



***"DATOS DE 15 LOCUS STR EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN
DEL VALLE DE MÉXICO"***

***Presenta:
José Ricardo García Flores***

***Director de trabajo:
Dr. En Ciencias Biomédicas. Miguel Macías Vega***



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

A mi madre Elia Flores García por los sacrificios y el apoyo brindado a lo largo de mi formación personal y profesional.

A mis profesores: Lourdes Vega Navarrete responsable de mi introducción al mundo de la Genética Forense, a Miguel Macías Vega, por permitirme formar parte de su equipo y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, a Patricia Vidal Millán por encauzar mi formación científica y profesional.

A mis compañeros de la Facultad: Diana Lizeth Aguilar Atilano, Hugo Alfredo Villesca Barrera, Luis Fernando Aguilera Cortes, José Azriel Saldivar Hernández y demás compañeros, con los que compartí horas de trabajo e ilusiones.

La ciencia es una de las formas más elevadas del quehacer espiritual pues está ligada a la actividad creadora del intelecto, forma suprema de nuestra condición humana.

René Gerónimo Favaloro

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- MARCO TEÓRICO	3
1.1.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL ADN	3
1.1.1- ADN REPETITIVO EN TÁNDEM	6
1.1.2- ADN REPETITIVO DISPERSO	8
2- POLIMORFISMOS DEL ADN	8
2.1- POLIMORFISMOS DE ADN CODIFICANTE.	9
2.2- POLIMORFISMOS DE ADN REPETIDO EN TÁNDEM	9
2.2.1- UN PERFIL DE ADN BASADO EN LOCUS STR	13
2.3- OTROS POLIMORFISMOS DE ADN.	14
2.4- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENÉTICA FORENSE	14
3.- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE ADN POR PCR	17
3.1- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR	17
3.2- APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE PCR EN GENÉTICA FORENSE	18
4- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS STR POR PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR	18
4.1- CÁLCULOS DE FRECUENCIA EN LOS PERFILES DE ADN	20
4.1.1- Frecuencias génica y genotípica.	20
4.1.2- Probabilidad para un perfil de ADN de múltiples loci	22
4.1.3- Evolución de las poblaciones	24
4.1.4- Reportes de frecuencias alelicas en la población mexicana.	24
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27

III.-HIPÓTESIS	27
IV.-OBJETIVOS	27
V.- MATERIAL Y MÉTODOS	27
1.- MATERIAL Y EQUIPO	27
2.- MATERIAL BIOLÓGICO	28
3.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS	28
3.1.-EXTRACCIÓN DEL ADN	29
4.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN	30
5.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN	30
5.1-REACCIÓN DE PCR	31
5.1.1.-PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN	31
5.1.2-CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS	32
6.-DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS EN EL SECUENCIADOR DE ADN	33
6.1.-PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	33
6.2.- ELECTROFORESIS Y DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE FRAGMENTOS MARCADOS CON FLUORESCENCIA	33
7.-DIAGRAMA DE FLUJO	35
V.-RESULTADOS	36
1.-RESULTADOS GENÉTICO-POBLACIONALES	36
1.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN	36
1.1.1.-Determinación de frecuencias alelicas	36
1.1.2.-Análisis del equilibrio genético	36
1.2.- ESTUDIO COMPARATIVO CON OTRAS POBLACIONES	55
1.2.1.-Locus D8S1179.	56
1.2.2. - Locus D21S11.	57

1.2.3.- Locus D7S820	59
1.2.4.- Locus CSFIPO	60
1.2.5.- Locus D3S1358	61
1.2.6.- Locus THO1.	63
1.2.7.-Locus D13S317.	64
1.2.8.- Locus D16S539.	65
1.2.9.- Locus D2S1338.	66
1.2.10.- Locus D19S433.	68
1.2.11.- Locus vWA.	69
1.2.12.- Locus TPOX.	70
1.2.13.- Locus D18S51.	71
1.2.14.- Locus D5S818.	73
1.2.15.- Locus FGA.	74
VI.- DISCUSIÓN	76
VII. – CONCLUSIONES	78
VIII. – REFERENCIAS	79
ANEXO	89

I.- INTRODUCCIÓN

Desde hace casi un siglo, para estudiar las variaciones entre individuos se utilizan los llamados Polimorfismos Genéticos o Marcadores Genético-Moleculares, los cuales son caracteres estables que se transmiten por herencia mendeliana simple y constituyen una expresión de la diversidad genética entre individuos de la misma especie.

En general las características que debe poseer un buen marcador genético, desde el punto de vista forense, son las siguientes:

- Patrón de herencia bien establecido
- Elevado polimorfismo.
- Alto grado de heterocigosidad.
- Detección fiable de los alelos.
- Datos poblacionales de frecuencias alélicas, fenotípicas y/o genotípicas establecidas.
- Herencia independiente de los otros marcadores usados.
- Tasa de mutación baja.
- Analizable mediante un método simple, rápido y reproducible.
- Precisar poco material para el análisis.

