

FACULTAD DE ESTUDIOS ZARAGOZA

UTILIDAD Y AVANCES EN PRUEBAS DE PATERNIDAD
CON APLICACIONES EN CRIMINALISTICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ROBERTO ZÚÑIGA REYNOSO

ASESOR: Q.F.B. CARINA GUTIERREZ IGLESIAS

MAYO 2006

México D.F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

*Le agradezco a la Universidad Nacional por haberme dado la oportunidad
de estudiar y poderme desarrollar profesionalmente
en el área que me gusta*

*A cada uno de mis profesores que me dieron algo de su conocimiento
y de su experiencia, laboral y visión crítica del mundo
así como de inculcarme la curiosidad por
todo el conocimiento, y su paciencia*

*A mis padres por su comprensión y apoyo, por haberme inculcado
la tenacidad, el trabajo y la fuerza para seguir adelante
y destacar un en la vida*

*A mis hermanos por impulsarme a terminar algo comenzado y superar
lo obtenido para servir de ejemplo a seguir sin obligación
pero con la convicción de hacer lo correcto*

*A Irene por haberme acompañado en esta travesía en una faceta de mi
vida con su apoyo incondicional, recordándome a cada momento
que me sentía cansado, el compromiso que me había trazado,
empujándome a llegar a la meta fijada*

*Que sirva de ejemplo, que las cosas que se quieren realizar son posibles
siempre que se tengan las ganas de lograrlas, para:
Alejandro ,Adriana e Ivan*

las ciencias aplicadas no existen, solo
las aplicaciones de la ciencia.
Louis Pasteur

La tecnología no nos ahorra tiempo, pero
Si lo distribuye de otra manera
Helman Nohr

La ignorancia afirma o niega rotundamente
La ciencia duda
Voltaire

Las leyes demasiado benignas rara vez son obedecidas
Las demasiado severas, rara vez son ejecutadas
Benjamín Franklin

Si das pescado a un hombre hambriento lo nutres
Durante una jornada. Si le enseñas a pescar
Lo nutres toda su vida
Lao tsé

Hay que estudiar mucho para saber poco
Barón de Montesquieu

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEORICO	5
BASES CROMOSÓMICAS DE LA HERENCIA	7
ESTRUCTURA DEL ADN	8
MEIOSIS Y REPRODUCCIÓN SEXUAL	13
ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GÉNICA	17
PROPIEDADES DEL CÓDIGO GENÉTICO	18
CLASIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL CÓDIGO HUMANO	21
ADN MITOCONDRIAL	23
VARIACIÓN HEREDITARIA Y POLIMORFISMO DE ADN	24
RFLP (Polimorfismo en la longitud en los fragmentos de Restricción)	24
VNTR (Repeticiones en tándem de número variable)	25
ADN MICROSATÉLITE	27
EL ANÁLISIS DE ADN	28
ANÁLISIS DE ADN EN LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS	29
HOMOGENÉTICA FORENSE	30
TÉCNICAS USADAS EN EL ANÁLISIS DE ADN	31
Southern-blotting	33
Enzimas de restricción	35
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa	37
PRUEBAS PARA DETERMINAR LA PATERNIDAD	41
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
OBJETIVOS	42
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	42
DETERMINACIÓN DE LA PATERNIDAD	42
BASES GENÉTICAS PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS CON LA HUELLA DIGITAL DEL ADN	47
MARCADORES UTILIZADOS EN LA POBLACIÓN MEXICANA	49
FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES	50
PROBABILIDAD Y COINCIDENCIA AL AZAR, (PCA)	51
ESTUDIOS DE FAMILIAS	52
MARCAJE DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN	58
APLICACIÓN PRÁCTICA EN LABORATORIO DE GENÉTICA FORENSE	59
MÉTODOS PARA DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD	60

GEMELOS	61
UN CASO DE PATERNIDAD	62
ESQUEMA DE HUELLA GENETICA	63
ANÁLISIS DE RESULTADOS	64
CONCLUSIONES	66
GLOSARIO	68
REFERENCIAS HISTORICAS	77
BIBLIOGRAFÍA	84

INTRODUCCIÓN

La investigación de la paternidad consiste en una serie de pruebas biológicas destinadas a la identificación de uno de los progenitores, involucrando a este y el hijo cuestionado. Esto implica que la investigación puede ir dirigida a aclarar la paternidad o la maternidad.

En casos especiales, por medio de esta prueba se pretende establecer relaciones familiares en situaciones distintas, fundamentalmente por la ausencia de uno o de ambos padres.³

Considerando que la paternidad es el vínculo de parentesco entre el progenitor y el hijo, desde el punto de vista jurídico, la paternidad se presupone de:

- Cohabitación de los progenitores
- Relación sexual fecunda.

Las pruebas de paternidad son de utilidad en aquellos casos en los que existe el raptó de menores o extravío, confusión de recién nacidos en un hospital, negación de la paternidad o reconocimiento por el supuesto padre, impugnación de la paternidad legítima por parte del marido, identificación de víctimas *postmortem* en un accidente o desastre, entre otras etc.

En la actualidad se dispone de un arsenal técnico para la determinación de las pruebas de paternidad, agrupando diferentes niveles como:

-Nivel morfológico: que describe los caracteres macroscópicos, ya sea desde el punto de vista clínico (exploración), como el morfológico (bertillonaje), que se refiere a la fisonomía de cada persona y sus características más importantes, como el color de piel, la estatura, forma de la nariz etc., que pueden auxiliar en la descripción de una determinada persona para elaborar un retrato hablado.

-Hemogenética forense: se basa principalmente en el sistema de grupos sanguíneos ABO.

-Homogenética forense: (anteriormente llamada hemogenética, hoy más especializada) que abarca a cualquier componente orgánico como:

a-Nivel citogenético: que analiza la estructura de los cromosomas.

b-Nivel genético-molecular: analiza los productos de expresión génica (proteínas , antígenos celulares etc.) y que hasta hace poco tiempo era el nivel mas avanzado.

c-Nivel génico: Estudio del ADN con diversas metodologías como las sondas, PCR y secuenciación sobre fragmentos como RFLPs (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) o las repeticiones en tándem de número variable (VNTR)

En el presente trabajo se analizará la utilidad de los RFLP y VNTR en criminalística aplicados a las pruebas de paternidad.

MARCO TEORICO

ANTECEDENTES HISTORICOS

El concepto de presunción de la paternidad legítima ha experimentado cambios a través de los tiempos.

En las civilizaciones primitivas, el primer esbozo de organización social se dio en torno a la autoridad de la madre posteriormente la familia se organizó alrededor del poder del padre y apareció la institución denominada *tollere liberum*, mediante la cual el padre de familia aceptaba o rechazaba al hijo que le era presentado.

En un principio no existían pruebas biológicas de paternidad, ni se intuía el posible grado de exactitud que podrían aportar. Fundamentalmente se basaban en demostrar la posibilidad física de mantener o no la relación sexual y valorar el parecido familiar. No obstante la semejanza fisiognómica pudo y de hecho provocó situaciones conflictivas, mencionándose de confusión involuntaria e intencionadas; tal es el caso de Pedro Mata que relata el caso de Leodicea quien asesinó a su esposo Antioco, rey de Siria, poniendo después en el lecho matrimonial a Antinor, que era muy parecido al rey y con esto se apoderó del trono y evitó ser castigado por el asesinato del verdadero rey.

Durante el siglo XIX, apareció el código de Lipit Ishtar, considerado como una de las más antiguas obras jurídicas, y que introdujo la primera distinción en la relación filial al individualizar la maternidad y la paternidad.

Ya en siglo II a.C. en el código de manú apareció la primera fórmula para atribuir la paternidad: el hijo le pertenece a quién ejerce el poder sobre la madre.

En el siglo XVII a.C. el código de Hamurabi, estipulaba además, diferencias entre los hijos del primer matrimonio y los del segundo matrimonio.

Pero fué en Roma donde surgió la máxima expresión de la presunción de la paternidad, este principio de *pater is est* del derecho de paternidad legítima, al atribuirle al marido para los hijos nacidos dentro del matrimonio.

En el derecho canónico, la paternidad se atribuía a quien había cohabitado con la mujer, y siempre que esta diera a luz en la casa de aquél, otorgando legitimidad a los hijos producto del concubinato.

El desarrollo científico acompañado por el avance tecnológico, empezó a ser notable. Con estos conocimientos se lograba aportar datos cada vez mas válidos sobre esta compleja cuestión, por lo que comienza a configurarse la heredobiología, la cuál , sobre una base científica, empezó a realizarse estudios sobre determinadas estructuras y características de nuestro organismo, que relacionan los rasgos influenciados por la herencia (como color de cabello, piel, ojos, forma de la cara, orejas, nariz etc.).

Kuhne describió variaciones en la disposición anatómica de la columna vertebral. Fué una teoría, que tuvo aceptación inicial pero posteriormente fue abandonada al demostrarse algunas imperfecciones científicas como falta de objetividad o bien, estas variaciones podían ser provocados por accidentes, es decir podía estar influenciada por factores externos.

El estudio de los dermatoglifos, que es el estudio de las marcas superficiales de la piel de manos y pies a manera de huellas dactilares actual, así como la capacidad de percibir el sabor amargo, fueron otras pruebas para la determinación de la paternidad. En la actualidad están en desuso por su falta de respaldo científico.

Sin lugar a duda el gran descubrimiento y paso definitivo para el estudio realmente científico y objetivo de la paternidad fue la descripción del sistema ABO por Carl Landsteiner en el año 1900 y la posterior descripción de su transmisión hereditaria por Von Dugern y Hirschielf en 1910.

De este modo entramos a la etapa actual, iniciándose la homogenética forense⁴ que con el paso de los años a llegado a ser fundamento y base de la investigación biológica de la paternidad.

BASES CROMOSÓMICAS DE LA HERENCIA

EL COMIENZO DE LA GENÉTICA.¹¹

En realidad, el estudio científico de la herencia, es decir, de la transmisión de las características de los progenitores a los descendientes, no tuvo lugar hasta la segunda mitad del siglo XIX

El primer científico que meditó sobre el mecanismo de la herencia fue Hipócrates (460?-377? a. C.), quien propuso que ciertas partículas específicas o, "semillas", son producidas por todas las partes del cuerpo y se transmiten a la progenie en el momento de la concepción, haciendo que ciertas partes de los descendientes se asemejen a esas mismas partes de los progenitores.

Un siglo después, Aristóteles rechazó las ideas de Hipócrates. Los hijos parecen heredar a menudo características de sus abuelos, o de sus bisabuelos, antes que de sus padres, observó Aristóteles. ¿De que manera estos parientes lejanos pudieron haber contribuido con las "semillas" de la carne y de la sangre que eran transmitidas de los padres a la progenie? Para resolver el conflicto, Aristóteles postuló, que el semen del macho estaba formado por ingredientes imperfectamente mezclados, algunos de los cuales fueron heredados de generaciones pasadas. En la fecundación, propuso, el semen masculino se mezclaba con el "semen femenino", el fluido menstrual, dándole forma y potencia (dynamis) a la sustancia amorfa. A partir de este material se formaba la carne y la sangre cuando se desarrollaba originaba la progenie. Durante 2000 años nadie tuvo una idea mejor.

A mediados del siglo XIX, los conceptos de los ovistas y espermistas comenzaron a ceder frente a nuevas observaciones. Los hechos que pusieron en tela de juicio estas primeras explicaciones provinieron no tanto de experimentos científicos, sino de los intentos prácticos de los maestros jardineros para producir nuevas plantas ornamentales.

Aproximadamente en la misma época en que Darwin estaba escribiendo el *Origen de las Especies*, un monje austriaco, Gregor Mendel, iniciaba una serie de experimentos que llevaría a la comprensión del mecanismo de la herencia; Mendel que había nacido en una familia de campesinos en 1822, entró a un monasterio de Brünn (actualmente Brno, República Checa), donde pudo recibir

educación. Asistió a la universidad de Viena durante dos años, donde realizó estudios en matemáticas y otras ciencias. Luego de fracasar en los exámenes para obtener el certificado en docencia a que aspiraba, se retiró al monasterio, en el que finalmente llegó a ser abad. El trabajo de Mendel, llevado a cabo en un tranquilo jardín del monasterio e ignorado hasta después de su muerte, marca el comienzo de la genética moderna.

La gran contribución de Mendel fue demostrar que las características heredadas son llevadas en unidades discretas que se reparten por separado -se redistribuyen- en cada generación. Estas unidades discretas, que Mendel llamó *elemente*, son las que hoy conocemos como genes.¹¹

ESTRUCTURA DEL ADN

El ADN había sido aislado por primera vez en 1869 por un bioquímico suizo llamado Friedrich Miescher, en la misma década notable en la cuál Darwin publicó *El Origen de las Especies* y Mendel presentó sus resultados a la Sociedad de Historia Natural de Brünn.

La sustancia que Miescher aisló era blanca y azucarada, ligeramente ácida y contenía fósforo. Dado que la halló sólo en el núcleo de las células, la llamó "nucleína", nombre que luego se transformó en ácido nucleico y mucho después en ácido desoxirribonucleico (ADN), para distinguirlo de otro compuesto químico que también se encuentra en la célula, el ácido ribonucleico (ARN).

Desde que Miescher aisló la sustancia posteriormente conocida como ácido nucleico, poco se había avanzado en la determinación de su estructura molecular hasta que, en 1885, el bioquímico alemán A. Kossel eliminó las proteínas asociadas a los ácidos nucleicos y obtuvo por separado los distintos tipos de bases nitrogenadas. Kossel concluyó que en los ácidos nucleicos también estaba presente un azúcar, pero no pudo precisar cuál, por estos trabajos, Kossel recibió el premio Nobel en 1910.

En 1914 otro alemán, Robert Feulgen, descubrió que el ADN tenía una atracción inusualmente fuerte por un colorante rojo llamado fucsina, Feulgen consideró su hallazgo poco importante que no se molestó en comunicarlo durante una década. La coloración de Feulgen, (como fue llamada cuando finalmente se la comenzó a usar), mostró que el ADN se encontraba en todas las células y que se ubica en los cromosomas.

Durante la década de 1920, la mayoría de los trabajos sobre su estructura química fueron desarrollados en un solo laboratorio por el eminente bioquímico ruso-americano P.A. Levene. Este mostró que el ADN podía ser degradado en

un azúcar de cinco carbonos (desoxirribosa), un grupo fosfato y cuatro bases nitrogenadas: adenina y guanina (purinas), timina y citosina (pirimidinas)¹¹, (ver figura 1).

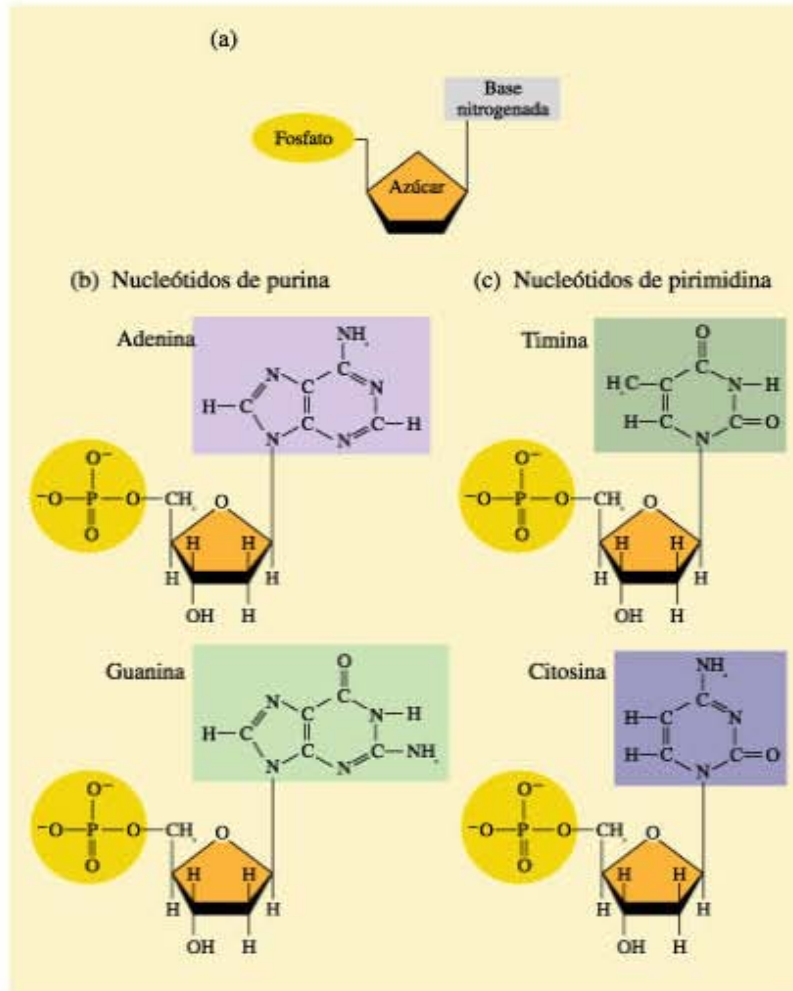


Figura 1. Estructura del azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato y cuatro bases nitrogenadas, Adenina, Timina, Guanina y Citosina, resultado del trabajo que realizó el bioquímico P.A. Levene.

Por su composición química elemental (C,H,O,N, y P), derivada de la presencia exclusiva de nucleótidos en su estructura, los ácidos nucleicos se diferencian de las proteínas, esencialmente, en su mayor contenido de fósforo (10%) y en la ausencia total de azufre.

Es hasta los primeros años de la década de 1950, cuando un joven científico norteamericano, James Watson, llegó a Cambridge, Inglaterra, con una beca de investigación para estudiar problemas de estructura molecular. Allí, en el

laboratorio Cavendish, conoció al físico Francis Crick. Ambos estaban interesados en el estudio del ADN y pronto comenzaron a estudiar juntos para resolver el problema de su estructura molecular.

No hicieron experimentos en el sentido habitual, sino que se dedicaron a examinar y a contrastar todos los datos existentes acerca del ADN y a unificarlos en una síntesis significativa.

LOS DATOS CONOCIDOS.¹¹

En el momento en que Watson y Crick comenzaron sus estudios, ya había un cúmulo de abundante información sobre el tema:

1.- Se sabía que la molécula del ADN era muy grande, también muy larga y delgada, y que estaba compuesta por nucleótidos que contenían las bases nitrogenadas adenina, guanina, timina y citosina.

2.- De acuerdo con la hipótesis de Levene, se suponía que estos nucleótidos estaban ensamblados en unidades repetidas de cuatro.

3.- El químico norteamericano L. Pauling, había propuesto, en 1950, que las cadenas de aminoácidos que componen las proteínas están dispuestas a menudo en forma de hélice y que se mantienen así por puentes de hidrógeno entre los giros sucesivos de la hélice. Pauling había sugerido que la estructura del ADN podría ser semejante.

4.- Los físicos Maurice Wilkins y Rosalind Franklin, en el King's College de Londres, habían aplicado la técnica de difracción de rayos X al estudio del ADN. Las fotografías obtenidas mostraban patrones que casi con certeza reflejan los giros de una hélice gigante.

5.- También fueron cruciales los datos de Chargaff, que indicaban que, dentro de error experimental, la cantidad de adenina (A) es igual que la de timina (T) y que la de guanina (G) es igual que la de citosina (C): $A=T$ y $G=C$.

A partir de estos datos algunos de ellos contradictorios, Watson y Crick intentaron construir un modelo de ADN que concordara con los hechos conocidos y explicara su papel biológico. Para llevar la gran cantidad de información genética, las moléculas debían ser heterogéneas y variadas. También, debía haber alguna forma en que pudiesen replicarse rápidamente y con gran precisión, de modo que les fuese posible pasar copias fieles de célula a célula y del progenitor a la descendencia, generación tras generación.

Reuniendo los diferentes datos, los dos científicos dedujeron que el ADN, tiene las siguientes características:

- Es una doble hélice, entrelazada y sumamente larga.
 - Los dos parantes o lados de la escalera están constituidos por moléculas de azúcar y fosfato alternadas.
 - Los peldaños perpendiculares de la escalera están formados por las bases nitrogenadas adenina, timina, guanina y citosina.
 - Cada peldaño está formado por dos bases, y cada base está unida covalentemente a una unidad de azúcar-fosfato.
 - En la doble hélice, las bases enfrentadas se aparean y permanecen unidas por puentes de hidrógeno, relativamente débiles que Pauling también había encontrado en sus estudios sobre la estructura de las proteínas.
 - De acuerdo con las mediciones efectuadas mediante rayos X, la distancia entre los dos lados o parantes de la hélice es de 2 nanómetros.
- Dos purinas combinadas tendrían mas de 2 nanómetros y dos pirimidinas no alcanzarían para cubrir esta distancia. Pero si una purina se aparea en cada peldaño con una pirimidina, habría un ajuste perfecto y la molécula tendría el mismo ancho en toda su longitud. Por consiguiente, las bases apareadas debían ser siempre combinaciones de una purina con una pirimidina.
- Las dos cadenas corren en direcciones opuestas, es decir, la dirección desde el extremo 5' al 3' de cada cadena es opuesta y se dice que las cadenas son antiparalelas. Aunque los nucleótidos dispuestos a lo largo de una cadena de la doble hélice pueden presentarse en cualquier orden, su secuencia determina el orden de los nucleótidos en la otra cadena .

