Técnica de separación de moléculas gracias a la migración de las mismas en un campo eléctrico.

Electroforesis en campo pulsátil. Variedad electroforética adecuada para fragmentos relativamente grandes de ADN: el fragmento se desplaza por un gel mediante impulsos alternantes de electricidad.

Electroforesis proteica. Técnica en la que se identifican variaciones de aminoácidos según las diferencias de carga que ocasionan la movilización diferencial de los polipéptidos por un medio cargado eléctricamente.

Enzima. Una proteína que actúa como un catalizador, acelerando la tasa a la cual una reacción bioquímica sucede, pero sin alterar la dirección o naturaleza de la reacción.

Endonucleasa de restricción. Enzima bacteriana que escinde el ADN en una secuencia de ADN específica (lugar de restricción).

Entrecruzamiento. Intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la meiosis (también puede ocurrir, aunque raras veces, durante la mitosis); produce recombinación.

Exón. Las secuencias de ADN de una proteína codificante de un gen, o de otra manera son las secuencias que están representadas en el mRNA en el momento que llega a los ribosomas, porque son las regiones del gen que se expresan. Compárese con **INTRÓN**.

Exonucleasa. Una enzima que penetra o rompe nucleótidos secuencialmente a partir de terminaciones libres de una línea de ácido nucleico sustraído.

Extensión del cebador o primer. Parte del proceso de PCR, en el que la ADN polimerasa extiende la secuencia de ADN comenzando en un cebador oligonucleotídico.

Fenotipo. Características observadas en un individuo, producidas por la interacción entre genes y entorno.

Fragmento de restricción. Segmento de ADN que ha sido escindido por una endonucleasa de restricción.

Frecuencia de genotipo. Proporción de individuos en una población que son portadores de un genotipo específico.

Frecuencia de recombinación. Proporción de meiosis en las que se observan recombinaciones entre los dos *loci*. Se utiliza para estimar las distancias genéticas entre *loci*.

Frecuencia génica en una población. Proporción de cromosomas que contiene un gen específico.

Gameto. Célula germinal haploide (espermatozoide u óvulo).

Gen. *Locus* único responsable de un rasgo. La unidad física y fundamental de la herencia. Es una secuencia ordenada de nucleótidos localizados en una posición particular, sobre un cromosoma particular, que codifica un producto funcional específico (p.e. una proteína o una molécula de ARN).

Genética. El estudio de los patrones de la herencia de las características.

Genética de poblaciones. Rama de la ciencia que trata de la variación genética y de la evolución genética de poblaciones.

Genética molecular. Estudio de la estructura y la función de los genes a nivel molecular.

Genoma. Totalidad del ADN de un organismo. Todo el material genético en los cromosomas de un organismo particular, el tamaño de un genoma se da generalmente por el número total de pares de bases.

Genotipo. Constitución alélica de un individuo para un *locus* determinado o para un conjunto de ellos.

Guanina (G). Una de las cuatro bases de ADN.

Haploides. Células que poseen una copia de cada cromosoma (gametos). En humanos, el número haploide es 23.

Haplótipo. Constitución alélica de *loci* múltiples en un único cromosoma. Derivado de «genotipo haploide».

Heterocigoto. Individuo con dos alelos diferentes en un *locus*. Compárese con **HOMOCIGOTO**.

Heterocigocidad. La presencia de diferentes alelos en uno ó más *loci*, sobre los cromosomas homólogos.

Heteroplasma. Coexistencia de secuencias diferentes de ADN en un *locus* en una única célula. Se observa a menudo en el ADN mitocondrial.

Hibridación *in situ*. El uso de ADN o ARN prueba para detectar la presencia de una secuencia de ADN complementario en una célula cultivada de eucariote o de una bacteria clonada.

Hibridación. El proceso de unir dos cadenas complementarias de ADN o una de ADN y otra de ARN para formar una molécula de doble cadena.

Holándrica. Herencia ligada al cromosoma Y; transmisión exclusiva de padre a hijo. Homocigoto. Individuos cuyos dos alelos en un *locus* son idénticos. Compárese con **HETEROCIGOTO**.

Huella dactilar de ADN. Conjunto de polimorfismos ADN, por lo usual número variable de repeticiones en tándem (VNTR), tipificados en un individuo. Puesto que estos polimorfismos son muy variables, los genotipos combinados son útiles para la identificación de individuos en Medicina Legal.