Hace algunos años los análisis forenses estaban basados fundamentalmente en el estudio de marcadores genéticos convencionales (antígenos eritrocitarios y leucocitarios, proteínas séricas y enzimas eritrocitarias). En la década de los 80 se consigue un avance espectacular en el campo de la genética forense a raíz del descubrimiento de las regiones hipervariables del ADN. A partir de este momento, la utilidad de los polimorfismos clásicos va disminuyendo conforme se generaliza el estudio de estos nuevos marcadores, mucho más informativos, debido principalmente a la gran variabilidad y estabilidad química del ADN, así como la alta sensibilidad de las técnicas que lo analizan.

Los polimorfismos de ADN hipervariables poseen tal capacidad identificadora que son considerados, hoy en día, un instrumento de elección en la resolución pericial de casos en Genética Forense.

Para que cualquier polimorfismo pueda ser utilizado en la práctica forense es preciso conocer los valores que expresen la frecuencia alélica y genotípica en la población implicada y comprobar que se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población donde va a ser utilizado mediante la creación de bases de datos de población para los locus STR estudiados.

1.- MARCO TEÓRICO

1.1.-ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL ADN

El ácido desoxirribonucleico (**ADN**), es la molécula que contiene toda la información genética del individuo.

Cada molécula de ADN está constituida por dos cadenas de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un:

1.- Grupo fosfato (Ácido fosfórico)

2.-Una desoxirribosa

3.-Base nitrogenada

Los nucleótidos se diferencian por sus bases nitrogenadas divididas en dos grupos: dos purinas denominadas adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidinas denominadas citosina (C) y timina (T). (Figura 1).

Los nucleótidos de cada una de las dos cadenas que forman el ADN establecen una asociación específica con los correspondientes de la otra cadena. Debido a la afinidad química entre las bases, los nucleótidos que contienen adenina se acoplan siempre con los que contienen timina, y los que contienen citosina con los que contienen guanina El complemento es el siguiente:

- Adenina (A) con Timina (T)--->A - T
- Citosina (C) con Guanina (G)->C – G

Las cadenas de ADN forman una especie de escalera retorcida que se llama doble hélice y fue descubierta en 1953 por James Watson y Francis Crick. [1] (Figura 2).

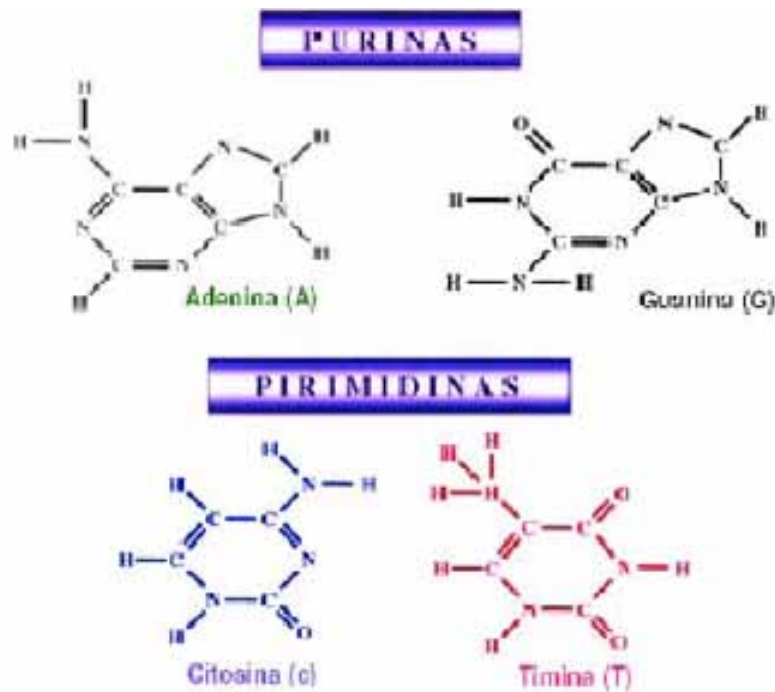


Figura 1. Las bases presentes en los ácidos nucleicos. Las bases guanina (G), adenina (A) y citosina (C) existen en el ADN y el ARN. La timina (T) sólo se encuentra en el ADN y es substituida en el ARN por el uracilo (U). Estas bases están unidas covalentemente a los azúcares desoxirribosa y ribosa, para formar así los nucleótidos del ADN y ARN, respectivamente. (Voet & Voet, 1995). [2]

La estructura, de la molécula del ADN es bicatenaria; es decir: esta formada por dos cadenas dispuestas de forma antiparalela y con las bases nitrogenadas enfrentadas. En su estructura tridimensional, se pueden distinguir distintos niveles:

1. Estructura primaria:

- Es la secuencia de nucleótidos encadenados. Es en estas cadenas donde se encuentra la información genética, y dado que el esqueleto es el mismo para todos, la diferencia de la información radica en la distinta secuencia de bases nitrogenadas. Esta secuencia presenta un código, que presenta una información u otra, según el orden de las bases.