Cuando Watson y Crick analizaron los datos, armaron modelos reales de las moléculas usando alambre y hojalata, ensayando dónde podía encajar cada pieza en el rompecabezas tridimensional. A medida que trabajaban con los modelos, advirtieron que los nucleótidos situados en cualquiera de las cadenas de la doble hélice podían acoplarse en cualquier orden o secuencia: por ejemplo, TTCAGTACATTGCCA y así sucesivamente. Dado que una molécula de ADN puede tener miles de nucleótidos de largo, es posible obtener una gran variedad de secuencias de bases diferentes y la variedad es uno de los requisitos primarios del material genético.

Se puede observar que la cadena tiene dirección: cada grupo fosfato está unido a un azúcar en la posición 5' - el quinto carbono en el anillo de azúcar- y al otro azúcar en la posición 3' -el tercer carbono en el anillo de azúcar-. Así , la cadena tiene un extremo 5' y un extremo 3' .

El descubrimiento más excitante ocurrió cuando Watson y Crick comenzaron a construir la cadena complementaria. Encontraron otra restricción interesante

e importante, no solamente las purinas no podían aparearse con las purinas, ni las pirimidinas con pirimidinas, sino que, a causa de las estructuras particulares de las bases, la adenina sólo podía aparearse con la timina, formando dos puentes de hidrógeno y la guanina solamente con la citosina, formando tres puentes de hidrógeno. Las bases apareadas eran complementarias, estos requisitos químicos explican muy bien los datos de Chargaff, (fig. 2).

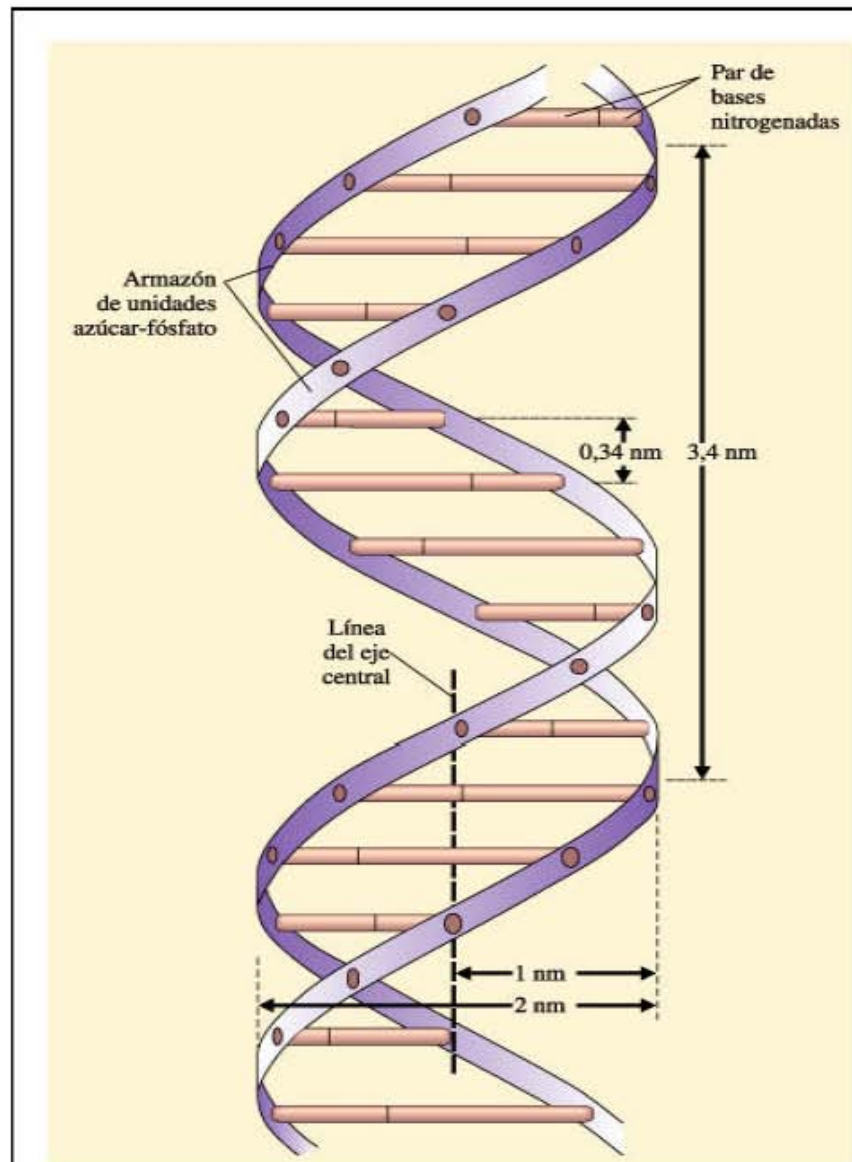


Figura 2

Figura 2 . Esquematización de la estructura del ADN, donde se observa la total correspondencia entre los datos recopilados por Watson y Crick, cabe hacer

notar las distancias que resultan del apareamiento de las bases, Adenina con la Timina y la guanina con la Citosina.

Una propiedad esencial del material genético es su capacidad para hacer copias exactas de si mismo.

En su trabajo publicado, Watson y Crick escribieron: "No escapa a nuestro conocimiento que el apareamiento específico que hemos postulado sugiere inmediatamente un posible mecanismo de copiado del material genético."¹¹

MEIOSIS Y REPRODUCCIÓN SEXUAL

La inmensa mayoría de los organismos eucariotes, como las moscas, los erizos de mar, los peces, los guisantes y los seres humanos se reproducen sexualmente. La reproducción sexual requiere en general, de dos progenitores y siempre involucra dos hechos: la fecundación (o fertilización) y la meiosis.

La fecundación es el medio por el cual las dotaciones genéticas de ambos progenitores se reúnen y forman una nueva identidad genética, la de la progenie . La meiosis es un tipo especial de división nuclear y celular que, según se cree, ha evolucionado a partir de la mitosis y utiliza en gran parte, los mismos mecanismos celulares. Sin embargo, la meiosis, difiere de la mitosis en algunos aspectos importantes .

Para comprender la meiosis, debemos examinar la estructura de los cromosomas.

Cada organismo tiene un número de cromosomas característico de su especie; contenidos en cada célula somática (del cuerpo), en estos organismos y en la mayoría de las otras plantas y animales conocidos, las células sexuales o gametos tienen exactamente la mitad del número de cromosomas que las células somáticas del organismo.

-El número de cromosomas de los gametos se conoce como número haploide (dotación simple) y el de las células somáticas, como número diploide (dotación doble).

Tabla 1. comparación del número de cromosomas en diferentes especies.

Organismo	# cromosomas
Humano	46 cromosomas
Mosquito	6 cromosomas
Una col	18 cromosomas
El maíz	20 cromosomas
El girasol	34 cromosomas
Un gato	38 cromosomas
La papa	46 cromosomas
El ciruelo	48 cromosomas
El perro	78 cromosomas
Un pececillo dorado.	94 cromosomas

La meiosis es el mecanismo por el cuál se producen los gametos o células sexuales en las gónadas de los mamíferos.

En los gametos maduros el número de cromosomas ($n = 46$) de las células somáticas (46,XX en la mujer y 46,XY en el varón) se reduce a la mitad, por lo que $n=23$, número haploide de cromosomas, en los gametos maduros con el fin de que cada gameto, (óvulo y espermatozoide), tengan un miembro de cada par de cromosomas y asegurar así que en la fecundación se restablezca el número diploide normal de cromosomas.

En la célula diploide, a el par de cromosomas se le conoce como par homólogos, los dos se asemejan en tamaño y forma y también en el tipo de información hereditaria que contienen.

La meiosis consiste en dos divisiones sucesivas, en las cuales el ADN sólo replica una vez antes de la primera división.

Profase

En la primera división meiótica o de reducción propiamente dicha, la profase es muy compleja y en ella se observan cinco fases:

1-leptotena, en donde los cromosomas se ven como filamentos, se forma el huso

2-cigotena, hay un apareamiento, los cromosomas homólogos se emparejan, se acortan , se engrosan, y forman bivalentes (parejas de cromosomas homólogos).

3-paquitena, se contraen, comienzan a formar los quiasmas, puntos en los que las cromátides no homólogas se asocian unas a otras por emparejamiento basal, es decir, se convertirán en los puntos de entrecruzamiento, entre las cromátides.

4-diotena, intercambio de material genético en los quiasmas y desaparición de la membrana nucleolar, tienen doble filamento y

5-diacinesis, se apartan formando los cromosomas recombinantes

Así, es como la meiosis compensa los efectos de la fecundación .

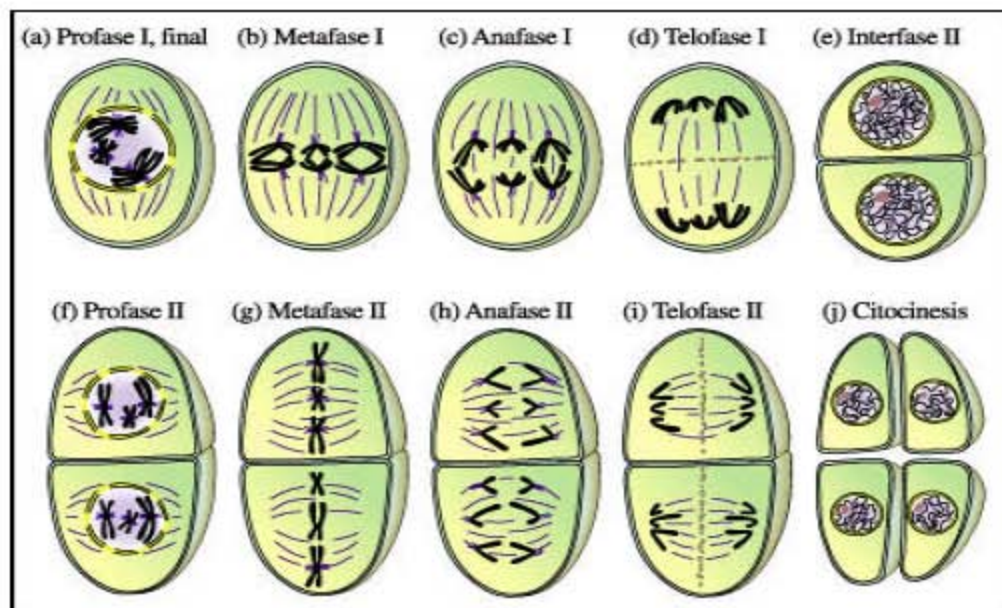


Figura 3. Se muestran las diferentes fases en que consiste el proceso de la meiosis, obsérvese la distribución de los cromosomas en los distintos estadios y que al final el resultado son cuatro células haploides ($n= 23$).

Los citólogos predijeron la existencia de la llamada "división de reducción ", antes de que fuera observada. Ellos comprendieron que sin esa división, la fecundación duplicaría el número de cromosomas en cada generación sucesiva.¹¹
27

Metafase I Los cromosomas llegan a unirse al huso de forma ordenada, observándose una placa ecuatorial, figura 3,

Anafase I.- Las cromátides no se separan y los cromosomas enteros emigran a polos opuestos del huso, de ahí el nombre de división por reducción, se observa una segregación al azar de bivalentes cromosómicos.

Telofase I.- Se forman dos células haploides genéticamente diferentes por citocinesis.

La segunda división es como la mitosis, pero esta implicado solo un número haploide de cromosomas.

Profase II

Se produce una condensación de los cromosomas y los centriolos se duplican y emigran hacia polos opuestos de la célula. Simultáneamente, se forma un huso de microtúbulos, la disolución de la membrana nuclear marca el final de la profase II.

Metafase II.- Los cromosomas llegan a adherirse al huso mitótico, la superficie de unión se denomina el cinetocoro, los cromosomas se ordenan a lo largo del huso, formando la placa ecuatorial.

Anafase II.- Separación de las cromátides.

Telofase II.- Formación de dos células haploides genéticamente diferentes.

En la meiosis hay dos procesos que son vitales para la generación de diversidad genética:

1.-Formación de los quiasmas (entrecruzamiento), lo que permite un cambio aleatorio de material genético entre cromosomas homólogos.

2.-Segregación independiente de cromosomas homólogos.

Durante la anafase I, los cromosomas homólogos son segregados independientemente uno del otro, como los humanos poseen 23 parejas de cromosomas homólogos, hay 2^{23} posibilidades de que los cromosomas puedan segregarse para formar un conjunto haploide.

En el hombre, la meiosis comienza durante la gametogenesis, en la mujer esto sucede en los ovarios, la primera división meiótica (reducción) comienza durante el 5º mes de la vida embrionaria, pero se detiene en la prometafase y se completa justo antes de la ovulación.

La meiosis II tiene lugar después de la ovulación, por lo tanto:

Hay un número fijo de oocitos y hay un periodo de detención entre el inicio de la meiosis I y el final de la meiosis II de entre 12 y 45 años de vida.

La ovogénesis produce un solo oocito y dos cuerpos polares.

La espermatogénesis del varón se produce en los túbulos seminíferos de los testículos, tras la madurez sexual la espermatogonias se multiplican continuamente por mitosis, sufriendo consecutivamente una meiosis para producir un número ilimitado de espermatozoides.

ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GÉNICA

En el núcleo de una célula normal humana hay 46 cromosomas, cada uno de los cuales tiene entre 48 y 240 millones de bases de ADN.

Según el modelo de la doble hélice de ADN de Watson y Crick, cada cromosoma tendría una longitud de contorno de 1.8 a 8.2 cm (es decir, que la longitud total del ADN estaría alrededor de los 3m), pero el núcleo promedio tiene un diámetro de aproximadamente de 5mm, por lo que es necesario un alto grado de organización para que quepa esta cantidad de ADN en el núcleo de tal forma que se haga posible la replicación y la transcripción, funciones importantes del ADN. El empaquetado del ADN puede describirse en tres niveles:

- Nucleosomas: El primer nivel de la organización del ADN se logra con la formación del nucleosomas en el que el ADN se envuelve alrededor de complejos proteicos denominados partículas centrales del nucleosoma.
- Cromatina: La cromatina es al complejo de ADN oARN y proteínas, formado en el núcleo de los eucariotes, las histonas H1 se unen al ADN mientras se va enrollando alrededor de la partícula central y también a otras H1 para permitir que el ADN alcance su segundo nivel de organización.
- Histonas: Las histonas son proteínas cargadas positivamente y por lo tanto pueden formar enlaces iónicos con los grupos fosfato negativos en los ácidos nucleicos, el octámero $(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$ es capaz de autoensamblarse en las condiciones correctas y en la presencia de las dos moléculas siguientes:

-Nucleospamina, una proteína ácida que permite que las histonas y el ADN se junten de forma controlada.

-ADN-topoisomerasa I, una enzima que ayuda al ADN a la formación de la superhélice.

Formación del bucle

El tercer nivel de organización es la formación del bucle en el que el ADN forma asas que irradian desde un andamiaje central de proteínas; se cree que estas asas forman unidades de transcripción.

PROPIEDADES DEL CÓDIGO GENÉTICO²⁷

Redundancia: como hay 64 codones y sólo 20 aminoácidos utilizados habitualmente en la síntesis de polipéptidos, una gran proporción de los codones pueden considerarse redundantes.

Degeneración: El código genético está degenerado, lo que significa que cada aminoácido está codificado por más de un codón, esto reduce la cantidad de redundancia.

La degeneración del código se acoge a la hipótesis del -bamboleo- a veces se produce emparejamiento de bases no Watson-Crick entre el codón y la tercera base del anticodón de ARNt, esto ocurre con más frecuencia cuando se modifica la tercera base por alteración de las interacciones entre bases.

El código no se superpone.

Universalidad: Se observa el mismo código genético en casi todos los organismos vivos.

Los codones de parada o tripletes sin sentido, marcan el final de un polipéptido, indican al ribosoma que debe parar la síntesis de la proteína.

Cromosomas

Durante la división celular, la cromatina se condensa para formar organelos en forma de bastón llamadas cromosomas, que se tiñen con colorantes biológicos como el Giemsa (bandas G).

Cada cromosoma corresponde a una cadena única de cromatina, en la metafase se encuentran densamente empaquetados y, después de su tinción, pueden verse fácilmente con el microscopio óptico.

Cada cromosoma está compuesto por dos cadenas idénticas de ADN llamadas cromátides hermanas, que están conectadas en una región central denominada centrómero, figura 4, por encima y por debajo del cuál las cadenas de cromatina forman bucles enrollándose entre las cromátides hasta mantenerlas juntas.

El cinetocoro es una organela situada en la región del centrómero, actúa como centro de organización de los microtúbulos, y facilita la formación del huso por polimerización de los dímeros de tubulina que forman los microtúbulos durante los estadios iniciales de la mitosis.

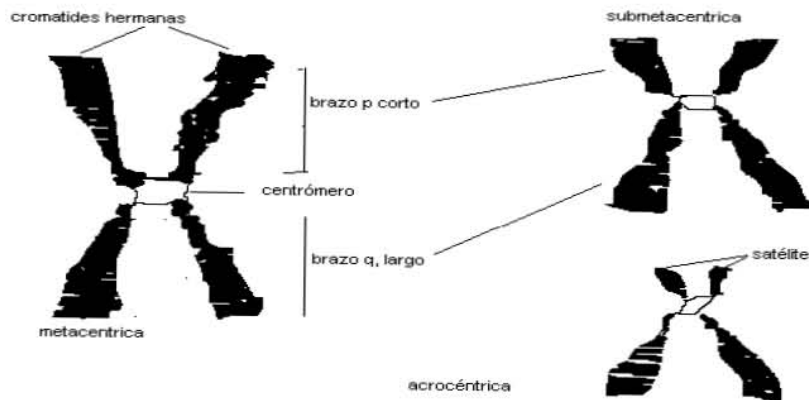


Figura 4, Anatomía de un cromosoma, donde se muestran las tres formas: metacéntrica, centrómero aproximadamente en el centro y brazos de longitud similar; submetacéntrica, brazo p claramente más corto que el brazo q; y acrocéntrica, centrómero cerca de un extremo, además satélite adherido al brazo p, este brazo contiene genes de ARNr

Estructura de los genes

Un gen es un nucleótido que codifica una secuencia que trae como consecuencia la producción de ARNm funcional y de un polipéptido.

La hipótesis -un gen, un polipéptido- establece que la secuencia de bases del ADN determina la secuencia de aminoácidos en el polipéptido correspondiente.

El concepto de gen ha ido variando con el tiempo, y a medida que se ha ido ampliando el conocimiento acerca de la estructura de los genes, resulta cada vez más complicado hacer una definición molecular de aplicación general. Inicialmente, un gen era un concepto abstracto que correspondía a una unidad de información heredada.

El concepto posterior de gen como segmento de ADN que codifica una proteína, aunque correcto, es incompleto, ya que existen genes que codifican moléculas de ARN (como los ARNr o ARNt), pero no polipéptidos; si bien esos ARN son básicos para la síntesis de las proteínas celulares.

La constatación a fines de los 70s de que los genes de los eucariotas no eran necesariamente un segmento único y continuo de ADN como en los procariotas, (sino que más bien la región codificadora de ADN es discontinua, por la

interrupción de segmentos de ADN no codificador) esto vino a poner de manifiesto las claras diferencias existentes entre la estructura de los genes de procariotes y los de eucariotes.

El gen comprende pues toda la región transcrita (unidad de transcripción), que incluye las secuencias codificadoras contenidas en los exones, todos los intrones, además de las regiones limitantes 5' y 3', de la zona codificadora que forma parte del primer y último exón respectivamente.

Las regiones reguladoras, tanto las próximas a la región transcrita como las situadas a miles de pares de bases (como las secuencias de intensificación), también pueden considerarse partes integrantes del gen.

Por lo tanto, los genes de eucariotas se forman por una serie de secuencias codificadoras denominadas exones, separadas por un conjunto de segmentos no codificadores llamados intrones.

Intrones y Exónes

Los exones son las secuencias expresadas (aquellas, que codifican los aminoácidos), y los intrones son las secuencias de intervención no codificadoras, además los intrones son:

Raros en los genes procariotas

Poco frecuentes en los eucariotas inferiores, como las levaduras.

Abundantes en los eucariotas superiores, los intrones rara vez faltan en los genes estructurales de los vertebrados.

La región del promotor esta situada en el ADN, inmediatamente antes de un gen, estudios de análisis de secuencia han revelado secuencias - de consenso - en los procariotas y en los eucariotas, que son vitales para la función del promotor.

El tamaño de los genes de procariotas es menor que el de genes eucariotas; un gen de procariota en promedio tiene una longitud aproximada de una kilobase, mientras que en los eucariotas sólo los genes mas pequeños y que no contienen intrones (por ejemplo interferones alfa y beta o histonas tienen ese tamaño).

En su mayor parte, los genes de los mamíferos son fragmentados, siendo el número de intrones por gen, así como su longitud muy variable.

En algunos genes humanos el número de intrones es muy bajo (dos intrones en los genes de las globinas o cuatro en el gen de la eritropoyetina), mientras que otros poseen un gran número de intrones, como el gen del factor VIII de la coagulación con 25, la tiroglobulina mas de 40 y la distrofina mas de 60.

La longitud de intrones y exones es variable, pero en general, la longitud de ADN de los intrones de un gen es mayor que la de los exones, pudiendo ser en algunos genes hasta cien veces mayor; los exones son por lo tanto, más cortos que los intrones, aunque en algunos casos tienen una longitud considerable, el exón humano más largo pertenece al gen de la apolipoproteína B-100, que tiene alrededor de 7500 pares de bases.

CLASIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DEL ADN HUMANO²⁶

El genoma humano, constituido por 3000 megabases (3×10^9 bases), posee una estructura compleja, que además de las secuencias de bases que codifican genes estructurales de ARN (ARNr y ARNt) y las que codifican proteínas tiene numerosos segmentos con otras significaciones, que constituyen alrededor del 90% del ADN total. Las secuencias del genoma humano pueden clasificarse por su grado de repetición o por su significado funcional: ADN codificante y ADN no codificante, ver tabla 2.

ADN no codificador

Una característica enigmática de los cromosomas de eucariotas es la existencia en ellos de secuencias no codificadoras repetidas miles o millones de veces, y cuya función es prácticamente desconocida. Estas secuencias pueden dar lugar a bandas satélites del ADN principal, cuando se somete el ADN celular a centrifugación en cloruro de cesio, por lo que estas secuencias altamente repetidas se conocen también como ADN satélite.

Muchas de las secuencias repetidas son segmentos generalmente cortos que se disponen a manera de tándem y se repiten miles de veces.

Estas repeticiones se localizan tanto en los centrómeros como en los telómeros de los cromosomas.

En el hombre, se repiten una secuencia de aproximadamente 170 pares de bases (satélites alfa) en las zonas centroméricas, llegando este ADN a representar el 5% del total de ADN humano. En los telómeros, existen secuencias cortas repetidas, que son también características de cada especie.

En el genoma humano, es posible hallar secuencias repetidas en tandem diferentes a las existentes en los centrómeros y telómeros, y a las comentadas de los genes de los ARNr.

Tabla 2, Clasificación funcional de las secuencias del ADN humano.

Codificantes	De elementos propios	ARNr, ARNt, Proteínas
	De elementos accesorios	Retroposones, Transposones
No codificantes	De función estructural	ADN satélites y teloméricos
	De función reguladora	Promotores, estimuladores, etc.
	De función desconocida	ADN intergénico (mayoría)

ADN repetitivo

De acuerdo con los datos obtenidos, primero por las curvas de renaturalización y luego por secuenciación, las secuencias de bases se pueden clasificar en tres grandes grupos: de alto grado de repetición, de moderado grado de repetición y secuencias únicas, ver tabla 3.

En las células eucarióticas, sólo el 5% del ADN codifica para proteínas o constituye los genes, el resto no codifica.

El 50% del genoma no codifica para proteínas y se compone de secuencias repetidas del ADN, incluyendo las repeticiones de secuencias simples (SSR), que componen el 3% del genoma humano. En promedio existe una SSR cada 2 kilobases (kb) en el genoma humano.¹³ Este ADN consiste en repeticiones idénticas, una seguida de otras, son secuencias específicas del ADN de tamaño variable, como (A)_n, (CA)_n o (CGG)_n, e incluye los minisatélites (VNTR) y los microsatélites (STR, MLPs), que se encuentran en la eucromatina y son muy polimórficos en la población .

Tabla 3, Tipos de secuencias del genoma humano de acuerdo con su grado de repetición.²⁶

Tipo	Denominación	Características
De alta repetición	ADN satélites	10 ⁶ copias: alfoide(centromeros 171 pb DYZ1, DYZ2, heterocromátina Y Satélite beta (unidad = 68 pb)
De moderada repetición	Retroposones	LINEs, SINEs, pseudogenes procesados, 10-10 ⁴ copias o mas
	Transposones	Transposon THE humano, 10-10 ² copias
	Familias génicas	ARN _{18s} , ARNr _{28s} , ARNt, etc., 10 ² copias
	ADN telomérico	(TTAGGG) _n , 10 ⁴ copias
	ADN minisatélite	Muy polimórfico, 10 ² - 10 ³ copias
	ADN microsatélite	(CA) _n , (TG) _n , 10 ⁵ copias, muy polimórfico
De secuencia única	Genes de proteína	Copia única, estructura génica
	ADN intergénico no repetido	Función desconocida

ADN mitocondrial

La mitocondria tiene su propio ADN que es diferente al resto de la célula; El ADN de la mitocondria humana consta de 16 569 pares de bases de ADN circular, codifica lo siguiente:

- 22 tipos de ARNt mitocondrial (mt).
- Dos tipos de ARNr mt.
- 13 proteínas sintetizadas por la propia maquinaria de síntesis proteica de la mitocondria, todas ellas son subunidades de la vía de la fosforilación oxidativa.

El código del ADN mitocondrial es mas sencillo y más degenerado, probablemente porque, debido a su menor tamaño, puede permitirse una mayor tolerancia en los cambios que en el ADN nuclear.²⁷

VARIACIÓN HEREDITARIA Y POLIMORFISMO DE ADN POLIMORFISMO DE LONGITUDES DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (PLFR), Restriction Fragment of Length Polimorphism (RFLP):

Los RFLP, son el resultado de dividir artificialmente al ADN en trozos o fragmentos para posteriormente poder estudiarlo en el laboratorio. Conocemos que el ADN humano esta compuesto por miles de millones de pares de bases y dividido a su vez en cadenas de cientos de millones de pares de bases que conforman los cromosomas; un ADN así estructurado es imposible de analizar, por que es muy grande para ser manejado en un laboratorio, además de ser poco informativo, por ello se procede a cortarlo en trozos mas cortos, lo cual se hace utilizando unas enzimas de restricción o restrictazas tipo II, que son unidades biológicamente activas que poseen todos los seres vivos. Después de cortar específicamente en determinada secuencia de bases, lo que antes era una cadena aparece después como múltiples trozos de ADN de longitud desigual; así, por ejemplo, la enzima (HinfI) de *Haemophilus influenzae*, corta el ADN cada vez que encuentra una secuencia formada por G-A-N-T-C, siendo N, cualquier nucleótido (A, G, C, ó T).

Las diferencias entre personas, tiene su origen en la existencia de variabilidad en las zonas de corte de las enzimas, debido a variaciones ocurridas a lo largo del tiempo sea por mutaciones, inserciones (inclusiones) o deleciones (pérdidas) de ADN, y esto se refleja en la longitud de los fragmentos producidos.

Dado que la mayor parte del genoma humano no codifica proteínas, en los seres humanos se acepta una gran cantidad de variaciones de secuencias, y de hecho, se ha estimado que pueden detectar diferencias de nucleótidos entre individuos mas o menos cada 200 nucleótidos. Estas variaciones de la secuencia de ADN, denominados polimorfismos de ADN, pueden crear o destruir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.^{3, 21}

En consecuencia, el patrón de longitudes de fragmentos de restricción provenientes de una región del genoma puede diferir entre cromosomas homólogos y entre individuos.

La pérdida de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción, por inserción o deleción, dará como resultado la aparición de un fragmento mas grande, por la desaparición de este sitio.

La formación de un nuevo sitio de reconocimiento para la enzima de restricción, dará como resultado la pérdida de un fragmento mas grande y la aparición de dos fragmentos de ADN mas pequeños.

Estas modificaciones de la estructura del ADN se utilizan como marcadores moleculares.

En un análisis de RFLP del ADN de ocho hijos, sus progenitores y sus abuelos, donde se detectó, la existencia de tres alelos de una región de presencia conocida sobre el cromosoma 5.

Las muestras de ADN se cortaron con la enzima de restricción taqI y se analizaron mediante el procedimiento Southern blot. En esta familia, esta región existe en tres formas alélicas caracterizadas por los sitios taqI espaciados por 10, 7.7 o 6.5 kb. Cada individuo tiene dos alelos, algunos contienen el alelo 2 (7.7kb) sobre ambos cromosomas, y otros son heterocigotos en este sitio.²¹

Tras el análisis de esta secuencia de pasos, el término -polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción- se explica por sí mismo: son los polimorfismos determinados por la variación en la longitud de los fragmentos de restricción, es decir, los RFLP son el resultado de las variaciones de la secuencia del ADN en los sitios específicos de restricción; Estos producen variaciones en la longitud de los fragmentos de ADN, que se ordenan mediante electroforesis y se visualizan con el empleo de sondas marcadas, expuestas a una película de rayos X, que se oscurece en la posición de la sonda, por que esta emite partículas radiactivas, estas posiciones oscurecidas se denominan bandas, y la película se denomina autorradiografía.

NUMERO VARIABLE DE REPETICIONES EN TANDEM (NVRT), Variable Number of Tandem Repeats (VNRT):

Los minisatélites también conocidos como secuencias repetidas en tándem de número variable (VNTR) en el ADN no codificante. Existen secuencias de nucleótidos de una longitud determinada, se componen de secuencias repetidas de, 14 a 500 pb, unas detrás de otras en tandem o cadena que constituyen segmentos variables del ADN de 0.3 a 50 Kb.

Se ha estimado que existen más de 5000 loci tipo VNTR en el genoma humano, de los cuales sólo se han caracterizado algunos de ellos.

La variabilidad genética aquí establecida es el número de repeticiones en una determinada región, que varía sustancialmente entre un individuo y otro (de ahí el término de variabilidad del número de repeticiones en tándem).²⁵

La variedad interpersonal se encuentra en estos VNTR, ya que en una región o locus determinado de ADN, una persona puede tener 8 repeticiones en tandem

de un fragmento de 5 pares de bases, mientras que otra persona tiene 7 repeticiones en tándem.

Las VNTR se detectan mediante un planteamiento similar al usado para los RFLP, el ADN se digiere con una enzima de restricción y los fragmentos se someten a electroforesis, desnaturalización y transferencia a un medio sólido. La diferencia fundamental, es que, las sondas especiales se utilizan sólo para hibridar una determinada región minisatélite.

Así los VNTR, pronunciado "vinters", también llamados repeticiones cortas en tandem, estos al igual que los RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, son similares, ya que son fragmentos de diferentes longitudes; la diferencia está, en que los RFLP tienen un grado de mutación en los sitios de restricción de la actividad de la enzima sobre la molécula de ADN, y los VNTRs se designan a partir del número de repeticiones de los pares de bases en una secuencia entre dos puntos en la molécula del ADN.

El patrón de los VNTR y los RFLP establece la base para la investigación de la huella dactilar genética, que es única para cada individuo.¹⁹

Los VNTR son el resultado de la herencia, de igual forma no se distribuyen a través de las diferentes poblaciones con la misma frecuencia y estabilidad.

Hasta ahora no existe suficiente conocimiento acerca de la frecuencia y distribución entre grupos étnicos y tampoco la composición heterogénea entre individuos de diferentes razas que están en continuo crecimiento, por lo tanto las futuras investigaciones están encaminadas hacia esta área.⁷

En cuanto a la eficacia de la prueba para discriminar a sospechosos culpables o inocentes la combinación de diferentes marcadores proporciona una gran precisión indiscutible en la práctica.

Las nuevas técnicas de biología molecular tienen gran futuro en todas las áreas de la medicina, presentándose antes del siglo XXI la más importante revolución médica; los diagnósticos serán mas precisos, el tratamiento mejorará, se empleara mucho mas la profilaxia y, particularmente dentro de la medicina forense, se tendrán bases mas sólidas con la finalidad de mejorar la impartición de la justicia.⁷

Un tipo de secuencia repetida se caracteriza porque el número de unidades que se repite es variable (entre 3 y 20).

Algunos segmentos en tándem (VNTR) o número variable de repeticiones en tandem, son sitios hipervariables de los que existe un gran número de alelos diferentes, por lo que la longitud de los fragmentos obtenidos tras digerir con

una endonucleasa de restricción que corte por las secuencias colindantes a las repeticiones será generalmente distinta en individuos diferentes ..

ADN MICROSATELITE

REPETICIONES CORTAS EN TANDEM (RCT), SHORT TANDEM REPEATS (STR):

Los microsatélites, también denominados secuencias cortas de repetición en tándem (STR), son repeticiones extremadamente cortas, por ejemplo, en el genoma humano encontramos la secuencia $-(CA)_n-$, donde n puede variar con secuencias repetidas de 1 a 3 pb, formando fragmentos de alrededor de 100 a 300 pb, los cuales pueden estar repetidos unas 100 000 posiciones diferentes en todo el genoma, esto nos da una diferencia importante con los VNTR, además, por no estar definidas por los sitios de restricción que flanquean la región repetitiva, para su aislamiento se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa.

Este análisis de polimorfismos de gran interés con aplicación a la medicina legal y forense es lo que nos interesa.

La mayoría de los marcadores microsatélites comunicados son de la clase dinucleótida, los cuales componen 0.5% del genoma humano, y lo más frecuente son AC y AT, 50 y 35% de los dinucleótidos respectivamente.

Los microsatélites de las clase tetranucleotídica son más polimórficos y más estables que los dinucleótidos y están presentes cada 300 a 500 pb en el genoma humano.

Como ya se señaló, los microsatélites son muy útiles, para el mapeo genético, son mas abundantes que los VNTR, tienen una distribución mas uniforme en el genoma y son mas fáciles de analizar en el laboratorio.

POLIMORFISMOS DE NUCLEOTIDO UNICO (PNU) SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORPHISMS (SNP):

Algunas personas presentan una base diferente en una posición determinada del cromosoma, son fragmentos que van de los 40 a 180 pares de bases, se localizan fuera de regiones codificantes, distancias de al menos 50 Mbp entre ellos, están presentes en 20 de los 22 cromosomas y en muestras muy degradadas.

Estas pruebas tienen aplicaciones en el análisis de identidad incluyendo casos forenses y pruebas de paternidad.

El análisis se puede realizar en cromosomas autosómicos, cromosoma Y ó mitocondrial.

Los genes y el ADN repetido están localizados en posiciones (loci) particulares de los cromosomas y muchos de ellos pueden existir en formas variables llamados alelos. La mayor parte de los genes (en especial los exones) no son muy variables entre los individuos de una población con excepción de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (HLA). Por ejemplo, el gen que codifica para la hormona insulina, no es muy variable, ya que su función es muy importante en todos los individuos.

El ADN de mamíferos posee además otras familias muy numerosas de secuencias repetidas, cuyos miembros están esparcidos a lo largo del genoma, llegando a veces hasta un millón de copias. Estas secuencias repetidas y dispersas se denominan SINE (repeticiones intercaladas cortas) si su longitud esta entre 100 y 500 pares de bases, o LINE (secuencias intercaladas largas) si su tamaño es de varias kilobases.

En los seres humanos ,se encuentra un tipo de secuencia SINE característica, denominada *Alu* , de gran interés aplicado , existiendo un promedio de una secuencia *Alu* por cada 5Kb de ADN con un total de 1 millón de copias por genoma.²⁶

EL ANÁLISIS DE ADN

El análisis de identificación mediante la huella digital del ADN se basa en la caracterización de regiones variables o polimórficas del material genético de los individuos. Estas regiones son de tres tipos:

- loci de variación en las secuencia
- microsatélites y
- minisatélites.

En los loci de variación de secuencia, hay poco polimorfismo y se presenta por el cambio de uno o varios nucleótidos en la secuencia del ADN, generalmente en los exones o regiones de regulación de la expresión génica.

En los loci minisatélites y microsatélites el polimorfismo se presenta por la variación en el número de repeticiones en tándem de las secuencias de minisatélites o microsatélites.

Los loci de variación de secuencia son poco polimórficos; en los que sólo varía un nucleótido, a lo más existirán cuatro alelos diferentes en la población.

Un ejemplo sencillo es el siguiente: alelo 1 (ATGCGTACGG), alelo 2 (ATTCGTACGG), alelo 3 (ATCCGTACGG), y alelo 4 (ATACGTACGG).

En cambio, los loci de variación en el número de secuencias repetidas son muy polimórficos:

los loci microsatélites son medianamente polimórficos y pueden tener hasta 30 alelos .

Los loci de tipo VNTR son los más polimórficos, y en ocasiones pueden tener hasta 5000 alelos diferentes, por ejemplo, en el locus MS1 la secuencia (GGCTGGGCATATGCTG) puede estar repetida 30 veces en un individuo, 40 veces en otro y 5000 veces en otro.¹³

Los alelos polimórficos se heredan de acuerdo con las leyes mendelianas de la genética clásica. Por tanto, las frecuencias genotípicas o haplotípicas (conjunto alélico de un individuo) pueden ser establecidas y abordadas estadísticamente de acuerdo a la frecuencia alélica de una población.

Los marcadores genéticos útiles en la identificación de individuos deben tener un gran poder de discriminación o capacidad de distinguir entre dos individuos (variación genotípica).

Entre más alelos tenga un marcador genético (mayor polimorfismo) y más uniforme sea su distribución entre la población (mayor heterogocidad), mayor será su poder de discriminación.¹³

ANÁLISIS DEL ADN EN LA IDENTIFICACIÓN DE INDIVIDUOS

Una serie de pruebas biológicas destinadas a realizar la identificación de uno de los progenitores, requiere del estudio del otro y del hijo cuestionado. Esto implica que la investigación puede ir dirigida a aclarar la paternidad o la maternidad.

La tecnología del ADN recombinante en la identificación de individuos en casos de medicina forense y de parentesco biológico, es una de las aplicaciones más exitosas y espectaculares de esa tecnología en el diagnóstico médico. El análisis del ADN se utiliza para identificar a individuos en forma rutinaria en los países desarrollados y se está incrementando cada vez más en los países en vías de desarrollo.

La aplicación forense de los métodos de tipificación del ADN durante los últimos 15 años, ha representado el mayor avance en la evaluación de indicios o evidencias biológicas. Con su notable sensibilidad y enorme poder de discriminación, el análisis de ADN se ha convertido en un apoyo importante en la investigación científica de hechos delictivos en el campo de la actividad pericial, descartando de manera casi inmediata al individuo falsamente acusado

y señalando con certeza prácticamente absoluta al probable responsable como fuente biológica de la evidencia.¹⁵

La especificidad de esta tecnología, que en conjunto se conoce como huella digital del ADN (del inglés, *fingerprinting*), ha sido la clave del éxito que ha alcanzado la identificación de individuos. Otros factores que han favorecido los análisis del ADN, son el hecho de que cualquier tejido puede ser útil para el análisis del material genético, en el caso de muestras pequeñas, existe la posibilidad de replicar el ADN millones de veces en la mesa del laboratorio y la estabilidad del mismo es confiable.¹³

La genética forense es considerada como una especialidad de las ciencias forenses, que se basa en el estudio de la transmisión de caracteres hereditarios y el análisis de la variabilidad genética humana aplicada a la resolución de problemas judiciales; precisa con alto grado de certeza la relación biológica entre dos personas, como en los casos de paternidad, o bien, entre la evidencia biológica encontrada en el lugar de los hechos y los probables responsables.¹⁵

HOMOGENÉTICA FORENSE

Debido a la imposibilidad de analizar todos los marcadores genéticos, es importante emplear para este fin aquellos sistemas genéticos que sean de mayor utilidad para decidir o excluir la paternidad.¹⁶

Para su estudio se agrupa de la siguiente manera:

1.-Nivel citogénético: análisis estructural de los cromosomas, que resulta complejo por sus limitaciones y es costoso.

2.-Nivel genético molecular: análisis de los productos de expresión génica, hasta hace relativamente poco tiempo era el nivel más avanzado. Estos marcadores genéticos convencionales pueden ser utilizados incluyendo antígenos eritrocitarios, antígenos HLA, enzimas eritrocitarias y leucocitarias, proteínas y enzimas séricas, con locus génico perfectamente bien ubicado, y herencia establecida.

Sus frecuencias genéticas tienen que estar determinadas en la población donde se aplican y han de poder ser analizadas en cualquier laboratorio certificado para permitir la contrapericia.

En ésta se requieren precauciones oportunas respecto a la edad en los marcadores que pueden sufrir modificaciones por este hecho.

3.-Nivel génico o molecular: estudio de los caracteres heredables o genético moleculares, para este estudio se consideran los siguientes Caracteres genético moleculares:

- Antígenos eritrocitarios, sistemas: ABO, Rh, MNSs, Kell-Cellano, Lutheran, Duffy, Kid.
- Enzimas eritrocitarias: fosfoglutonato deshidrogenasa.
- Antígenos leucocitarios, sistema HLA.
- Enzimas leucocitarias: fosfoglucomutasa.
- Proteínas leucocitarias: fosfoglucomutasa locus III
- Proteínas enzimáticas: transferrina. Amilasa

Estos caracteres heredables han de cumplir una serie de condiciones para aplicarlos al diagnóstico de la paternidad.

TÉCNICAS USADAS EN EL ANÁLISIS DE ADN⁴

La biología molecular, en sus diversas facetas, dispone de diferentes técnicas de estudio, las cuales tienen a su vez diversas variaciones.

Pese a que continuamente se describen nuevos procesos; en el ámbito forense son tres las técnicas de estudio que se usan de forma rutinaria en los laboratorios para analizar el ADN:

- a.- análisis de los Fragmentos RFLP por técnicas de southern-blotthing,
- b.-amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR)
- c.-secuenciación del ADN mitocondrial.⁴

Un análisis completo de ADN requiere del siguiente procedimiento:

- 1.-Extracción del ADN
- 2.-Cuantificación del ADN extraído
- 3.-Estudio de las regiones hipervariables por:
 - a -Hibridación y Southern-blothing de RFLP
 - b-Amplificación por PCR
 - c-Secuenciación de ADN mitocondrial, ADNmt.

1.-Extracción del ADN

El ADN se encuentra en el interior de los núcleos celulares. El primer paso para proceder a analizarlo es extraerlo de esa doble capa protectora la membrana celular y nuclear.

Las muestras forenses se caracterizan por ser totalmente diferentes a todas las demás, pero quizás lo más definitorio sea que en muchos casos son muy pequeñas, antiguas, contaminadas e irrepetibles, características negativas que dificultan el análisis para su identificación.