Intrón. Secuencia de ADN no codificante que sule estar situada entre dos exones. Se transcribe en ARNm primario, pero se escinde en la formación del transcrito de ARNm maduro. Ver **EXONES**.

Kilobase (kb). Unidad de longitud para los fragmentos de ADN, es igual a 1000 nucleótidos.

Kilodalton. Unidad de masa molecular equivalente a 1000 daltons. Un dalton es la décima parte de la masa del átomo de carbono y equivale a $1,66 \times 10^{-24}$ g. Su abreviatura es kd.

Láder(es). su patrón de referencia, que está compuesto por una serie sucesiva de fragmentos de ADN cuyo peso molecular es conocido con exactitud.

Láderes alélicos. Patrones de referencia compuestos por una suma de todos los alelos posibles del *locus* o *loci* en estudio.

LINE. Clase de ADN repetitivo disperso en el que cada repetición es relativamente larga, hasta 7 kb. Compárese con **SINE**.

Ligazón o ligamiento. La proximidad de dos o más marcadores (p. e. genes, marcadores RFLP) sobre un cromosoma; a más unidos o pegados que estén los marcadores, menor será la probabilidad de que sean separados durante los procesos de replicación o reparación del ADN (fisión binaria en procaríotes, mitosis o meiosis en eucariotes) y entonces, mayor será la probabilidad de que ellos sean heredados de manera conjunta.

Locus (plural loci). La posición sobre un cromosoma de un gen u otro cromosoma marcado. El uso de locus, a veces está restringido para indicar las regiones de ADN que son expresadas.

Marcador. Una localización física identificable sobre un cromosoma (p. e. sitios de corte de enzimas de restricción, genes) cuya herencia puede seguirse. Los marcadores pueden expresarse en regiones de ADN (genes) o en algunos segmentos de ADN sin una función conocida codificable, pero cuyo patrón de herencia puede determinarse. Ver **RFLP** (longitud de fragmentos de restricción polimórficos).

Marcadores polimórficos. Sistemas genéticos variables que presentan formas diferentes en individuos diferentes como RFLP, VNTR, repeticiones microsatólites y grupos sanguíneos, ligados o no a un locus patológico.

Megabase (Mb). Un millón de pares de bases.

Meiosis. Proceso de división celular en que se forman gametos haploides a partir de células germinales diploides.

Mendeliano. Referido a Gregorio Mendel y describe un rasgo atribuible a un único gen.

Microsatélite. Tipo de ADN satélite que consiste en pequeñas unidades repetidas, por lo usual de 2, 3, 4 hasta 7 bp, que aparecen en tándem.

Minisatélite. Tipo de ADN satélite que consiste en unidades de repetición en tándem de longitudes entre 20 y 70 bp. La variación en el número de repeticiones minisatélites es la base de los polimorfismos VNTR.

Mitocondria. Organos que poseen funciones muy importantes para la respiración celular. Las mitocondrias tienen su propio ADN original.

Mitosis. Proceso de división celular en el que se producen dos células hijas idénticas a partir de una única célula progenitora. Compárese con **MEIOSIS**.

Monogénica. Describe la herencia de un rasgo de la que es responsable un único gen. Ese rasgo se denomina «mendeliano».

Mutación. Alteración de la secuencia de ADN; Cualquier cambio heredable en la secuencia de ADN.

Número variable de repeticiones en tándem (VNTR). Tipo de polimorfismo creado por variaciones en el número de repeticiones minisatélites en una región cromosómica definida.

Oligonucleótido. Secuencia de ADN constituida por un pequeño número de nucleótidos.

Oligonucleótido alelo-específico. Secuencia corta de ADN, en general de 18-20 nucleótidos, que se utiliza para la detección por hibridación de secuencias variantes de ADN causantes de enfermedades, o neutras, que sirven como marcadores.

Palíndromo. Secuencia de ADN cuya complementaria es la misma si se lee en sentido contrario (p. ej., 5'AATGCGCATT 3').

Panmixia. Describe una población cuyos individuos se unen al azar respecto a un genotipo específico.

Par de bases. Unidad de bases de ADN complementarias en una molécula de ADN de doble filamento (A-T, C-G).