Existen diversos procedimientos de extracción que deben cumplir con la doble función de extraer y purificar el ADN. Dos de los métodos más usados son:

a.- Extracción orgánica: compuesta básicamente por una mezcla de fenol y cloroformo con alcohol isoamílico y posterior precipitación del material genético con etanol o por filtración con unos microfiltros del tipo Centricon^R o Microcon^R.

b.- Extracción con Chelex: El chelex es una resina iónica captadora de iones, muy útil en ciencia forense porque en concentraciones del 5%, es capaz de depurar lo suficiente la mayor parte de las muestras, dejándolas preparadas para su estudio posterior, especialmente en casos de ampliación por PCR. Este método resulta más rápido y sencillo, que necesita de menos tiempo y de pocos reactivos, menos contaminantes y tóxicos.

Las sustancias contaminantes, químicos o biológicos, pueden interferir con la acción de diversas enzimas, como las restrictoras o polimerasas, afectando de manera importante los estudios.

En criminalística, el proceso de extracción es el paso más importante al analizar cualquier tipo de muestra, especialmente cuando se manejan indicios criminales que por su naturaleza, pueden estar contaminados y/o degradados y, ante todo, porque siempre son únicos e irrepetibles.

2.-Cuantificación del ADN

Una vez que se consigue extraer el ADN, en mayor o menor cantidad, antes de analizarlo con cualquier técnica de las mencionadas, es necesario conocer la cantidad de ADN que se tiene y si se puede, cuál es la calidad del mismo.

En el polimorfismo de los loci tipo VNTR, la utilización de marcadores genéticos de un tipo o de otro depende más bien de la cantidad y grado de integridad del ADN extraído y del tipo de problema en estudio. Por ejemplo para el sistema de los minisatélites se requiere cuando menos 1 mg de ADN de

gran tamaño molecular y no se puede utilizar en muestras con ADN degradado. Aquellos casos donde no sea factible recolectar suficiente muestra biológica, 0.5mL o más de sangre, no se puede utilizar el sistema de los minisatélites por lo que se utilizan marcadores microsatélites.¹³

3.-Estudio de las regiones hipervariables

a.-Técnicas de Southern-blotting e hibridación: análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica, RFLP.

Esta técnica analítica permitió en el bienio 1984-1985, la entrada de la biología molecular en el campo de la identificación humana, en un proceso que se dio en llamar por su creador, Alec J. Jeffrey -huella dactilar genética- (genetic fingerprint).

Por medio de la misma se pueden detectar en los indicios biológicos aquellas regiones, fragmentos o trozos de ADN compuestos por un número variable de repeticiones en tandem o VNRT, que siendo comunes a todas las personas, varían mucho de persona a persona.

De ahí el uso del término -huella dactilar genética-, todas las personas tienen huellas dactilares pero, analizadas con detalle, nadie tiene dos huellas iguales. Igual ocurre con los RFLP que hay dispersos en el ADN humano: todas las personas tienen RFLP, ninguna persona tiene todos sus RFLP idénticos a los de otra.

Desarrollada por E. M. Southern, al que debe su nombre (Southern blot). Es una técnica simple y fácil de realizar que detecta los fragmentos de ADN separados por tamaño mediante electroforesis en gel.

Combina la separación electroforética del ADN con su transferencia a un soporte sólido o "filtro"(nylon o nitrocelulosa) para su hibridación. Tanto ésta como la posterior detección se realizan de forma más eficaz en el filtro de lo que se haría en el gel.

Esta técnica ha contribuido de forma notable a aumentar la potencialidad de la hibridación como herramienta analítica, constituyendo hoy día en bioquímica clínica el método habitual de análisis del ADN extraído de muestras de sangre, esputos, tejido y células.

Metodológicamente, implica cinco etapas bien diferenciadas:

- 1.-separación electroforética
- 2.-desnaturalización
- 3.-transferencia

- 4.-hibridación y
- 5.-detección.

Para aplicar esta técnica se necesita extraer el ADN del interior del núcleo celular, fragmentarlo en trozos, llamados RFLP, y detectar los trozos que nos interesan por un proceso de hibridación con sondas complementarias específicas. El proceso analítico se compone por las fases de restricción, separación electroforética, Southern-blotting e hibridación. Cuando la extracción de ADN es completa, se procede a dividirlo en una primera fase, en un proceso denominado restricción.

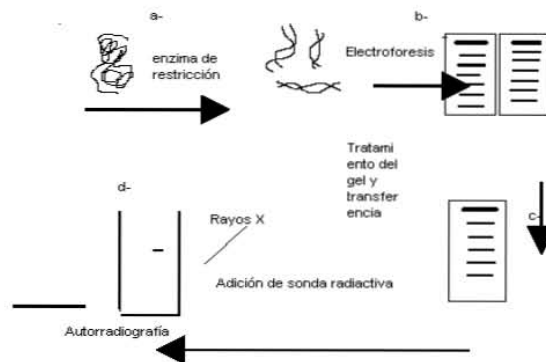


Figura 5. esquematización de la técnica de Southern blotting

La técnica de transferencia de Souther blotting , figura 5, consiste en que el ADN cromosómico se fragmenta con una enzima de restricción.

Los fragmentos se separan mediante electroforesis, el gel electroforético es transferido a un filtro especial; El filtro contendrá así, una réplica de los fragmentos que estaban en el gel, luego los fragmentos de ADN que se encuentran sobre el filtro se desnaturalizan y se fijan a él.

El filtro se incuba con una sonda radiactiva que revelara la localización de los fragmentos que contienen una secuencia complementaria a la sonda, después de la incubación, el filtro se lava para eliminar toda la sonda que no hibridó.

La localización de la radiación en el filtro muestra la ubicación de los fragmentos de interés en el gel electroforético original, una vez que han sido localizadas las ubicaciones de los fragmentos estos se pueden purificar a

partir del gel electroforético y utilizarse para estudios o manipulaciones ulteriores.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción se llaman también nucleasas de restricción, endonucleasas de restricción, y en ocasiones, enzimas restrictivas o restrictazas. Pertenecen a este grupo una gran diversidad de endodesoxirribonucleasas, descubiertas como enzimas propias de distintas bacterias y caracterizadas en los años 70s.

Se dispone hoy comercialmente de un gran número de ellas con elevada especificidad, estabilidad y pureza.

Se nombran con tres letras tomadas del género y especie de la bacteria de la que se aislaron originalmente, seguidas a veces por una letra más, que identifica el serotipo (variante antigénica de la bacteria), finalmente por un número romano que las identifica en el caso de que una misma variante se hayan encontrado varias enzimas con distinta especificidad.

Algunos ejemplos de estas enzimas así como la bacteria de donde se obtiene se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos del origen bacteriano de algunas enzimas de restricción, se denominan con tres letras tomadas del género y de la especie de bacteria otra letra mas para identificar el serotipo, para mas explicación ver texto.

Bacteria de origen:	Enzima de restricción
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III
<i>Escherichia coli</i>	Eco RI cepa RY13
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bam HI cepa H

Acción de las enzimas de restricción de tipo II

Son estas las restrictazas estructuralmente mas simples y las mejor estudiadas por su utilidad en ingeniería genética, a modo de tijeras para el corte del ADN.

El sitio de restricción es a la vez lugar de reconocimiento y de hidrólisis. Se hidrolizan de forma muy específica enlaces fosfodiester del ADN, una en cada hebra, generándose dos fragmentos de restricción.

El enlace hidrolizado es siempre el 3'-P (son endonucleasas del tipo a), por lo que el fosfato queda unido a 5', dejando en ambos fragmentos extremos 3'-OH y 5'-P. La reacción no necesita ATP, lo que la diferencia de la catalizada por las enzimas de tipo I.

El mecanismo de acción por tres enzimas de restricción ampliamente utilizadas, fig. 6, donde se muestran las secuencias de nucleótidos de ADN reconocidas por tres enzimas de restricción, a- HpaI (*Haemophilus parainfluenzae*), b- EcoRI (*Escherichia coli*), c- Hindi (*Haemophilus influenzae*); las secuencias de reconocimiento frecuentemente tienen 6 pares de bases de longitud, algunas enzimas como EcoRI y Hindi, escinden el ADN dando como resultado extremos "pegajosos".

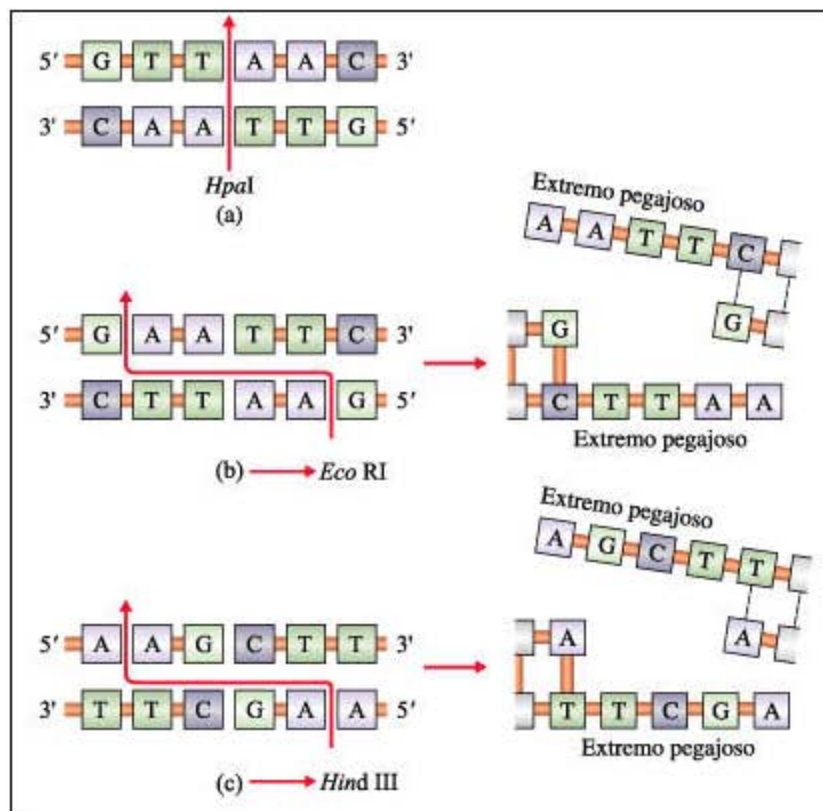


Figura 6. Mecanismo de acción por tres enzimas de restricción ampliamente utilizadas, se muestran las secuencias de nucleótidos de ADN reconocidas por tres enzimas de restricción, a- HpaI (*Haemophilus parainfluenzae*), b- EcoRI (*Escherichia coli*), c- Hindi (*Haemophilus influenzae*).

Tabla 5. Ejemplos de algunos fragmentos reconocidos por las enzimas de restricción tipo II; G, guanina; C, citosina; T, timina; A, adenina, (/) da el punto de corte en la cadena de ADN.

Nombre de La enzima	Bacteria origen	Secuencia reconocida y puntos de corte (/)
ACC 651	<i>Acinetobacter calcoaceticus 65</i>	-G/G-T-A-A-C-
ALU I	<i>Arthrobacter luteus</i>	-A-G/C-T-__
BAM HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	-G/G-A-T-C-C-
BqI II	<i>Bacillus globigii</i>	-A/G-A-T-C-T
Eco RI	<i>Escherichia coli RY13</i>	-G/A-A-T-T-C-
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	-G-G/C-C-
Hin dIII	<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	-A/A-G-C-T-T-
Kpn I	<i>Klebsiella pneumoniae OK8</i>	-G-G-T-A-C/C-
Mbo I	<i>Moraxella bovis</i>	-N/-G-A-T-C-N-
Not I	<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	-G-C/G-G-C-C-G-C-
Pst I	<i>Providencia stuartii</i>	-G-T-G-C-A/G-
Pvu I	<i>Proteus vulgaris</i>	-C-G-A-T/C-G-
Pvu II	<i>Proteus vulgaris</i>	-C-A-G/C-T-G-
Sau 3AI	<i>Staphilococcus aureus 3A</i>	-N/G-AT-C-N-
Tth 111I	<i>Thermus thermophilus strain_111</i>	-G-A-C-N/N-N-G-T-C-

b.-Clonación acelular por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁵

Conceptualmente, el proceso de clonación (clonaje o clonado) consiste en la obtención de un clon, entendido como un conjunto de "elementos" genéticamente idénticos entre si y a su precursor; estos "elementos" pueden ser moléculas, células, tejidos, órganos u organismos pluricelulares completos. Cada componente individual de un clon contiene la misma información genética ó el mismo genotipo que el elemento de partida, por ello, se puede considerar que la clonación supone una amplificación genética.

Debe indicarse que la clonación es proceso fisiológico normal: son clónicas las células embrionarias totipotentes formadas por mitosis a partir del cigoto; cada una de estas células da lugar (mediante complejos procesos de diferenciación y desarrollo) a individuos adultos formados por células somáticas clónicas, genéticamente iguales entre sí y a la célula embrionaria de

partida (excepto en lo que afecta a su diversidad o polimorfismo genético, resultante de mutación, recombinación, transposición etc.). En el nivel de organismos completos, son clónicos los gemelos monocigóticos o univitelinos, procedentes de un mismo óvulo fecundado.

El interés de la clonación radica esencialmente en su carácter biotecnológico como proceso de multiplicación de moléculas de ADN o ARN, células, tejidos u organismos completos, mediante mecanismos de manipulación genética.

En lo general, interesa describir la clonación desde el punto de vista de su finalidad:

- Clonación de organismos: plantas o animales completos .
- Clonación de células, aisladas o formando tejidos u órganos.
- Clonación de moléculas, sean estas genes o fragmentos de ADN o ARN, de acuerdo con el proceso experimental, esta clonación puede dividirse a su vez en dos tipos:
 1. Clonación acelular, es decir, clonación de moléculas sin intervención de célula alguna. Es sinónimo de amplificación *in vitro* de moléculas de ADN o ARN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
 2. Clonación celular (con células, no de células). Es la amplificación de moléculas de ácido nucleico mediante su introducción, asistida por vectores, en células anfitrionas en cultivo. Emplea la tecnología del ADN recombinante .

APLICACIONES DE LA PCR: AMPLIFICAR ADN

El objetivo se basa en amplificar el ADN para disponer de cantidad suficiente para utilizarlo en diversos estudios, además para poderlo detectar en muestras con pequeñas cantidades del ADN.

Las aplicaciones de la PCR son muy numerosas y variadas, pueden citarse:

- clonación acelular de fragmentos de ADN
- detección de secuencias sin purificación previa
- secuenciación de ácidos nucleicos
- establecimiento de polimorfismos de secuencia
- rastreo de mutaciones
- tipado de ADN para trasplantes
- diagnóstico de enfermedades genéticas, prenatales o no

- determinación de secuencias específicas de ADN relacionadas con situaciones patológicas definidas
- resolución de problemas forenses o arqueológicos
- estudios evolutivos
- detección de microorganismos infecciosos
- detección de células tumorales
- ampliación de ADN para su posterior clonación celular.

AMPLIFICACIÓN *IN VITRO* DEL ADN POR PCR.⁵

Considerada hoy día como una herramienta imprescindible en el laboratorio de biología molecular e ingeniería genética. Esta técnica amplifica directamente de un gen o un fragmento de ADN o indirectamente ARN (en este caso, a través de su ADN complementario, o cADN), presentes en mezclas de muy diversas fuentes, sin necesidad de una purificación previa de la muestra íntegra original. Se puede partir de extractos crudos de tejido, sangre completa, mezclas de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestras resultantes de la extracción y aislamiento del ADN.

Es un requisito indispensable conocer la secuencia de una parte de la región de ADN o ARN que se quiere amplificar.

Por estas características, en especial la capacidad de amplificación, la PCR es un método muy adecuado para preparar ácidos nucleicos en una cantidad muy superior a la de la muestra original, tanto como método de clonación acelular como para la detección .

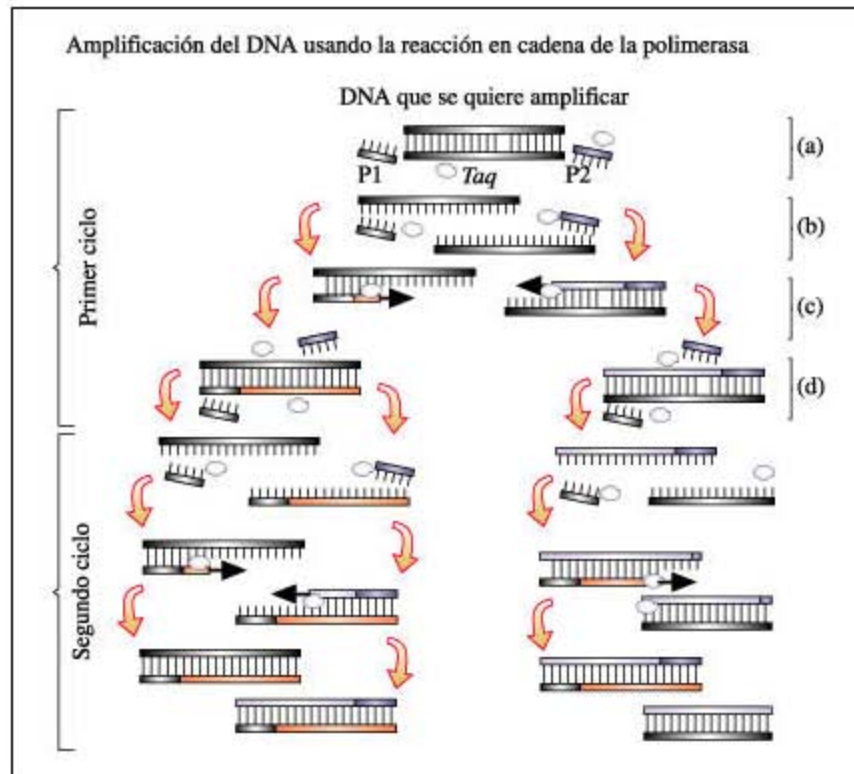


Figura 7.- Reacción en cadena de la polimerasa, replicación de ADN.

Explicación de la figura 7; en a) la mezcla de reacción contiene la secuencia de ADN que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores o iniciadores, una ADN polimerasa termoestable, *Thermus aquaticus*, (Taq) y los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP, dTTP.

b) Durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95 °C, se separan las dos cadenas del ADN molde.

c) La temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde se encuentran una secuencia complementaria. La mezcla se calienta a 72 °C, temperatura a la cual la ADN polimerasa extiende la cadena complementaria a partir del extremo 3° de los cebadores.

d) Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble.

PRUEBAS PARA DETERMINAR LA PATERNIDAD

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad es común la existencia de situaciones en las que las relaciones de pareja se ven obstaculizadas, por la falta de compromiso, que conlleva la irresponsabilidad de alguno de los cónyuges y con ello la relación se complica por diferentes problemas, uno de estos problemas es el desconocimiento o reconocimiento de los hijos.

La identificación mediante las pruebas de paternidad de los vástagos resultado de la relación sexual de la pareja, conlleva implicaciones de tipo legal para uno o ambos padres, obviamente puede hacerse extensivo a otros problemas de tipo legal como son violaciones, raptos de menores, extraviados, reclamos de herencias, infidelidades, equivocaciones de bebés al nacer en el hospital y entregarlo a la mamá equivocada, e incluso la identificación posmortem. Es por ello que en este trabajo se pretende abordar lo relativo a la identificación, mediante las pruebas de paternidad, basadas en el análisis del polimorfismo del ADN, RFLP y VNRT, para así concluir su utilidad en la criminalística con respecto a otras determinaciones como el del sistema sanguíneo ABO, con lo anterior se pretende otorgar resultados alternativos para la impartición de justicia y favorecer una mejor armonía entre los individuos.

La identificación de individuos por las técnicas clásicas se basa en el análisis en los polimorfismos de proteínas del sistema HLA, grupos sanguíneos, proteínas plasmáticas o enzimas leucocitarios o eritrocitarios. Estas técnicas tienen dos inconvenientes fundamentales: 1- La variabilidad en las proteínas no se debe únicamente al polimorfismo genético sino también a la variación en la regulación y expresión de dichas proteínas, y 2- el nivel de certeza que se alcanza nunca llega a ser tan elevado como cuando se analiza el patrón genético mediante el ADN.

En la última década se ha incorporado el análisis de polimorfismo del ADN a la identificación de individuos, RFLP y VNRT, esta técnica ha sufrido últimamente un gran desarrollo, con la aparición de sondas de ADN que identifican locus únicos, muy polimórficos y que permiten un alto nivel de certeza a la hora de identificar a un individuo (99.999...%).

OBJETIVOS

General: Dar a conocer los avances en las pruebas de paternidad, teniendo como marco el campo de la biología molecular.

Objetivos particulares:

-Determinar la utilidad del análisis de polimorfismo del ADN por investigación de polimorfismos en la longitud en los fragmentos de restricción (RFLP).

-Realizar un análisis de las ventajas de las repeticiones en tandem de número variable, como técnica alternativa para el estudio del polimorfismo del ADN, en el campo de la criminalística como ciencia auxiliar en la impartición de justicia.

-Justificar el uso del análisis del polimorfismo del ADN con respecto al sistema ABO, para la investigación de la paternidad.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este trabajo es solamente una revisión bibliográfica descriptiva, enfocada en los avances de la tecnología, en el campo de la Biología molecular con aplicaciones a la criminalística, mediante las pruebas de paternidad con resultados para la impartición de justicia.

La revisión bibliográfica de forma retrospectiva será hecha en artículos, libros, revistas, publicaciones electrónicas, el estudio de tipo longitudinal se realizara en un periodo que comprende de 1990 al año 2004.

DETERMINACIÓN DE LA PATERNIDAD

La determinación de la paternidad son de valor en aquellos casos en que:

Un niño nacido de matrimonio en el que el esposo niegue la paternidad; esta prueba es obvia desde luego en casos de impotencia o esterilidad del marido.

Un niño nacido fuera de matrimonio en el que el hombre nombrado por la madre como su padre, niegue la paternidad.

Dos recién nacidos son cambiados accidentalmente en un hospital, inmediatamente después de su nacimiento, o bien se desea identificar a los

padres del niño, o se sospecha que una enfermera ha substituido su propio hijo con uno confiado a su custodia, para que disfrute de mejor casa.

Una mujer ha simulado embarazo y dice haber dado a luz a un niño, pretendiendo que un hombre determinado se case con ella por este hecho, o para obtener el seguro de vida de un difunto esposo, cuando en el se estipulaba que se entregaría si tuviera descendencia, etc.

Declaración extrajudicial del padre en la que reconoce la paternidad de un hijo habido fuera del matrimonio.

Declaración de testigos que acrediten la relación amorosa del presunto padre con la madre, durante la época en que se supone ocurrió la concepción.

Impugnación de la paternidad legítima, por parte del marido que considera que no es el padre del hijo de su esposa.

Investigación de la paternidad, por parte del hijo que quiere aclarar su filiación, esto es el lazo de parentesco con sus progenitores.

Investigación e Identificación postmortem vía pruebas de paternidad en accidentes por causa humana o en desastres naturales

Identificar criminales que han cambiado su fenotipo con cirugía plástica.--

La manipulación genética y la clonación incluidas recientemente.¹⁵

METODOS PARA LAS PRUEBAS DE PATERNIDAD

La determinación de las pruebas de paternidad se divide en diferentes niveles: pruebas presuntivas, en las que las más utilizadas es la de grupos sanguíneos del sistema ABO, HLA (básicamente son de exclusión del presunto culpable), y pruebas confirmativas de la cual se ocupa la homogenética.

La homogenética forense, que en principio se dedicaba al estudio de los grupos sanguíneos básicamente, hoy en día se hace extensiva a cualquier componente orgánico y por lo tanto actualmente se denomina como Homogenética forense.

GRUPOS SANGUÍNEOS Y POLIMORFISMO EL SISTEMA ABO

La aplicación médico legal de los grupos sanguíneos para la comprobación de la paternidad, se basa en dos principios universalmente aceptados:

1.- Los aglutinógenos no pueden aparecer en la sangre del hijo, sino cuando están presentes en la de uno o de ambos progenitores.

2.-Un progenitor perteneciente al grupo AB, no puede engendrar a un hijo del grupo O, así como los pertenecientes al grupo O, pueden engendrar a un hijo del grupo AB.¹

Conocido el grupo sanguíneo de los padres, se establecen las condiciones posibles y no posibles de los grupos sanguíneos de los hijos nacidos de tal unión. Estas combinaciones se describen a continuación:

Tabla 6. Se muestran las posibles combinaciones en base a los grupos sanguíneos de ambos padres y de los que resultaría el grupo sanguíneo de los hijos.

Grupo de los Padres	Grupos posibles de Hijos	Grupos no posibles de hijos
O/O	O	A, B, AB
O/A	O, A	B, AB
O/B	O, B	A, AB
A/A	O, A	B, AB
A/B	Todos	Ninguno
B/B	O, B	A, AB
O/AB	A, B	O, AB
A/ AB	A, B, AB	O
B/AB	A, B, AB	O
AB/AB	A, B, AB	O

Hasta el primer año de edad, los grupos sanguíneos deben determinarse de las reacciones de las células, (aunque las isoaglutininas no estén totalmente desarrolladas); cuando el resultado no sea claro, es necesario repetir las pruebas en caso de que el niño tenga mas edad.¹

A y B son dominantes, mientras O es recesivo. Esto permite una exclusión de paternidad próxima al 20%.

Interpretación :

Un progenitor AB no puede tener un hijo con sangre tipo O, ni un padre de grupo O puede tener un hijo de grupo AB.

Los caracteres A y B no pueden aparecer en la sangre de un niño si no están presentes por lo menos, en uno de sus progenitores.

Subgrupos del sistema ABO²

A₁ y B₂ son dominantes respecto a O; A₁ es dominante respecto a A₂.

Interpretación :

a.- El carácter A₁ no puede aparecer en un hijo si no está presente, por lo menos, en uno de sus progenitores.

b.- Padres A₁B no pueden tener hijos A₂ (genotipo A₂A₂). Si ambos padres son A₂B, no pueden tener hijos A₁ (genotipo A₁A₁, A₁A₂, A₁O).

c.-De la combinación A₁B x B, y de A₁B x A₁B, no pueden salir hijos A₂ ni A₂B. Sin embargo, Wiener ha dicho que estos subgrupos no son lo suficientemente seguros como para utilizarlos en medicina legal.

Como rarezas esta el tipo Bombay y el aglutinógeno A₃, los individuos con tipo Bombay son homocigotos para un gene supresor que causa falla en el desarrollo de los antígenos A, B y H en la superficie de los glóbulos rojos y en las secreciones, y dicha sangre puede ser erróneamente clasificada como grupo O, y en el caso del antígeno A₃ como grupo B.²

La herencia de un grupo sanguíneo ha de ser claramente demostrada y aceptada de forma unánime. Los sistemas de grupos sanguíneos, que como el grupo Lewis, tienen un gran número de alelos alternativos o de genes modificadores, o de ambos, no son útiles para las pruebas de paternidad.¹⁶

Las pruebas para investigar los marcadores genéticos de los grupos sanguíneos deben realizarlas solamente técnicos calificados, con adecuado entrenamiento y experiencia en los procedimientos para averiguar la paternidad.

Estas pruebas se han de efectuar por duplicado, y ser leídas por diferentes técnicos. Los reactivos han de estar autorizados para este fin, y con cada uno de ellos se realizarán controles positivos y negativos el día en que se utilicen. En los sistemas marcadores de los grupos sanguíneos que presenten un efecto en relación con la dosis, se empleará un control heterocigoto. Cuando sea posible, todos los individuos de cada caso se investigarán simultáneamente, con

los mismos reactivos y por parte de los mismos técnicos, los resultados de registrarán en el momento de leerlos.

En todos los reactivos hay que anotar la procedencia, el número de lote y la fecha en que se abrió, los laboratorios que emplean electroforesis para enzimas, proteínas o sondas de ADN, encuentran útil guardar fotografías de los geles, como registro permanente.

Cuando se obtenga un resultado dudoso, hay que repetir la prueba con reactivos diferentes o adicionales y, si es necesario, por parte de técnicos distintos, en los casos difíciles, el laboratorio enviará el caso a otro laboratorio, con el fin de confirmar el resultado.¹⁶

TIPIFICACIÓN DE HLA EN SUERO Y SANGRE

Los antígenos de los leucocitos humanos (HLA) forman un sistema de cuatro *loci*, estrechamente ligados (HLA-A, (HLA-B, (HLA-C) y (HLA-DR), localizados en el brazo corto del cromosoma 6. Es útil en la evaluación de los candidatos a recibir un trasplante y de los donadores potenciales y en pruebas para estudiar la paternidad y análisis de tipo forense.

La técnica más usada para tipificar al HLA, es la prueba de toxicidad microlinfocítica: esta es un análisis, serológico mediado por complemento, en el cual los anticuerpos que contienen anticuerpos anti-HLA específicos, son agregados a los linfocitos sanguíneos periféricos. La muerte celular indica que los linfocitos acarrean los antígenos específicos marcados .

Si bien se han identificado enfermedades que se relacionan con la presencia de antígenos particulares del grupo HLA, en general no está indicada la tipificación de estos antígenos para diagnosticar dichas enfermedades.¹⁴

Tradicionalmente, los marcadores genéticos como el grupo sanguíneo y el perfil de algunas enzimas polimórficas han aportado información que robustece o debilita alguna línea de investigación. Sin embargo dado su escaso polimorfismo, no se han considerado como pruebas contundentes debido a que gran parte de la población puede compartir las mismas características.¹⁵

BASES GENÉTICAS PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS CON LA "HUELLA DIGITAL DEL ADN"

Cada ser humano tiene un fenotipo o apariencia física o característica, porque posee una información genética única. Los gemelos idénticos son la excepción de esta regla, puesto que poseen el mismo genotipo o material genético. Todas las células de un individuo, ya sean de la raíz del pelo, leucocitos, espermatozoides, piel, hueso etcétera, tienen la misma información genética incluso la información necesaria para codificar potencialmente el cuerpo humano completo.

Estos dos principios, el de la individualidad genética de cada persona y de que todas las células de un mismo individuo poseen la misma información genética, son la base para los estudios de la "huella digital del ADN".¹³

La individualidad genética de una persona está definida por la información genética que heredo de sus padres. El material genético está contenido en los 46 cromosomas (23 pares homólogos) del núcleo celular y en ADN mitocondrial. En general el polimorfismo en una población, se conforma, por las diferentes formas del mismo alelo en esa población, la frecuencia del alelo más raro debe ser al menos de 0.01% para que se considere un polimorfismo más que una mutación recurrente.²⁷

El ADN mitocondrial, sólo es heredado por la madre de tal forma que todos los hijos de una misma madre tienen la misma información genética en el ADN mitocondrial.¹³

El análisis de identificación mediante la huella digital del ADN se basa en la caracterización de regiones variables o polimórficas del material genético de los individuos. Estas regiones son de tres tipos:

- a.-*loci* de variación en las secuencia
- b.-microsatélites y
- c.-minisatélites

Los marcadores genéticos que presentan amplias variaciones en una población determinada son de la máxima utilidad para las pruebas de paternidad. Los

marcadores genéticos cuyas frecuencias son muy altas o muy bajas tienen un valor limitado en cuanto a poder diferenciar entre el padre biológico y otros varones. Sin embargo los marcadores de baja incidencia. Como el antígeno Kell, son útiles para estimar la probabilidad de paternidad. Si el supuesto padre y el niño comparten un antígeno de baja incidencia, la probabilidad de paternidad es muy alta.

Los marcadores extremadamente polimórficos, como los locus antigénicos HLA-A y HLA-B, son útiles para excluir a los falsos padres y aportar un índice más elevado de paternidad.¹⁶

El ADN mitocondrial, sólo es heredado por la madre de tal forma que todos los hijos de una misma madre tienen la misma información genética en el ADN mitocondrial.¹³

El análisis de ADN es la más poderosa herramienta para la identificación humana y de este existen dos alternativas de estudio: el ADN nuclear y el ADN mitocondrial.¹⁵

ANÁLISIS DE ADN NUCLEAR:

El nuclear rinde información sobre la identificación de la persona con una certeza prácticamente absoluta, pero se requiere que este material tenga la calidad y se encuentre en la cantidad suficiente para obtener los resultados que nos proporcionen la identidad del sujeto.

ANÁLISIS DE ADN MITOCONDRIAL

El ADN mitocondrial es estudiado como complemento con el fin de aumentar el poder de identificación o bien cuando no existe otra alternativa en virtud del alto grado de deterioro del ADN nuclear.

Cada célula del organismo contiene miles de copias de ADN mitocondrial que es heredado por la línea materna. Todos los parientes por la línea materna tienen el mismo mitotipo, así que los científicos forenses pueden identificar restos de las víctimas a través del ADN obtenido de sus parientes.

Lo notable de la identificación por el método del ADN es que no se requiere tener grandes cantidades de material biológico para llevar a cabo el estudio, ya que en algunas técnicas se utilizan menos de 30 células para realizar una confrontación exitosa.¹⁵

El polimorfismo de microsatélites, se basa en repeticiones cortas en tándem, usualmente di, tri o tetranucleótidos, estos tienen la ventaja en los

minisatélites que pueden ser identificados por PCR y los discretos alelos pueden ser definidos invariablemente por el número preciso de repeticiones con ello se facilita el reporte de resultados de la frecuencia de genes de la población.¹⁷

Las pruebas utilizadas para detectar el número variable de repeticiones en tandem, secuencias típicamente oligomeros sencillos de 20-30 nucleotidos, son dos tipos de pruebas usadas en el análisis de VNTR: pruebas multilocus, MLP y prueba única de locus (single-locus probes).

MLPs consiste en repeticiones en tandem contenidas en minisatélite central, la secuencia puede detectar simultáneamente el número de loci con alto polimorfismo para generar la huella genética individual.

Estas pruebas tienen aplicaciones en el análisis de identidad incluyendo casos forenses y pruebas de paternidad.

SLPs con esta prueba se detecta un solo minisatélite, extremadamente sensible con mucha tolerancia en la degradación de la cadena de ADN.¹⁸

MARCADORES UTILIZADOS EN POBLACIÓN MEXICANA

Los genes forman parte de los cromosomas y todos los individuos normales de una especie tienen el mismo número de cromosomas.

Para conocer la frecuencia y distribución de un gen en una población es necesario investigar la característica que determina ese gen para de ahí deducir la composición genética, para su realización en condiciones ideales, se requiere que:

- 1.- La característica sea determinada genéticamente y que el ambiente influya poco en su expresión fenotípica y,
- 2.- que se conozca la forma como se hereda esa característica.

Ninguna de estas dos premisas se cumplen cabalmente con las características que se usan tradicionalmente para clasificar a los humanos en razas, por ejemplo, la forma de la cabeza, nariz y labios, color de la piel, estatura e inteligencia son rasgos modificados por el ambiente y sólo se sabe que se heredan de forma multifactorial, es decir, que muchos genes intervienen en su expresión, por lo cual no se puede deducir el genotipo o estructura genética de un individuo por esos rasgos.

Para estudiar desde este punto de vista a las poblaciones y clasificarlas, conviene utilizar el mayor número posible de marcadores genéticos, se debe tomar en cuenta que, lo que es distinto en las poblaciones es la frecuencia relativa de los genes de un sistema pero que estos son idénticos entre sí, es

decir, diferentes grupos humanos tiene los mismos genes pero con distintas frecuencias, por ejemplo, el gen que determina el grupo sanguíneo A de un navajo es igual al gen que produce el mismo grupo sanguíneo en ingleses, esquimales o aborígenes australianos.

FUNDAMENTOS DE GENETICA DE POBLACIONES

Las frecuencias de los alelos en la población varían, y como ya se menciono anteriormente, son características, en las diferentes poblaciones, así mismo, las frecuencias de los alelos dentro de una población tienden a permanecer constantes desde una generación a la siguiente, siempre que:

1. La población sea grande
2. Haya emparejamiento aleatorio
3. La tasa de mutaciones permanezca constante
4. Los alelos no sean seleccionados
5. No haya inmigración o emigración de la población.

Principio de Ardy-Weinberg

La ley de Ardy-Weinberg es una ecuación matemática que establece las bases de la genética de poblaciones.

En un conjunto de genes, considera dos alelos para el locus de un gen. El alelo A tiene una frecuencia p y alelo a tiene una frecuencia q, de tal forma que:

$$q = 1 - p$$

(A es alelo dominante, a es alelo recesivo)

La ecuación de Ardy-Weinberg es la siguiente:

$$P^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Puede utilizarse para calcular la frecuencia de alelos en una población si se conoce la incidencia del gen, siempre que las frecuencias de los alelos permanezcan en equilibrio desde una generación a la siguiente.

Otro hecho de interés es que algunos de estos marcadores genéticos son casi exclusivos de ciertos grupos étnicos y se convierten en excelentes marcadores antropológicos que permiten conocer las contribuciones genéticas ancestrales en la formación de las poblaciones actuales.

PROBABILIDAD DE COINCIDENCIA AL AZAR (PCA).

La probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la misma población del sospechoso tengan el mismo patrón genético (PCA), es el problema principal y el punto de controversia en los casos legales, y su resolución requiere de la aplicación de los métodos de la genética de poblaciones (Cohen, 1990; Chakraborty y Kidd, 1991).

El grado de certeza de un método de identificación de individuos depende de la PCA; a menor PCA, mayor será la certeza, en los casos de crímenes y violaciones, el valor de la PCA para un marcador dado depende de la frecuencia alélica de los dos alelos que conforman el genotipo y se mide por la fórmula $PCA = q^2$ para genotipos homocigotos y $PCA = 2pq$ para genotipos heterocigotos, donde q y p son las frecuencias de los alelos q y p en la población.

En los casos para probar la paternidad, el cálculo de la PCA incluye sólo la frecuencia del alelo que coincide entre el padre supuesto y el hijo en estudio: $PCA = c$, donde c es la frecuencia del alelo que coincide (Li y Chakraborty, 1985; Gertson et al., 1988).

En los casos de paternidad en los que se tiene duda tanto de la madre como del padre, como sería el caso de la identificación de un cadáver irreconocible o un niño extraviado en un cunero, el cálculo de la PCA incluye la frecuencia de ambos alelos y se utilizan las mismas fórmulas que en los casos de crímenes y violaciones.

El número de alelos de un marcador genético y la frecuencia de cada uno de ellos se explora realizando un estudio de genética de población.

La frecuencia alélica depende del número y distribución de los alelos en la población, entre menor sea la frecuencia de un alelo en la población menor será la PCA, ver tabla 7.

La PCA global para un sistema de identificación depende del número de marcadores utilizados y se calcula multiplicando la PCA de cada uno de los marcadores, entre mayor sea el número de marcadores, menor será la PCA.

Para un país de 80 millones de habitantes una PCA de 1×10^{-8} (0.00000001 o 1 en 100 millones) o menor, podría ser suficiente en los casos de identificación.

El grado de certeza no debe expresarse en forma de porcentaje porque resulta engañoso, la certeza, mas bien debe expresarse como probabilidad de error, la cual es igual a la PCA.

Las pruebas basadas en marcadores con pocos alelos en la población tienen una PCA muy alta y pueden utilizarse con seguridad sólo en los casos de exclusión,

tal es el caso de la tipificación sanguínea con el sistema ABO y con los marcadores del ADN poco polimórficos.

En los casos de paternidad es necesario que la exclusión esté dada por varios marcadores, cuando menos 2 o 3, en el caso hipotético de que los marcadores del ADN se de una coincidencia entre la muestra biológica y el sospechoso, la inclusión no es obvia porque la variación de los loci del ADN en la población es pequeña y podrían coincidir sólo por azar, en este caso es necesario utilizar marcadores minisatélites y/o microsátélites.

Sin el cálculo de la PCA, el análisis del ADN para la identificación de individuos en casos de inclusión prácticamente no tiene validez alguna.

Tabla 7, Probabilidad de coincidencia al azar, PCA, obtenida de un estudio de genética de población con 9 microsátélites de una muestra con poblaciones mestiza y mazahua mexicanas.

<i>Locus</i>	Mestizos			Mazahuas		
	Minima	media	Máxima	Mínima	Media	Máxima
D3S1358	0.0001	0.03	0.24	0.0001	0.07	0.34
Vwa	0.0001	0,03	0.21	0.0001	0.05	0.30
FGA	0.0001	0.01	0.05	0.0001	0.01	0.06
TH01	0.0001	0.05	0.19	0.0001	0.05	0.30
TPOX	0.0001	0.03	0.23	0.0016	0.05	0.16
CSF1PO	0.0001	0.04	0.21	0.0001	0.04	0.22
D5S818	0.0001	0.04	0.25	0.0001	0.05	0.20
D13S317	0.0025	0.03	0.09	0.0016	0.03	0.10
D7S820	0.0001	0.04	0.19	0.0009	0.04	0.11

ESTUDIOS DE FAMILIAS

Los cálculos sobre las frecuencias de genes basados en observaciones de la población deben confirmarse siempre mediante estudios de familias, con los que se comprueban los genes alélicos y se corrige su frecuencia. Los estudios de familia ayudan además a identificar los genes unidos (muy próximos en el cromosoma) y al asignar los antígenos eritrocitarios y leucocitarios a los sistemas de grupos sanguíneos. Antes de emplear cualquier sistema de marcadores genéticos para las pruebas de paternidad, es necesario averiguar las frecuencias de los genes y el modo hereditario, los cuales han de estar ampliamente aceptados por la colectividad científica¹⁶, figura 8.

Para los sistemas de variación de secuencia utilizados y que son poco polimórficos, la frecuencia alélica encontrada en población mestiza de México es muy parecida a la encontrada en grupos hispanos en EUA, pero en otros locus como el HBG1 y el DQA1, sus frecuencias de los alelos son menores en la población mestiza mexicana, que en los hispanos de EUA. Estos sistemas son muy utilizados en casos de crímenes, violaciones e identificación de cadáveres, aun siendo poco polimórfico y su PCA global no es muy baja.

Los marcadores minisatélites, (según tabla 8), son los mas polimórficos y presentan mas de 100 alelos diferentes (algunos *loci* pudieran tener potencialmente hasta 5000 alelos), sin embargo, en los geles de agarosa utilizados en la electroforesis, difícilmente se distinguen no mas de 200 bandas diferentes.

En población anglosajona, la PCA de marcadores genéticos minisatélites multi-locus es aproximadamente de 1×10^{-11} (Jeffreys et al., 1991) y la de minisatélite mono-locus varía entre 1×10^{-4} a 1×10^{-5} (Wong et al., 1987), la PCA encontrada en este estudio, con los tres marcadores mono-locus iniciales, indica que este sistema de identificación permite distinguir alrededor de 40 000 millones de individuos.