Pirimidinas. Bases (citosina y timina en el ADN, y citosina y uracilo en el ARN) compuestas por anillos de carbono-nitrógeno simples. Compárese con **PURINAS**.

Polimorfismo. **Locus** en que dos o más alelos tienen frecuencias de gen superiores a 0,01 en una población. Cuando no se cumple este criterio, se dice que el **locus** es monomórfico; La variación genética que ocurre en más de 1% de una población se debe considerar como un polimorfismo útil para realizar análisis genético de ligamiento. Compárese con **MUTACIÓN**.

Polimorfismo de locus de restricción. Variación de la secuencia de ADN debido a la presencia o ausencia de un locus de restricción. Este tipo de polimorfismo es la base de los RFLP más tradicionales.

Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Variaciones en la secuencia de ADN en las poblaciones, detectadas mediante digestión de ADN con una endonucleasa de restricción; se efectúa la electroforesis de los fragmentos de restricción resultantes, transfiriendo los fragmentos a un medio sólido (*blot*) e hibridando el ADN en el *blot* con una sonda marcada.

Polimorfismo microsatélite. Variación genética entre individuos de una misma población que está basada en la existencia de números diferentes de unidades de repetición (de pequeño tamaño) en un **locus**.

Primers (iniciador). Cadena corta de polinucleótido preexistente a la cual pueden agregarse los nuevos desoxirribonucleótidos por la acción de la enzima ADN polimerasa.

Promotor. Un sitio sobre el ADN en el cual la ARN polimerasa se enlaza para iniciar la transcripción.

Probabilidad. Proporción de veces que se espera que un suceso específico ocurra en una serie de ensayos.

Purinas. Las dos bases de ADN (también de ARN), adenina y guanina, formadas por dos anillos de carbono-nitrógeno dobles. Compárese con **PIRIMIDINAS**.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnica de amplificación *in vitro* que genera un gran número de copias de una secuencia específica de ADN flanqueada por otras complementarias a las de dos cebadores oligonucleotídicos.

Recesivo. Alelo que sólo se expresa fenotípicamente en estado homocigoto. El alelo recesivo es ocultado por un alelo dominante cuando ambos se presentan juntos en un heterocigoto.

Recombinación. Aparición entre la descendencia de nuevas combinaciones de alelos, resultantes de entrecruzamientos producidos durante la meiosis progenitora. Intercambio de material genético entre cromosomas homólogos durante la mitosis.

Región pseudoautosómica. Extremo distal del brazo corto del cromosoma Y, que sufre un entrecruzamiento con el extremo distal del brazo corto del cromosoma X durante la meiosis en el hombre.

Reparación del ADN. Proceso en el que se modifican los errores en la secuencia del ADN para obtener la secuencia original.

Repetición en tándem. Secuencias de ADN que se presentan en copias múltiples localizadas directamente una junta a otra. Compárese con **ADN REPETITIVO DISPERSO**.

Secuencia de ADN. Orden de las bases de ADN a lo largo de un cromosoma.

Segregación. Distribución de genes desde cromosomas homólogos hasta gametos diferentes durante la meiosis.

Secuenciación. Determinación del orden de nucleótidos (secuencias de bases) en una molécula de ADN o ARN, o el orden de aminoácidos en una proteína.

Secuencias repetidas en tandem (STR). Copias múltiples de una misma secuencia de bases sobre un cromosoma; se usa como marcador en mapeo físico.

SINE (elementos intercalados cortos). Clase de ADN repetitivo en el que cada repetición es relativamente corta. Compárese con **LINES**.

Sustitución de par de bases. Cambio de un par de bases por otro. Tipo de mutación.

Telómero. Las terminaciones de los cromosomas. Estas estructuras especializadas están involucradas en la replicación y estabilidad de las cadenas de las moléculas de ADN.

Timina (T). Una de las cuatro bases del ADN, un miembro del par de bases A-T (adenina-timina).

Uracilo. Una base nitrogenada normalmente encontrada en el ARN pero no en el ADN, el uracilo forma pares de bases con la adenina.

Traducción. Proceso en el que una secuencia de aminoácido es ensamblada según el patrón especificado por el transcrito ARNm primario.

Transferencia de Southern (también, Southern Blot). Técnica de laboratorio en la que fragmentos de ADN sometidos a electroforesis en gel se transfieren a una membrana sólida de nylon o nitrocelulosa. Después puede hibridarse el ADN con una sonda marcada y exponerse a una película de rayos X. Véase también **AUTORADIOGRAFÍA**.