En un país de 90 millones de personas, como México, la probabilidad de un falso positivo es prácticamente nula.

Los marcadores microsatélites son menos polimórficos, ver tabla 8, que los minisatélites, pero mucho mas polimórficos que los marcadores de variación de secuencia, además, tienen la gran ventaja de encontrarse en pequeños fragmentos de ADN (100 a 300 pb) pueden ser amplificar con la técnica de PCR, lo cuál permite que se puedan utilizar para identificar muestras biológicas pequeñas, muy antiguas o degradadas.

Los microsatélites tetranucleótidos son los utilizados para fines forenses y conflictos de paternidad.

En México se ha explorado la diversidad genética de mas de 15 microsatélites tetranucleótidos (Berumen et al., 2002b) y dinucleotidos del cromosoma X (Berumen et al., 2002c).

La PCA promedio combinada fue de 5.6×10^{17} en los mestizos y de 2.1×10^{-15} en la población mazahua, con estos cálculos, se indica que para la mayoría de los casos de identificación es suficiente utilizar de 9 a 10 marcadores microsatélites.

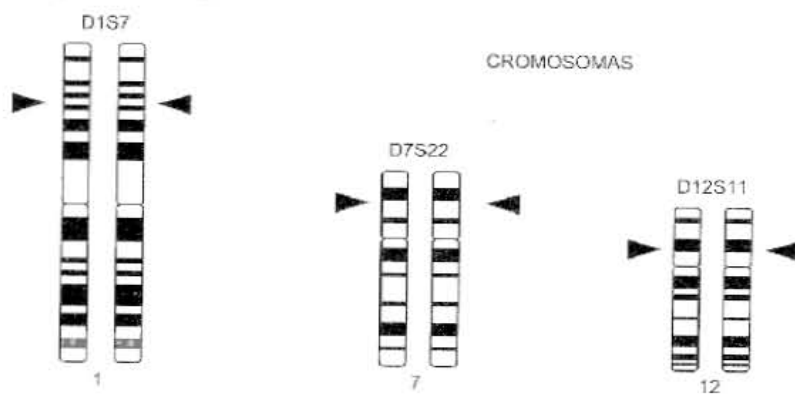


Figura 8, Otro ejemplo de marcadores genéticos, en los que se puede basar la identificación de individuos son los Ideogramas para bandas G (tinción Giemsa), se demuestra la localización cromosómica de tres marcadores (sondas) estudiadas para utilizarse en población mexicana.

Tabla 8, se muestran algunos ejemplos de marcadores genéticos utilizados en las técnicas de variación de secuencias (RFLP, VNTR), microsatélites y minisatélites, por medio de hibridación, electroforesis y Souther blot respectivamente combinadas con la PCR, para el método de la huella genética.

Locus	Cromosoma	Tamaño pb	# de alelos	Genotipos
Variación de secuencia:	de PCR/hibridación			
DQA1	06	239 a 242	06	21
LDRL	19	214	02	03
GYPA	04	190	2	3
HBGG	11	172	03	06
D7S8	07	151	02	03
Microsatélites:PCR /	Electroforesis			
LPL	8p22	105 a 133	07	28
VWA	12p12pter	139 a 167	08	36
FA13A01	1q31-q32	169 a 185	05	15
HPRTB	Xq26	259 a 303	12	78
D3S1744	3q24	340 a 388	12	78
Minisatélites: Souther	Blot o PCR			
D1S80	1p	369 A 801	27	378
APOB	2p24-p23	560 a 1070	18	171
G3	7q36-qter	1600 a17700	>100	>5000
MS31	7p22-pter	600 a 20700	>100	>5000
PH30	4q	1900 a 21900	>100	>5000

Para ejemplificar la manera de cómo se distribuyen los marcadores genéticos mas frecuentes, y por ello, de mas utilidad para la identificación de individuos se cuenta con la genética de poblaciones, y los resultados obtenidos deberán estar enmarcados por esta, así , ver tabla 9, podemos analizar la frecuencia de la hemoglobina S en indígenas, españoles y mestizos (tabla 5), para concluir que tiene variaciones muy acentuadas lo que indica que al composición genética de la población mexicana es heterogénea.

El hecho de que la frecuencia de la Hb S sea alta en los mestizos de ambas costas sugiere que esa Hb fue introducida a nuestro país por los esclavos africanos traídos en los primeros años de la dominación española.

Frecuencia de la Hb S en varios grupos mexicanos.

Se considera como indígenas puros a las comunidades supuestamente no mezcladas, con base en que son monolingües (no hablan español) y otras características:

Tabla 9. Para ejemplificar la composición heterogénea de la población mexicana, se analiza la distribución de la Hb S, ya que en la investigación de marcadores genéticos es importante considerar la población dentro de la cual se realiza este tipo de estudios.

Grupo Estudiado	Número de individuos	Sujetos con Hb S	
		número.	%
Indígenas puros	2 415	3	0.12
Españoles	469	0	0.00
Omotepc (Gro)	406	17	4.18
Cuajinicuilapa (Gro)	418	41	9.80
Tamiahua (Ver)	109	13	11.92
Paraíso (Tab)	160	11	6.87
Mestizos del D.F.	1430	1	0.07

Para conocer la influencia que tuvieron los españoles, los indígenas y los negros en la composición genética de las poblaciones mexicanas actuales, se han realizado algunos estudios con varios marcadores genéticos.

Es evidente que en México no hay grupos de indígenas puros, pero sus genes sí son preponderantes en las poblaciones de indígenas agrupadas, ver tabla 10, con un mínimo de 62.7 % en los Huastecos y un máximo de 91.2 % en el grupo Huichol, lo que se explica por el aislamiento geográfico de los Huicholes.

Los resultados obtenidos en la costa Este confirman que hay una gran proporción de genes africanos en esos lugares así como en algunas poblaciones

de la costa Oeste como en el municipio de Cuajinicuilapa en el que la frecuencia de la Hb S es casi tan elevada como en Tamiahua, Veracruz, en donde 40.5% de los genes son de origen africano.

En los mestizos del Distrito Federal, León, Mérida, Oaxaca, Puebla y Saltillo, la muestra se obtuvo de la población universitaria estatal o de la Universidad Nacional Autónoma de México para el caso del D.F. En todos estos sitios el componente principal es el indígena, sobre todo en Oaxaca.

Es interesante mencionar que los genes de origen negro se encuentran en los mestizos de las seis ciudades lo que muestra que la influencia de la inmigración africana no sólo es patente en las costas sino en todo el país.

Tabla 10, Proporción de ancestros españoles, indios y negros en nueve grupos indígenas y once poblaciones de mestizos, cinco de ellas costeñas:

Grupos o poblaciones	Proporción de ancestros		
	Españoles	Indios	Negros
Indígenas:			
Cora	0.200	0.792	0.008
Chol	0.222	0.778	-
Chontal	0.167	0.783	0.050
Huasteco	0.373	0.627	-
Huichol	0.088	0.912	-
Mazateco	0.166	0.834	-
Nahua	0.296	0.704	-
Totonaco	0.146	0.854	-
Zapoteco	0.259	0.741	-
Mestizos: costa Este			
El Carmen (Camp)	0.284	0.432	0.284
Paraíso (Tab)	0.309	0.474	0.217
Saladero (Ver)	0.312	0.386	0.302
Tamiahua (Ver)	0.288	0.307	0.405
Veracruz (Ver)	0.305	0.394	0.256
Mestizos:			
Distrito Federal	0.408	0.562	0.030
León (Guan)	0.403	0.513	0.084
Mérida (Yuc)	0.429	0.512	0.059
Oaxaca (Oax)	0.306	0.676	0.018

Puebla (Pue)	0.330	0.563	0.107
Sailtillo (Coah)	0.380	0.547	0.073

MARCAJE DE SONDAS PARA HIBRIDACIÓN ⁵

La detección de ácidos nucleicos mediante ensayos de hibridación depende de la presencia de la secuencia diana a detectar en la muestra y de la disponibilidad de una sonda u oligonucleótido de secuencia complementaria a la diana. Por tanto, la utilidad de la hibridación, el punto clave, radica en la sonda: puesto que de su naturaleza depende que el ensayo sea fructífero. El papel de la sonda equivale al del anticuerpo en un inmunoensayo, y al estar marcada, es posible localizar y cuantificar cualquier secuencia diana con la cual se pueda hibridar.

Gracias al empleo de sondas, la sensibilidad es muy elevada, hasta un millón de veces superior a la detección directa por otros métodos, por ejemplo de tinción tras electroforesis. La sonda se convierte así en un elemento esencial para cualquier estudio molecular, en especial para analizar la variabilidad o polimorfismo del genoma

En la tabla 11, se muestran comparativamente la eficacia de los algunos métodos para la identificación de individuos, utilizados para la investigación de la paternidad, donde se observa la clara ventaja de algunos métodos para la exclusión del inculpado que fuera acusado injustamente, sin que represente un alto costo, como es el caso de los grupos sanguíneos, pero no son determinantes para la inclusión del sospechoso, para el método de HLA, vemos de acuerdo a la tabla 11, una clara mejoría en su eficacia, se puede excluir de forma mas amplia, pero para afirmar que la paternidad corresponde a un individuo no es suficiente.

Para el método de la huella genética es clara la superioridad, debido a su alta especificidad, debido a que el análisis de un mínimo de 9 marcadores genéticos muy polimórficos, y que se puede mejorar si el número de marcadores analizados se aumenta, debido a que la PCA es muy baja, todo esto tomando en cuenta el número de alelos de un marcador genético y la frecuencia de cada uno de ellos se determina realizando un estudio de genética de población.

La huella genética resulta el método mas sensible con una alta eficacia, aunque su costo es todavía elevado, se presume la reducción en algún tiempo de la cantidad de recursos económicos para su aplicación.

Tabla 11, Eficacia de los métodos de investigación de la paternidad

EXAMEN REALIZADO	EXCLUSIÓN %	AFIRMACIÓN DE PATERNIDAD
SIST. ABO	ALGUNOS CASOS 17.0	NO
SIST. MNS	ALGUNOS CASOS 30.0	NO
Rh	ALGUNOS CASOS 25.0	NO
HLA	MAYORIA DE LOS CASOS 95.0	SI, ALGUNOS CASOS
ADN	HUELLA GENETICA APROX. 99.99	SI EFECTIVIDAD 99.99%

APLICACIÓN PRACTICA EN EL LABORATORIO DE GENETICA FORENSE

Técnica de la huella genética

El análisis del polimorfismo de ADN genómico se puede realizar a partir de cualquier tejido, pues el contenido de ADN es idéntico en todas las células. El hecho de que el ADN sea muy estable permite el análisis a partir de manchas de restos biológicos o muestras no recientes:

Como fuente mas habitual se utiliza sangre, 0.5 ml son suficientes para llevar a cabo todo el proceso, obteniéndose unos 20 mg de ADN genómico de alto peso molecular.

Una vez purificado se digiere con una enzima de restricción, enzima que reconoce y corta el ADN en secuencias específicas, dando lugar a fragmentos de muy distinto tamaño.

Estos fragmentos se separan en función de su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de agarosa (0.7 %) obteniéndose una buena resolución tras 16 a 20 horas de electroforesis.

El ADN es entonces transferido a una membrana de nylon, en la que cada fragmento conserva su posición relativa al gel de agarosa (Western blot) y donde quedan covalentemente unidos tras su exposición a la luz UV.

El filtro nos permitirá trabajar con comodidad para hibridar el ADN genómico con sondas que reconocen secuencias específicas dentro de este genoma.

Para la detección, la sonda se marca radiactivamente con P^{32} , aunque la utilización de este isótopo esta siendo desplazada por el marcaje con fosfatasa alcalina con el que se alcanza una elevada sensibilidad, se acorta drásticamente el tiempo de hibridación y exposición, evitándose además los problemas inherentes al empleo de radiactividad.

La sonda marcada e hibridada con el ADN fijado en el filtro nos permite visualizar en un autorradiograma los dos alelos de cada gen como dos bandas de distinto tamaño y peso molecular.

La movilidad de los fragmentos de restricción se mide en la película autorradiográfica, captando la imagen con una cámara de video conectada a un ordenador, el cual determina el tamaño de los alelos (el número de bases de ADN) procesando la imagen e interpolando la banda con un marcador de peso molecular.

La posición y combinación de estos alelos son específicos de cada individuo, con lo que empleando dos tres sondas se puede llegar a un índice de certeza de 99.9999 %, a la hora de identificar a una persona.²³

METODOS PARA DETERMINAR LA PATERNIDAD

En el estudio de la paternidad se analizan los alelos que el hijo ha heredado de la madre y del padre, como se ha comentado anteriormente, las sondas que se emplean tienen un alto índice de heterocigosidad, por lo que en la mayoría de los individuos tienen dos alelos (dos bandas, fragmentos de ADN de distinto tamaño) para cada locus.

Como estos genes son heredados de acuerdo a las leyes de Mendel, uno de estos alelos proviene de la madre y el otro del padre.

En el momento de analizar estos datos es importante conocer la posibilidad de que el alelo que proviene del padre pudiera aparecer en algún otro individuo elegido al azar, para ello es necesario conocer la frecuencia de cada uno de los alelos detectados por cada sonda en la población en la que se está realizando el análisis.²³

Estudios realizados recientemente muestran que existen diferencias significativas entre distintos grupos étnicos y entre distintas poblaciones, en consecuencia y aplicando el análisis estadístico bayesiano se podrá conocer con exactitud la probabilidad de que el individuo al que se le está haciendo el estudio sea el padre verdadero.

Comúnmente las enzimas de restricción utilizadas en las pruebas de paternidad mediante la huella genética son, Hae III (GG'CC) y Hinf I (GANTC) con cortes de 4 y 5 pares de bases respectivamente.³

El tamaño de los fragmentos de ADN generados por las enzimas de restricción depende de la distancia entre dos sitios de reconocimiento.

En lo correspondiente a los VNTR, el tamaño de los fragmentos es característico de cada individuo y la probabilidad de que dos personas no emparentadas tengan el mismo patrón de fragmentos es menor a 3×10^{-11} cuando se utiliza una sonda.

Los padres confieren la mitad de sus VNTR a su prole, por lo que esta prueba puede usarse para establecer con fiabilidad la paternidad de un niño.²⁷

GEMELOS

Las investigaciones realizadas en los gemelos han jugado un papel importante en la historia de la genética y en particular en la genética del comportamiento humano.

El método para el estudio de los gemelos se basa en que biológicamente hay dos tipos de gemelos, los monocigotos (MC) o idénticos y los dicigotos (DC) o fraternos. Los primeros proceden de la división de un solo cigoto en algún estadio del desarrollo del embrión después de la fertilización y los segundos resultan de la fecundación de dos óvulos por dos espermatozoides y quizá, en algunos casos, de la fertilización de un óvulo y un corpúsculo polar.

Los monocigotos tienen exactamente los mismos genes, son genéticamente idénticos y se parecen tanto entre sí que es difícil distinguir uno del otro, se puede decir que son el caso más extremo de duplicación del cigoto.

Para determinar la cigosidad el aspecto físico no es suficiente y se recurre a los marcadores genéticos cuyo modo de transmisión hereditaria es simple, bien establecido y no son modificados por el ambiente.

Cuando un par de gemelos son discordantes para alguno de los marcadores se considera automáticamente que son dicigotos .

En el caso contrario, si los miembros de un par de gemelos son concordantes para un número X de marcadores genéticos no se puede asegurar que sean monocigotos y sólo se puede decir cual es la probabilidad de que lo sean y esta es mayor cuanto más marcadores genéticos se hayan utilizado y de las frecuencias que tienen en la población en general.

Resumiendo, el método de la similitud para diagnosticar la cigocidad de un par de gemelos no permite probar que sean monocigotos, pero si permiten calcular la probabilidad de que si lo sean, lo que para fines prácticos suele ser suficiente, es decir, cuando una característica tiene un componente genético en su etiología, la concordancia entre los gemelos MC es mayor que entre los DC.²⁹

Un caso de paternidad estudiado con minisatélites

Se recibieron las muestras de sangre del padre (fallecido días antes), de la madre, de dos hijos conocidos de la pareja y de un tercero, quien decía ser hijo del padre y reclamaba parte de la herencia .

Como control experimental se incluyeron la sangre del padre, la madre y un hijo de dos familias conocidas.

Se purificó el ADN y se efectuó la huella digital con sondas minisatélite, corriendo simultáneamente en la electroforesis el ADN de los miembros de la familia 1, F1, familia 2, F2, y de los miembros del caso de paternidad, utilizando primero la sonda MS43A, luego la g3 y finalmente la MS1.

En las dos familias conocidas F1 y F2, se observa claramente que el hijo comparte una banda con el padre y otra con la madre, en el caso de paternidad, los dos hijos conocidos de la familia en cuestión, comparten una banda con la madre y otra con el padre, mientras que el sujeto problema no compartió ninguna de las bandas con la madre ni con el padre, igualmente sucedió con las sondas MS1 Y MS43A.

Con este estudio se excluyó la posibilidad de que el sujeto en disputa fuera el hijo del padre fallecido.

La frecuencia de mutación de estos loci es de 0.001 y la frecuencia de mutación de los tres marcadores juntos sería de 1×10^{-9} , por lo cual sería improbable que fuera una falsa exclusión.¹³

En la figura 9 se muestra un caso hipotético de la identificación de individuos para pruebas de paternidad, mediante el método de la huella genética, aplicada a una familia, observe la concordancia entre los marcadores genéticos analizados y, representados por el corrimiento de las bandas resultado de la electroforesis, heredados por los padres biológicos y determinar la descendencia de ambos progenitores representados por los hijos 1 y 4.

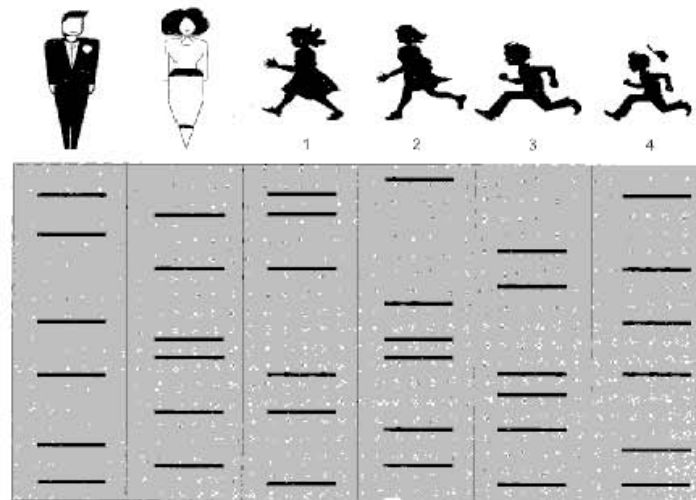


Figura 9. Pruebas de paternidad, esquema del resultado del examen de la huella genética de dos padres y sus cuatro hijos, a fin de determinar a los hijos biológicos y cuales no lo son : Hija 1 muestra bandas compatibles con ambos padres. Hija 2, muestra bandas compatibles con su madre, pero no con el padre. Hijo 3, no muestra bandas del padre ni de la madre. Hijo 4, muestra bandas compatibles con la madre y con el padre.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Durante las últimas décadas, la incorporación de avances técnicos y metodológicos al ámbito de las ciencias forenses ha tenido un impacto extraordinario en todo el mundo, ya que a través de ellas ha sido posible resolver problemas criminalísticos de imposible solución hasta entonces, con ello, la justicia se ha provisto de una serie de herramientas de incalculable valor para la resolución de situaciones muy diversas del tipo delictivo, que se caracterizan por causar alarma e inseguridad social, debido a que no son castigadas o que se procede injustamente.

Los avances acontecidos en el campo de la investigación genética han repercutido muy favorablemente en las áreas propias de la criminalística forense y de identificación humana.

La genética forense es considerada como una especialidad de las ciencias forenses, que se basa en el estudio de trasmisión de caracteres hereditarios y el análisis de la variabilidad genética humana, aplicada a la resolución de problemas judiciales, precisa con alto grado de certeza la relación biológica entre dos personas, como en los casos de paternidad, o bien, entre la evidencia biológica encontrada en el lugar de los hechos y los presuntos responsables.

Tradicionalmente, los marcadores genéticos como los de grupos sanguíneos el perfil de algunas enzimas polimórficas han aportado información que fortalece o debilita una línea de investigación. Sin embargo, dado su escaso polimorfismo no se han considerado como pruebas contundentes para implicar al acusado, no obstante si son suficientes para excluir al mismo, debido a que gran parte de la población puede compartir las mismas características.

Por otro lado, la aplicación forense de los métodos de tipificación de ADN durante los últimos quince años, ha representado el mayor avance en la evaluación de indicios o evidencias biológicas, con su notable sensibilidad y enorme poder de discriminación, el análisis de ADN se ha constituido en un apoyo importante en la investigación científica de hechos delictivos, principalmente en el campo de la actividad pericial, descartando de manera casi inmediata al individuo falsamente acusado, y señalando con certeza prácticamente absoluta al responsable que sea fuente biológica de las evidencias.