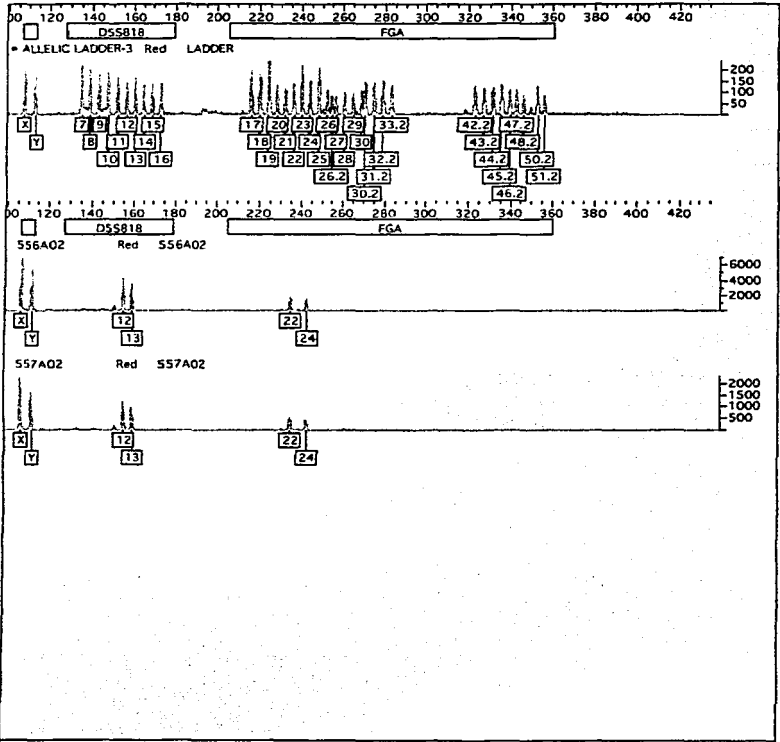
Translocación. Intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos.

Zona o punto caliente de recombinación. Región de un cromosoma donde la frecuencia de recombinación es elevada.

ANEXO

Los siguientes son ejemplos de electrogramas. Se observan los picos que representan los alelos de los *loci* analizados al hacer la comparación con el líder que es la primera serie de picos. También son organizados por colores dependiendo el fluoróforo con el que fue marcada, la secuencia detectada

Al aparecer solo un pico significa que el individuo al que pertenece dicho estudio es homocigotico para ese locus en particular. Si aparecen dos picos por lo tanto el individuo es heterocigotico.