A pesar de los resultados satisfactorios obtenidos por medio de los análisis de los RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) o los VNTR (repeticiones en tándem de número variable), que como ya se menciono tienen alta especificidad y alta confiabilidad, en la investigación de identidad

humana, para los casos de diagnóstico médico y en medicina forense, tienen la desventaja de ser un procedimiento lento y tener un alto costo, además se requiere cierta cantidad de material genético y debe estar en buenas condiciones. En este sentido se están buscando nuevos y mejores procedimientos con mejores posibilidades que nos brinden un mejor resultado, de esto surgen los SNP (Single Nucleotide Polymorphism), que son fragmentos mucho más cortos, se localizan fuera de regiones codificantes, tienen una tasa de mutación menor a la de las secuencias repetitivas, RFLP y VNTR, fragmentos que van de los 40 a los 180 pares de bases, se pueden aplicar tecnologías con gran poder de automatización y de diverso uso, además de ser muy útiles en muestras sumamente degradadas, son más rápidos y baratos que la secuenciación, y se puede hacer la detección en el cromosoma Y o ADN mitocondrial, el estudio de polimorfismos debe complementarse con el de marcadores autosómicos, por ello se debe reforzar con más análisis, como los de grupos sanguíneos, el sistema HLA, con el fin de tener un buen soporte para el dictamen de resultados, y con ello afrontar mejor una posible investigación contrapericial.

CONCLUSIONES

- 1.- Actualmente existe la tecnología del ADN recombinante, necesaria para identificar individuos genéticamente en casos de violaciones, crímenes, identificación de cadáveres y casos de paternidad, con una exactitud absoluta.
- 2.-Existen tres tipos de marcadores genéticos para identificar individuos: a- de variación de secuencia, b-microsátelites, c- minisátelites.
- 3.- Para aplicar esta tecnología en México es necesario conocer la diversidad genética de los marcadores genéticos utilizados para la identificación de individuos en las diferentes poblaciones del país. Estos datos permiten calcular la probabilidad de que dos individuos no relacionados genéticamente coincidan al azar (probabilidad de coincidencia al azar, PCA).
- 4.-En los casos de inclusión se debe utilizar el número suficiente de marcadores genéticos, para tener una PCA menor a 1×10^{-8} (1 en 100 millones), con los cuales difícilmente, en un país de 100 millones de individuos, coincidirían genéticamente dos individuos.
- 5.-La exclusión, en los casos de violaciones y crímenes, es absoluta con un solo marcador que no coincida entre el individuo sospechoso y la evidencia biológica. En los casos de paternidad, para excluir al supuesto padre se requiere de cuando menos tres marcadores no coincidan entre él y el hijo en estudio; como la frecuencia de mutación de estos marcadores es de aproximadamente 1×10^{-3} , la probabilidad de que los tres marcadores que no coinciden sean mutaciones generadas en una misma célula germinal es muy baja (1×10^{-9}).
- 6.-La dirección, diseño e interpretación de los estudios de identificación de individuos mediante el análisis del ADN deben ser llevados a cabo por personal con la formación académica adecuada y, amplia experiencia en el área de la genética molecular.

SUGERENCIAS:

En el país se debe realizar un estudio poblacional, para evaluar la diversidad de los haplotipos presentes en la población, con ello la posibilidad de conformar un banco de datos con perfiles genéticos de esta misma población en general, y uno más con los perfiles de los delincuentes, todo esto conlleva una selección de los fragmentos más frecuentes de esta población y de acuerdo a ello se pueden generar paneles de muestreo propios con sus respectivos reactivos.

Se podrá realizar una estandarización y validación aplicadas a todos los laboratorios de genética forense de todo el país, lo que implica una sistematización de las técnicas aplicadas, con la consiguiente reducción de costos, con beneficios al contribuyente.

La interpretación de los resultados de la prueba de ADN debe basarse sólo en los datos experimentales y los cálculos estadísticos obtenidos a partir de la base datos de genética de población.

GLOSARIO

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN): El portador de la información genética en las células, compuesto por dos cadenas complementarias de nucleótidos enrolladas en una doble hélice, capaz de autorreplicarse y de dirigir la síntesis de ARN.

ÁCIDO NUCLEICO: Macromolécula formada por nucleótidos. Los tipos principales son el ácido desoxirribocleico ADN, y el ácido ribonucleico (ARN).

ALELO DOMINANTE: Alelo que se expresa dando el mismo fenotipo tanto cuando se encuentra en condición heterocigota como homocigotica .

ALELO RECESIVO: [Lat. Recedere, retroceder]: Alelo cuyo efecto fenotípico está enmascarado en el heterocigoto por el otro alelo dominante.

ALELOS: [Gr. Allelon, el uno del otro]: dos o mas formas diferentes de un gen, los alelos ocupan la misma posición (locus) en los cromosomas homólogos y se separan uno del otro en la meiosis.

AUTOSOMA [Gr. Autos, propio + soma, cuerpo]: Cualquier cromosoma que no sea un cromosoma sexual. Los seres humanos tienen 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales.

AISLAMIENTO GENETICO: L a ausencia de intercambio genético entre poblaciones o especies como resultado de la separación geográfica o de mecanismos de preapareamiento o posapareamiento (anatómicos, fisiológicos o de comportamiento) que evitan la reproducción.

ANAFASE:[Gr. An, igual cantidad de cada uno + phasis, formal]:en la mitosis y meiosis II, la etapa en la cual lass cromatides de cada cromosoma se separan y se mueven a los polos opuestos, en la meiosis I, la etapa en la cual los cromosomas homólogos se separan y se mueven hacia polos opuestos.

APOPTOSIS. Serie de eventos que constituyen la muerte celular programada genéticamente.

ARN: Abreviatura comun del ácido ribonucleico, uno de los dos ácidos nucleicos, localizado esencialmente en los ribosomas del citoplasma celular.

BIBLIOTECA GENÓMICA: Conjunto de fragmentos de ADN que representan la totalidad del genoma de una célula u organismo y se encuentran insertados en un vector.

BIOLOGÍA MOLECULAR: Rama de la biología que estudia el origen, transformación e interacción de los genes y sus productos en el individuo, población o especie.

CAPSIDE: La cubierta de proteína que rodea la zona central del ácido nucleico de un virus.

CARÁCTER: Característica morfológica, fisiológica o conductual de un organismo.

CARACTERÍSTICA LIGADA AL SEXO: Característica heredada, como la discriminación de los colores, determinada por un gen localizado en un cromosoma sexual y que, por lo tanto, muestra un patrón diferente de herencia en los machos y las hembras.

CARIOTIPO: [Gr. *kara*, cabeza + *tipos*, estampar o imprimir]: identificación y ordenamiento sistemático de los pares cromosómicos.

CEBADOR (Primer): oligonucleótido de ADN o ARN que luego de la hibridación con un ADN complementario invertido, tiene un extremo 3'-OH al cual la ADN polimerasa puede agregar nucleótidos para sintetizar una cadena nueva.

CENTIMORGAN: es una unidad de medida de longitud en un mapa de ligamiento de genes (linkage map) [100 centimorgan (cM) = Morgan] la distancia entre dos *loci* génicos en centimorgan corresponde a la frecuencia de su recombinación expresada como porcentaje; ej. Un cM corresponde a 1% de frecuencia de recombinación, El nombre se debe a Thomas H. Morgan (1866-1945) quien en 1910 inicio los experimentos de genética clásica en *Drosophila*.

CÉLULA: [Lat. *Cella*, cámara]: la unidad estructural de los organismos, rodeada por una membrana y compuesta por citoplasma, y en los eucariotas, uno o mas núcleos. En la mayoría de las plantas, hongos y bacterias hay una pared celular por fuera de la membrana.

CELULAS GERMINALES: [Lat. *Germinare*, gemar]: gametos o células que originan directamente gametos.

CELULAS SOMATICAS: [Gr. *Soma*, cuerpo]; las células diferenciadas que componen los tejidos corporales de las plantas y animales multicelulares, todas las células del cuerpo, excepto las que originan a los gametos.

CENTROMERO:[Gr. *Kentrom*, centro + *meros*, parte]: Región de constricción del cromosoma que mantiene a las cromátides hermanas unidas.

CENTROSOMA: Estructura de las células animales que funciona primariamente como un centro organizador de microtúbulos y actúa como polo del huso mitótico durante la división celular. En la mayoría de las células animales contiene un par de centriolos.

CICLO CELULAR: Secuencia regular de los fenómenos del crecimiento y división celular a través de los cuales pasan las células que se dividen.

CIGOTO:[Gr. *Zygon*, yema, par]: La célula diploide (2n) que resulta de la fusión de dos gametos masculino y femenino (fecundación) un cigoto puede desarrollar

un individuo diploide por división mitótica o puede sufrir meiosis y formar individuos haploides (n) que se dividen mitóticamente y forman una población de células.

CISTRON: Segmento de ADN que comprende dos regiones, intrón y exón, al momento de la traducción al ARN sólo se copia el exón.

CLON:[Gr. Klon, ramita]:Una línea de células, surgidas todas de una misma célula única por divisiones repetidas; individuo derivado por reproducción asexual a partir de un solo antecesor. En la tecnología de ADN recombinante, implica la obtención de muchas copias de un único fragmento de ADN, por ciclos repetidos de replicación.

CMH(complejo mayor de histocompatibilidad) (Thorsby, 1974):es el principal sistema de histocompatibilidad, formado por los genes de antígenos de clase I y III del sistema de HLA, incluidos los genes de clase II.

CODIGO GENETICO: Sistema de tripletes de nucleótidos en el ADN y ARN que determina la secuencia de aminoácidos en las enzimas y otras proteínas sintetizadas por el organismo.

CODON (Crick, 1963): es una secuencia de tres nucleótidos, triplete, en el ADN o el ARN, que codifica para un aminoácido determinado o para una señal de terminación de una secuencia de aminoácidos.

CRISTOLOGRAFIA DE RAYOS X: Empleo de modelos de difracción producidos por la dispersión de los rayos X a través de cristales, con el objeto de dilucidar la estructura tridimensional de las moléculas.

CROMATINA: Sustancia basófila específica del núcleo celular que fija efectivamente los diversos colorantes básicos, llamada así por la rapidez con la que se tiñe con tales colorantes (cromaticida).

CROMOSOMA: Estructura visible al microscopio que se observa antes de la duplicación celular en el núcleo de las células, tiene una forma de bastoncillo y se compone de ADN y algunas proteínas, el número de cromosomas es siempre el mismo para todos los individuos de una especie y para todas las células de un individuo, excepto las células sexuales.

DELECIÓN,(Painter y Muller, 1929): pérdida total o parcial de un cromosoma o de algunas bases nucleotídicas del ADN.

DESNATURALIZACIÓN DEL ADN: separación de las cadenas de una molécula de ácido nucleico de cadena doble, para dar lugar a dos cadenas simples; se denomina renaturalización al apareamiento de dos moléculas complementarias de ácido nucleicos de cadena simple.

DICIGÓTICOS: mellizos que provienen de dos cigotos diferentes (hermanos mellizos), por el contrario se denominan monocigóticos los mellizos que provienen del mismo cigoto (gemelos).

DIPLOIDE: Célula u organismo con dos juegos de cromosomas

ELECTROFORESIS (Tiselius, 1937): procedimiento para la separación de moléculas basado en su diferente velocidad de migración en un campo eléctrico, como medio de soporte se usan geles formados por sustancias como el almidón, la agarosa, la acrilamida, etc. Hay modificaciones técnicas que permiten un mayor poder de discriminación, como la electroforesis en dos dimensiones (el campo eléctrico se rota 90° para la segunda migración) o el cese de la migración en el punto isoeléctrico (enfoque isoeléctrico).

ENZIMA (E. Buchner, 1897): proteína que cataliza una reacción biológica; las enzimas están formadas por una parte proteica (apoenzima), responsable de su especificidad, y una parte no proteica (coenzima), necesaria para su actividad, las enzimas se unen a sus sustratos y durante el transcurso de la reacción estos se alteran metabólicamente o se combinan con otras sustancias.

EXONES: Bloques (fragmentos) de secuencias de ADN que constituyen a los genes y que codifican a dominios discretos de las proteínas, se intercalan con regiones que no codifican (intrones) en numerosos genes de células de organismos superiores

FENOTIPO: Características morfológicas, fisiológicas y conductuales de un individuo o población.

FRECUENCIA GENICA: (o frecuencia alélica, proporción de copias de un gene en una población

GAMETO: Célula sexual, espermatozoide y óvulo, que porta cada uno la mitad del material genético (haploides), y que al unirse conforman el cigoto o huevo fecundado, a partir del cual se genera un nuevo ser vivo

GENE: Unidad hereditaria que determina cada alternativa (alelo) de un carácter o rasgo genético.

GENETICA (Bateson, 1906): es la ciencia de la herencia y las bases hereditarias de los organismos; griego, *génésis*, origen.

GENOMA: Total del ADN nuclear de una célula y conjunto de la información genética que lleva ese ADN. El genoma nuclear humano es de aproximadamente 3000 megabases.

GENOMA mitocondrial: ADN mitocondrial que comprende 16,569 pares de bases en la especie humana.

GENOTIPO: Conjunto de la información genética que porta un individuo

HAPLOIDE: (del griego haplos: mitad) que posee un solo juego de cromosomas (no hay parejas).

HAPLOTIPO: cualquier conjunto de genes, estrechamente ligados, que están en una misma región de cromosoma y que forman un conjunto génico característico de ese individuo, de una familia o de una población. El haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad CMH (ALH =HLA) sirve para identificar individuos.

HELICASA: Cualquier enzima del grupo de enzimas dependientes del ATP capaces de destorcer la doble hélice del ADN, y separar ambas cadenas por un trecho variable; hay helicasas con el sentido de avance de 5' a 3' y otras con sentido inverso, intervienen en la replicación del ADN y en su reparación y sus mutantes se asocian con enfermedades como el xeroderma pigmentoso, el síndrome de Bloom, el síndrome de Werner.

HEMICIGOTO: que contiene un solo miembro de un par de genes o de un par de cromosomas, el varón es hemicigótico para la mayor parte de los genes del cromosoma X.

Heterocigota, heterocigoto: individuo que posee dos alelos diferentes para un gen.

Hibridación celular: procedimiento experimental por el cual se fusionan células de distinto origen con la ayuda de agentes como el virus Sendai o de sustancias que tienden a fusionar las membranas celulares.

Hibridación in situ y fluorescencia (HISYF, FISH): técnica citológica que permite detectar secuencias de ácidos nucleicos directamente en un corte histológico o en células pegadas a un portaobjetos mediante el uso de sondas específicas para esas secuencias que a su vez se detectan por colorantes fluorescentes.

HOMOCIGOTA, homocigoto: individuo que posee dos alelos del mismo tipo.

IDIOGRAMA: diagrama esquemático de un cariotipo.

IMPRONTA de Northern, transferencia de Northern: técnica similar a la de Southern, para transferir segmentos de ARN a una membrana con el fin de que sean identificados con una sonda.

IMPRONTA de Southern: Southern blot, método desarrollado por E. Southern para transferir segmentos de ADN, (previamente separados por electroforesis) desde el gel de la electroforesis a una membrana o filtro, en el que se detecta el segmento mediante una sonda radiactiva.

IMPRONTA de Western: técnica similar a la de Southern para transferir proteínas a una membrana, para que sean identificadas mediante anticuerpos.

IN SILICO: se refiere a secuencias que se encuentran en bases de datos (bioinformáticas) y que pueden ser sintetizadas artificialmente.

INSERTO DE ADN: segmento de ADN foráneo que es unido artificialmente a un vector y acarreado por éste durante la clonación de ADN.

LIGASA: enzima que cataliza la unión de fragmentos de ADN de cadena doble.

LINEs: secuencias largas de , 6.4 kb, dispersas y repetidas del ADN, localizadas en las bandas G de todos los cromosomas humanos, cuyo origen se asocia a la retroposición de secuencias por medio de la transcriptasa inversa.

LOCUS (plural loci): sitio definido de un cromosoma o de una molécula de ADN donde se puede encontrar un gen u otro tipo de secuencia bien definida. Un locus de un gen puede estar ocupado por cualquiera de los alelos de ese gen.

MARCADORES (de ligamiento, génicos): segmentos del ADN cuya posición ya es conocida y que sirven como hitos para la localización de otras secuencias u otros genes, en la confección de mapas genéticos. Los marcadores genéticos pueden ser genes o (más frecuentemente) secuencias no génicas, son marcadores útiles las secuencias polimórficas, como los polimorfismos de longitudes de fragmentos de restricción (PLFR), los minisatélites y los microsátélites.

MARCO abierto de lectura (MAL): cuadro de lectura, open reading frame, ORF, secuencia codificadora del ADN que no esta interrumpida precozmente por un triplete de terminación, por consiguiente, sugiere la existencia de un gen funcional.

MEGABASE: un millón de bases nitrogenadas, unidad de los mapas físicos de ADN.

MEIOSIS: proceso celular complejo, propio de los organismos con reproducción sexual, que comprende dos divisiones sucesivas (meiosis I y II) y que cumple varias funciones fundamentales para la especie: reduce el número cromosómico de diploide a haploide, distribuye al azar los cromosomas maternos y paternos en las gametas e introduce la principal fuente de variación genética mediante los entrecruzamientos y la recombinación genética consiguiente.

MENDELIANA (herencia): patrón de transmisión hereditaria que sigue las reglas establecidas por G. Mendel, se refiere a rasgos codificados por un único gen nuclear.

METACENTRICO: cromosoma con brazos de aproximadamente la misma longitud porque su centrómero está en posición mediana.

MICROARREGLOS (microarrays, ADN chips): técnica en la que se usan portaobjetos especiales con varios miles de microgotas depositadas con mucha

precisión en un cuadrículado y que permite el estudio simultáneo de la función de varios miles de genes, y hasta de todo el genoma, mediante la comparación de una muestra normal con otra diferente.

MICROSATÉLITES: secuencias muy cortas de bases de ADN (usualmente dinucleótidos) repetidas un número variable de veces, dispuestas en posiciones fijas en cada cromosoma y heredadas en forma mendeliana, son muy útiles como marcadores porque el número de repeticiones es muy variable entre personas no emparentadas, es decir que son muy polimórficas.

MINISATÉLITES, repeticiones en tándem de número variable (RTNV), secuencias cortas, 10-15 pb, repetidas una detrás de la otra, con número variable de repeticiones, que por ser polimórficas en la población humana, sirven como marcadores, aunque menos eficaces que los microsatélites.

MUTACIÓN: cambio permanente en una secuencia de bases del ADN, las mutaciones pueden clasificarse de varias maneras: morfológicamente y funcionalmente.

NUCLEOSOMA: partícula proteínica formada por dos tetrámeros de histonas sobre la cual se enrolla un segmento de ADN.

ORIENTACIÓN (de un gen): determinación del sentido en el que avanza la transcripción de un gen, que es siempre de 5' hacia 3': positiva si va hacia el centrómero, desde extremo del brazo corto del cromosoma; negativa si es inverso.

PALINDROMO: repetición invertida de una secuencia de pares de bases de ADN, de modo que la secuencia puede leerse igual de derecha a izquierda en una cadena o en sentido inverso en la cadena complementaria; hay numerosas secuencias palindrómicas en el ADN que pueden ser blanco del ataque de las enzimas de restricción.

POLIMERASAS: enzimas que sintetizan polinucleótidos, ADN o ARN.

POLIMERASAS termoresistentes, polimerasa Taq. ADN polimerasas extraídas de bacterias termófilas (que viven a altas temperaturas), como la Taq, que han hecho posible la Reacción en cadena de la polimerasa.

POLIMORFISMO: de ADN, presencia en la población humana de variantes inocuas, y en número significativo, de secuencias de ADN en loci determinados, como la variación en el número de repeticiones de microsatélites, estos polimorfismos, para ser útiles en el mapeo génico, deben ser frecuentes en la población.

POLIMORFISMOS de mononucleótidos, (SNP): variantes de una única base en una secuencia de ADN, sobre todo en regiones no codificantes de proteínas,

que son heredables, pueden ser usadas como marcadores, y son en promedio solo 1 en 1,200 bases.

PROCARIOTE: organismo unicelular sin membrana nuclear (sin núcleo) ni organelas intracelulares.

PROMOTOR: secuencia reguladora de un gen, colocada en sentido 5' con respecto al gen, y sobre la cual se asocia la ARN polimerasa para iniciar la transcripción.

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA: RCP, técnica muy empleada para amplificar ADN, es decir replicar una o mas moléculas de ADN que sirvan de molde, en millones de copias idénticas en un aparato termociclador, mediante la intervención de polimerasas termorresistentes y primers de secuencia prefijada.

REPARACIÓN DEL ADN: sistema de: mecanismos celulares de varios tipos por medio de los cuales se corrigen errores introducidos en el ADN durante su replicación y cambios moleculares inducidos por factores externos mutagénicos

REPRESOR: molécula proteínica que se asocia con el promotor de un gen e impide su transcripción.

RESTRICCIÓN (enzimas de): endonucleasas que cortan ADN en secuencias específicas y que se usan en las manipulaciones genéticas in vitro.

RESTRICCIÓN, polimorfismos de longitudes de fragmentos de, PLFR, RFLP: variaciones (polimorfismos), heredables en secuencias de ADN que poseen puntos de ataque para enzimas de restricción y producen, por consiguiente, fragmentos de longitudes diversas, útiles como marcadores.

SATELITE, ADN: ADN formado por secuencias muy repetidas (altamente repetidas), localizado en regiones de heterocromatina constitutiva, originalmente fue llamado satélite porque se separaba como un pico satélite del pico principal del ADN nuclear en procedimientos de centrifugación isopícnica en gradientes de CLCs.

SECUENCIACION de ADN. Determinación del orden estricto de las bases a lo largo de una molécula de ADN con el fin de descodificar su información, la secuenciación se realiza sobre una cadena sola y generalmente mediante el método de Sanger, la secuenciación de todo el genoma humano constituye el Proyecto del Genoma Humano.

SECUENCIAS repetidas cortas y dispersas, SINEs: en la especie humana, representadas por la familia de secuencias Alu.

SECUENCIAS ALU: familia de secuencias de ADN relacionadas, cada una posee una longitud de 300 pb que contiene el sitio de restricción para la enzima

de restricción Alu; existen alrededor de 500,000 copias de la secuencia Alu dispersas por todo el genoma humano.

SECUENCIAS repetidas en tándem SRT=TRS ingles: copias de secuencias colocadas sin interrupción una detrás de la otra y en mismo sentido (cabeza a cola) para diferenciarlas de las repeticiones con sentido inverso.

SONDA, probe, ingles: segmento de ADN o ARN, marcado con un isótopo radiactivo o con un compuesto capaz de ser identificado por un reactivo fluorescente, usado para que se hibride in vitro con un ADN o ARN, con el fin de identificar la localización de la secuencia complementaria de la sonda.

TENDENCIA GENETICA (Wright, 1921): cambios que se producen al azar en la frecuencia de un gen dentro de una población, es relevante en especial en poblaciones pequeñas, en las cuales cambios al azar en la frecuencia reproductiva de un alelo determinado puede cambiar la frecuencia de ese alelo, en ciertas condiciones un alelo puede desaparecer por completo de una población (pérdida) o puede estar presente en todos los individuos de una población (fijación).

TERMOCICLADORES: aparatos que permiten programar y condicionar temperaturas constantes y cambios cíclicos de esas temperaturas para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa.

TRANSPOSON. Segmento de ADN que tiene la capacidad de insertarse en diversos lugares del genoma, cambiando de uno a otro y sin tener homología con ellos, los transposones codifican las enzimas transposasas para sus movimientos y tienen repeticiones invertidas en sus extremos; cuando se insertan, generan duplicaciones cortas en ese sitio.

VECTOR: cualquiera de los diferentes tipos de moléculas de ADN utilizadas para vehiculizar fragmentos de ADN al interior de una bacteria o de otra célula, con el fin de clonar el fragmento vehiculizado, los principales vectores son plásmidos, cósmidos y cromosomas artificiales.

REFERENCIAS HISTORICAS

Aportaciones a la Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Esta relación no pretende ser una lista exhaustiva de todas las aportaciones científicas, simplemente se desea reflejar los orígenes de las principales aportaciones, con una mención específica para las personas e hitos más significativos, los datos se ordenan cronológicamente.

1660s R.Hooke observa las celdillas microscópicas (células) del corcho.

1838 J. Berzelius sugiere el término proteína para ciertas sustancias nitrogenadas de células animales y vegetales.

1840s Comienza la teoría celular de los seres vivos con T. Schwann y M. J. Schleiden

R. Brown observa una región densa circular dentro de las células vegetales (núcleo)

J. E. Purkinje observa por primer vez el citoplasma (protoplasma) en el interior de la célula.

1850s R. Virchow demuestra que toda célula deriva de otra, surge el concepto de división celular.

1866 G. Mendel describe los mecanismos de herencia de los caracteres (plasmados en sus famosas leyes).

1869 J. F. Miescher descubre la nucleína, una sustancia ácida rica en fósforo (el ADN)

1876 O. y R. Hertwig: la sustancia genética de los progenitores se transmite en la fecundación.

1881 E. Zacharias demuestra que los cromosomas contienen la nucleína descubierta por J. F. Miescher.

1882 W. Flemming: fusión de gametos en la fecundación y posterior separación del cigoto en dos células.

1889 R. Altmann purifica un ADN libre de proteínas y acuña para la nucleína el término ácido nucleico.

1900 C. E. Correns, H. De Vries y E.T.E. Seysseneg redescubren las leyes de Mendel al cabo de 35 años.

1902 A. Garrod analiza la alcaptonuria como alteración del metabolismo, surge el concepto de diversidad genética o polimorfismo.

1906 W. Bateson observa el significado genético de la consanguinidad y acuña el término *Genética*.

F. Galton y A. Garrod inician la genética médica, con el concepto de errores Congénitos del metabolismo.

1909 T. H. Morgan estudia las mutaciones genéticas, los rasgos ligados al sexo y la función de los cromosomas.

W. Astbury utiliza por primera vez el término biología molecular, aunque sin su Significado actual.

P. Johansen introduce el término gen para las unidades de la herencia con carácter Transmisible.

Ekery acuña el término biotecnología para describir la "interacción de la biología y la tecnología.

Premio nobel para T. Svedberg por emplear la ultracentrifugación analítica para determinar masas moleculares.

Muller (premio nobel en 1946) demuestra en moscas que los rayos X causan Mutaciones.

F. Griffith demuestra el proceso de transformación bacteriana (transferencia de Ácido nucleico).

A. Levine demuestra que la 2-desoxirribosa es el azúcar presente en los Nucleótidos del ADN.

1930 K. Landsteiner, premio nobel por descubrir y tipificar los grupos sanguíneos

T. H. Morgan , premio nobel por descubrir la función de los cromosomas Como portadores de la herencia.

W. Astbury y Bell encuentran un espaciado regular de 0.34 nm a lo largo de las fibras del ADN. A. Huxley : la biotecnología llegará a ser mas importante que la ingeniería mecánica y la química.

1941 B. McClintock (premio nobel en 1983) muestra que los transposones cambian de lugar en el genoma ; G.W. Beadle y L. Tatum establecen la hipótesis un gen- una enzima.

1944 O.T. Avery, C. McLeod y M. McCarty: el ADN es el material portador de la información genética.

1949 M.L. Barr y E. G. Bertram descubren la cromatina sexual en células de animales hembra.

- 1950 Se conoce ya gran parte de la composición química del ADN (azúcar , enlaces fosfodiéster y bases); R. Franklin y M.H.F. Wilkins: primeros datos precisos por rayos X sobre la estructura del ADN.
- 1951 L. Pauling descubre la base molecular de la anemia falciforme, surge el concepto de enfermedad molecular
E. Chargaff establece la relación equimolecular existente entre purinas y Pirimidinas en el ADN.
- 1952 M. Chase y A.D. Hershey confirman en virus que el ADN es el portador de la información genética.
- 1953 F.H.C. Crick y J. D. Watson proponen la estructura en doble hélice para el ADN (premio nobel en 19262).
- 1956 A. Levan y J.H. Tuyo fijan en 46 el número de cromosomas humanos.
Se descubren la ARN polimerasa y el ARNm : el mensaje genético requiere Secuencias de pares de bases; F. Jacob y J. Monod demuestran la existencia de genes estructurales y genes reguladores.
- 1958 G.W. Beadle, J. Ledenberg y E.L. Tatum, premio nobel por estudios de recombinación génica y organización del material génico bacteriano.
M. Meselson y F.W. Stahl demueatran por ultracentrifugación el carácter semiconservador de la replicación.
A. Kornberg establece el mecanismo de la replicación catalizado por La ADN polimerasa.
- 1959 A. Kornberg y S. Ochoa, premio nobel por sintetizar *in vitro* polinucleotidos de ARN y ADN.
- 1960 Comienza el estudio del mecanismo de acción de los genes
P. Berg clona por primera vez el ADN se introduce la hibridación de los ácidos nucleicos
- 1961 F. Jacob y J. Monod (p. Nobel 1965): la información genética fluye del ADN a través de un ARNm.
H. Dintzis demuestra que la traducción discurre en sentidos 5' → 3' del ARNm y amino→carboxilo de la proteína.
M. Niremberg muestra las primeras correspondencias entre codones y amino ácidos, sintetizando proteínas a partir de un ADN artificial.
S. Brenner y F.H.C. Crick: la secuencia de codones fija la de minoácidos, el código no se solapa ni se puntúa.
M. Meselson y J. Weigle. La recombinación genética se produce por ruptura y nueva unión del ADN.
- 1962 F.H.C. Crick, J.D. Watson y M.H.F. Wilkins, premio nobel por sus estudios de estructura molecular del ADN.

- S. Benzer: el aminoacil ARN^t se incorpora en la síntesis proteica según la especificidad de su anticodón.
- 1963 J. Cairns demuestra la síntesis simultánea de ambas hebras durante la replicación del ADN.
- 1964 R. Holliday propone un modelo para la recombinación homóloga.
M. Roger consigue por primera vez implantar un gen en una célula anfitriona
- 1965 R. Holley determina la primera secuencia polinucleotídica natural (ARN^t^{ala})
S. Benzer elabora el primer mapa detallado de un gen.
F. Jacob, A. Lowff y J. Monod, premio nobel por sus estudios del control genético de enzimas y de virus.
- 1966 F.H.C. Crick propone el balanceo de la base 5' del anticodon durante la traducción, se observa el paso de materiales a través del poro nuclear
- 1968 N. Nomura y P. Traub consiguen ensamblar ribosomas *in vitro* a partir de sus componentes.
R. Holley, H.G. Khorana y N. W. Nirenberg, premio nobel por la interpretación del código genético.
- 1969 M. Delbrück, A.D. Hershey y S.E. Luria, premio nobel por el mecanismo de replicación y la estructura genética de virus.
Comienza la ingeniería Genética, como tecnología del ADN recombinante
- 1970 R. Jonson y P. Rao sugieren los dos puntos de control (G/S y G/M) en el ciclo de la división celular, se observa en micrografías electrónicas los procesos de transcripción y traducción.
R.J. Briten y D.E. Kohne diseñan las técnicas de reasociación del ADN Eucariótico repetitivo.
H.O. Smith y K.W. Wilcox descubren la primera enzima de restricción
D. Baltimore y M. Temin: los virus ARN pasan información genética a su Anfitrión. G. Blobel y D. Sabatini, la secuencia señal para el tráfico de proteína.
- 1971 E.W. Sutherland, premio nobel por sus estudios del mecanismo de hormonas.
- 1974 R. Kornberg, el nucleosoma es la subunidad básica de empaquetamiento del ADN; N.K. Jerne, G.J.F. Kohler y C. Milstein, premio nobel 1984, describen la técnica del hibridoma, para producir anticuerpos monoclonales.
- 1975 Estructura del tARNs: anticodon triplete en el asa media, es complementario al codon, triplete en el ARNm; E. M. Southern desarrolla su

técnica de hibridación de ácidos nucleicos, con ella, A. M. Dozy et al. realizan el primer diagnóstico prenatal de una enfermedad genética, la α -talasemia.

Se inicia el diagnóstico molecular

1975 D. Baltimore, R. Dulbecco, premio nobel por mecanismos de producción de tumores por virus.

1977 W. Gilbert y A. M. Maxam describen el primer método de secuenciación de ADN.

R. Roberts y P. Sharp observan que el ARN se transcribe a partir de fragmentos discontinuos de ADN; R. Flavell y A. Jeffreys describen los intrones (secuencias intercaladas) en genes de eucariotas; La empresa Genentech patentó el proceso de clonación del ADN desarrollado por H.W. Boyer y S. Cohen, produciendo hormona del crecimiento en bacterias modificadas por ingeniería genética.

W. Arber, D. Nathans y H.O. Smith, premio nobel por descubrir las enzimas de restricción y aplicarlas a problemas de genética

molecular, se produce insulina humana por clonación de su gen en bacterias, A. Rich observa el Z-ADN por difracción de rayos X de cristales de hexanucleótidos ricos en GC; S. M. Tilghman visualiza los intrones en el gen de la globina., G. Cooper, r. Weinberg descubren los oncogenes.

R. White y A. Gimán identifican el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción, RFLP; D. Lane y A. Levine descubren la proteína p53, sintetizada por un gen supresor de tumores.

W. Gilbert y F. Sanger, premio nobel por sus métodos de secuenciación de ADN; P. Berg, premio nobel por sus estudios bioquímicos de ácidos nucleicos, ADN recombinante; C. Weismann logra producir interferón humano en bacterias, se transfiere ADN a animales modelo mediante retrovirus, primer diagnóstico de una enfermedad hereditaria, la anemia falciforme.

1982 Genentech- Lilly comercializa la insulina humana, humulina, primer fármaco recombinante ; R. Laskey primera señal de localización celular que permite la entrada de proteínas al núcleo; A. Klug, premio nobel por la aplicación de la microscopía electrónica a los complejos proteína-ácidos nucleicos; M. Barbacid, V. Notario y E. Santos identifican el primer oncogen humano, inductor de muchos tumores.

1983 K. Mullis: técnica de reacción en cadena de la ADN polimerasa (rccp), para producir ADN en cantidad, F. Gusella: marcador genético para la enfermedad de Huntington y diseño de un ensayo genético. B. McaClintock,

premio nobel por el descubrimiento de los transposones, que se trasladan de un sitio a otro en el genoma.

1984 R. Higuchi y A. Wilson: primera replicación de genes de una especie extinguida.

1985 El departamento de energía de E.U. DOE, plantea métodos para secuenciar genes de interés clínico, comercialización de proteínas recombinantes: hormona del crecimiento (protoprin), interferón (roferón).

A. Jeffreys, desarrolla la huella genética para identificar personas a partir de su material biológico, se automatiza la secuenciación del ADN.

Se autoriza una vacuna para la hepatitis B producida por ingeniería genética, H. Roderick acuña el término genómica: ciencia y métodos para localizar genes y hallar su secuencia. V.A. McKusick recopila unas 4000 alteraciones genéticas hereditarias distintas.

Se descubre que la metilación del ADN en eucariotas silencia su transcripción, Se propone el inicio del proyecto genoma humano (PGH), coordinado por la organización del genoma humano (HUGO), con sedes en Londres, Bethesda y Tokio, en EU, se crea la oficina de investigación del genoma (luego, centro nacional de investigación del genoma humano), presidida por J. D. Watson hasta 1992, se desarrollan los cromosomas artificiales de levadura (vectores YAC).

J. W. Black, G.B.Elion, premio nobel por el tratamiento con fármacos de varias enfermedades.

S. Altman y T.R. Cech, premio nobel por demostrar propiedades catalíticas en algunos ARNs, J.M. Bishop y H.E. Varmus, premio nobel por el descubrimiento de los oncogenes retrovirales.

C. Venter, desarrolla una estrategia para localizar las EST (etiquetas de secuencia expresada).

M.C. King, asocia un gen del cromosoma 17, con la aparición de cancer de mama familiar.

E.H. Fisher y E. G. Krebs, premio nobel por los mecanismos de fosforilación reversible de las proteínas, se obtienen mapas físicos del cromosoma 21(D. Cohen) y del cromosoma Y (D. Page), H. Noller demuestra que la actividad peptidiltransferasa se localiza en un ARNr .

P.A. Sharp y R. J. Roberts, premio nobel por observar genes discontinuos (intrones y exones) en eucariotas, W. Akey elabora el primer modelo tridimensional del complejo molecular del poro nuclear; A. Rosses establece la conexión entre el gen ApoE y la enfermedad de Alzheimer; K. B. Mullis, premio nobel por el método de reacción en cadena de la polimerasa, M. Smith, premio nobel por la mutagénesis dirigida mediante oligonucleótidos.

A.G. Gilman y R. Rodbell, premio nobel por descubrir las proteínas G y su papel de transducción de señales.

1996 Se secuencian los genomas de la bacteria mas pequeña, *Mycoplasma genitalium* y de la levadura de cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, affimetrix comercializa un biochip para analizar las mutaciones del virus VIH.

Se hace posible la determinación de cromosomopatias en células sanguíneas fetales, conclusión del mapa físico de alta resolución de los cromosomas X y Secuenciación completa del genoma del gusano *Caenorhabditis elegans*, El gen de bleomicina-hidroxilasa esta ligado a la enfermedad de Alzheimer, independientemente del gen ApoE, C. Venter crea celera con fondos privados para secuenciar el genoma humano en tres años, y descifra el genoma de microorganismos patógenos y de interés comercial y farmacéutico.

R. Weinberg transforma in vitro una célula humana sana en cancerosa mediante mutaciones genéticas, secuencia completa y mapa genetico del complejo mayor de histocompatibilidad en el cromosoma 6, un consorcio público (Europa, EU, Japón) secuencia el 97% del primer cromosoma humano el 22, pruebas sanguíneas para el diagnóstico del cáncer colorrectal a través de guniliclasa. Bioquímicos, biólogos molculares y geneticos ocupan puestos de responsabilidad en la reales academias de ciencias y de farmacia, mapa completo de la mosca *Drosophila melanogaster*, los políticos de EU. y Reyno unido piden el libre acceso a los datos del genoma, se descifra el mapa genético de los cromosomas humanos 5, 16, y 19, se secuencia el cromosoma 21q, que sorprende por los pocos genes que contiene, se hace la presentación del genoma humano (95% secuenciado, conjuntamente por PGH y Celera.

BLIBLIOGRAFIA

- 1.-Martinez M.S. , Saldivar S.L. Medicina legal. México. Mendez editores,2000: 178-210.
- 2.- Vargas A.E. Medicina forense y deontología médica. México. Editorial Trillas, 1991: 200-209.
- 3.- Clifton E. Melón R. James E. Safeisten R. Criminalistics an introduction to forensics science. 6a edition. EUA. 1998: 344- 351.
- 4.- Lorente A. J. A. Lorente A. M. El ADN y la identificación e n la investigación criminal y en la paternidad biológica. Madrid. Editorial comares. 1998: 65-78, 221-236.
- 5.- Luque C. J. Herraez S. A. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Madrid. Editorial harcout. 2001: 175- 188, 231-238.
- 6.- Alcocer A. Medicina legal conceptos básicos. México. Editorial limusa. 1993: 11-24.
- 7.- Panduro A. Biología molecular en la clínica. México. Ed. Macgraw-hill interamericana. 2000: 127-136.
- 8.- Soberon M. F. X. La ingeniería genética y la nueva biotecnología. México. Ed. Fce. 2000: 45-50.
- 9.- Vargas A. E. Medicina legal. México. Ed. Trillas. 1996: 268-270.
- 10.- Lozano J. A. Galindo J. D. García-Borron M. Y cols. Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud. Madrid. Macgraw hill interamericana. 2000: 220-236.
- 11.- Curtis H. Barnes S. Biología. 6a edición. Madrid. 2001: 359-366.
- 12.- Lee T. F. El proyecto genoma humano, rompiendo el código genético d la vida. EUA. Edit. Gedisa. 1994: 55-67.
- 13.- Mas Oliva J.: Diagnóstico molecular en medicina. México, ed. manual moderno; 2004:pp:71-90.
- 14.-Nicoll D.,Mcphee S. J. Et. Al.: Manual de pruebas diagnósticas, 2ª ed. México, 1999: pp: 158-159.
- 15.-Vega Navarrete M. L. La genética forense. En:Bioquimia,XXVIII, congreso nacional, suplemento A,2005, México: pp: 62-63.
- 16.-Bernard H. J. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio, 9ª ed. Masson-salvat. 1994,México: pp: 1041-1054.
- 17.- Tom Strachan y Andrew P. Read. Human Molecular Genetics 2: 2a edición, bios scientific publishers, 1999, U.K.:161-165.
- 18.-P. J. Lincoln y J. Thomsom, Forensic DNA Profiling Protocols, humana press inc. 1998, USA.:57-59, 97-101

- 19.-I. E. Alcamo, *DNA Technology, the awesome skill*, 2a ed: academic press. USA 2001: 160- 163 , 209-218.
- 20.- D. B: Goldstein y C. Schlötterer, *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press, 1999, Great Britain: pp. 198-209.
- 21.- H. Lodihs, A. Berck, S. Lawrence Zipusky, y cols. *Biología Celular y Molecular*, 4a ed., Panamericana, 2002, EUA. : pp. 271- 276.
- 22.- D. Patzelt, *History of forensic serology and molecular genetics in the sphere of activity of the German society for forensic medicine*. Inst. of legal medicine, University Würzburg, Versbacher Str. Würzburg 97078, Germany, available online 28 july 2004.
- 23.- A. Diez, C. Cabrero y cols. ,*Análisis de polimorfismo de ADN para la identificación d la paternidad y en el seguimiento de los trasplantes de médula ósea*. *Sangre ,revista de biología y patología sanguíneas*, *Sangre* 1992; 37 (4): 275- 278.
- 24.- B. Lewin, *Genes VII*, Oxford university press, 2002, U.K., pp. 108- 115.
- 25.- Lynn B.Jorde, J. C. Carey, M. J. Bamshad, *Genética médica*, 2ed., Harcourt, 2000,España: pp, 23, 42-49.
- 26.- M. Gallardo-Cabello, *Atrapados en la doble hélice*, J Watson y F. Crick 1ª ed. pangea, 1996, México: pp 9-30, 35-65
- 27.- E. Jones, A. Morris, *Lo esencial en célula y genética*, Harcourt, 1999, España: 71-79, 92,93.
- 28.- A. Barahona, D. Piñero, *Genética, la continuidad de la vida.*, 2ª edición, Fondo de cultura económica, 2000, México: 7-28, 65-85.
- 29.- Lisker R., Armendaras S., *Introducción a la genética moderna, el manual moderno*, 1994, México: 13-31, 123-125, 257-265.
- 30.- Solari A. J. ,*Genética humana: fundamentos y aplicaciones en medicina*. 3ª. ed. Argentina: Médica Panamericana, 2004: 2-11, 37-52, 67-71.
- 31.-J. Etienne, *Manual de Bioquímica genética y biología molecular*, 1ª ed, Masson, 2001, España,: pp. 388-402.
- 32.- E. Passarge, *Genética , texto y atlas*, 2ed. Médica Panamericana, 2001, Argentina: pp. 62-72, 164-167