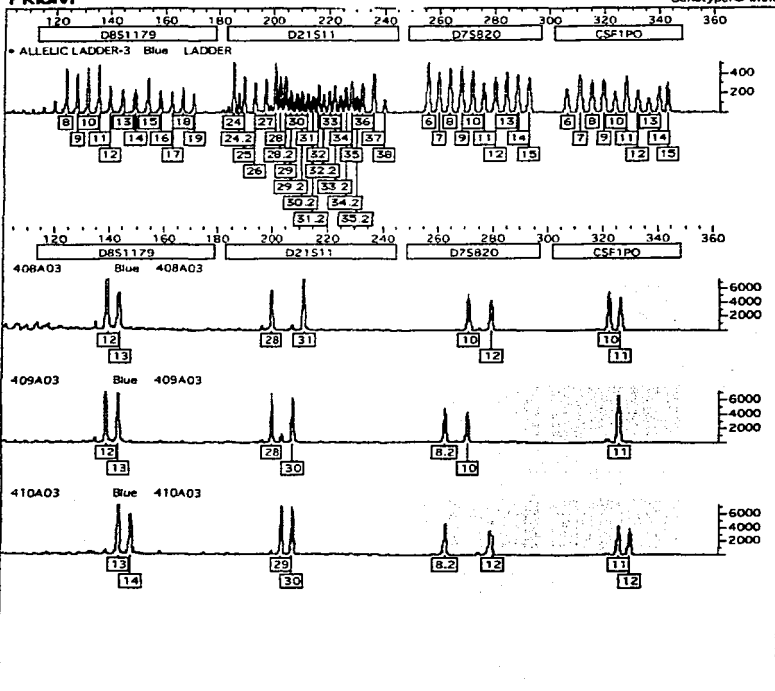
For research or forensic use only

-1-

Not for use in diagnostic systems

TRIS CON
FALLA DE ORIGEN

86



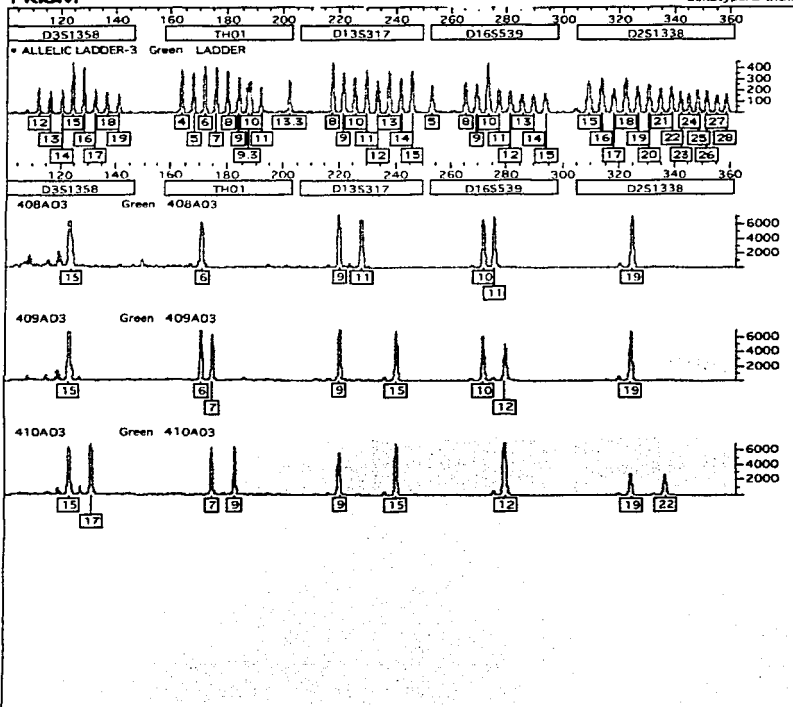
For research or forensic use only

-1-

Not for use in diagnostic systems

TECIS CON
FALLA DE ORIGEN

87



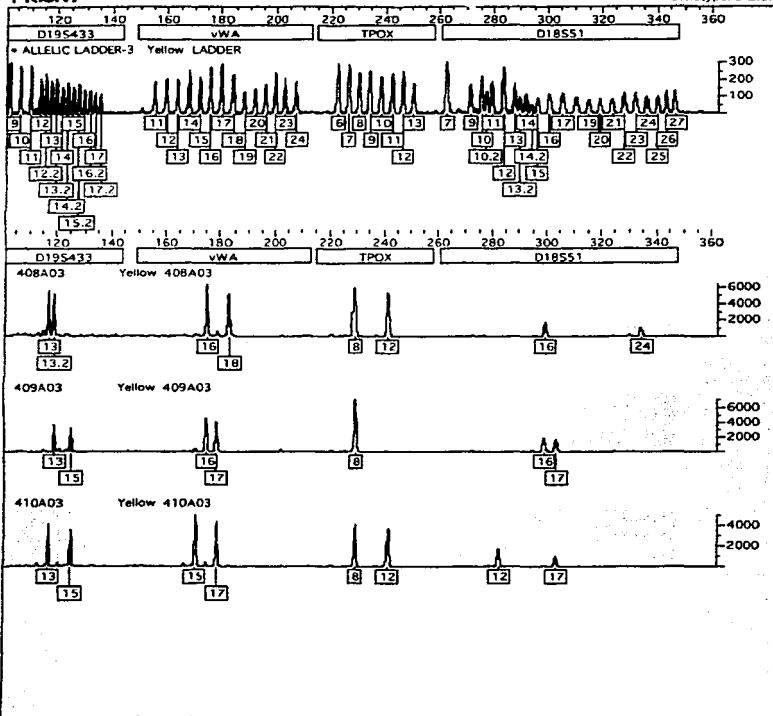
For research or forensic use only

-1-

Not for use in diagnostic systems

LABORATORIO
FONDA DE ORIGEN

88



For research or forensic use only

-1-

Not for use in diagnostic systems

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

89