2. Estructura secundaria:

- Es una estructura en doble hélice. Permite explicar el almacenamiento de la información genética y el mecanismo de duplicación del ADN.

- Es una cadena doble, donde ambas cadenas son complementarias, pues la adenina de una se une a la timina de la otra, y la guanina de una a la citosina de la otra. Ambas cadenas son antiparalelas, pues el extremo 3' de una se enfrenta al extremo 5' de la otra.

3. Estructura terciaria

- Se refiere a como se almacena el ADN en un volumen reducido. Varía según se trate de organismos procariotas o eucariotas:

En procariotas: se pliega como una súper-hélice en forma, generalmente, circular y asociada a una pequeña cantidad de proteínas. Lo mismo ocurre en las mitocondrias y en los cloroplastos de las células eucariotas.

En eucariotas: el empaquetamiento es más complejo y compacto y para esto necesita la presencia de proteínas, como son las histonas y otras de naturaleza no histona (en los espermatozoides las proteínas son las protaminas).

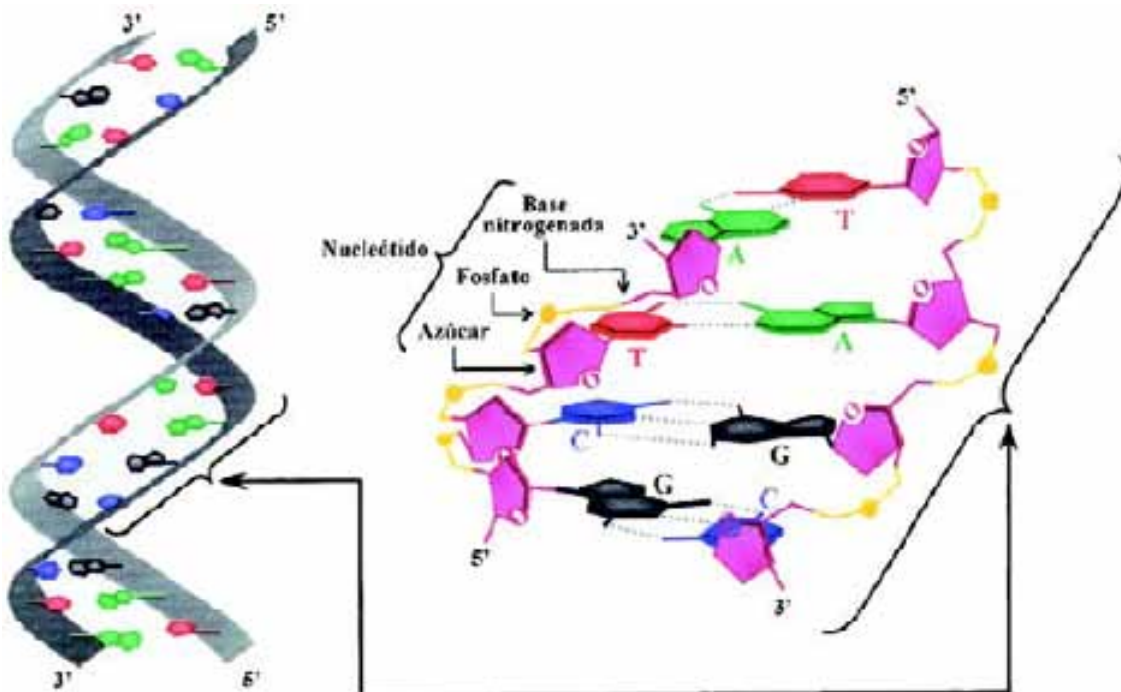


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de la doble hélice del ADN. (Voet & Voet, 1995). [2]

Todo el material genético contenido en las células de un organismo se denomina genoma y, según su localización podemos identificar un genoma complejo nuclear y un genoma mitocondrial simple.

En el genoma existen dos tipos de ADN, según la función biológica que desempeñen:

-ADN Codificante (30%). Este tipo de ADN, tiene una función conocida, como por ejemplo la expresión de un gen cuyo producto final es una proteína.

-ADN No Codificante (70%). Comprende secuencias de ADN transcripcionalmente inactivas de funciones diversas (como por ejemplo, promotores de genes) y, en otros muchos casos, de función desconocida o sin función aparente. Este tipo de ADN, por ser altamente polimórfico, tiene una gran aplicación en la identificación de individuos y se clasifica en:

- **ADN de Copia Única.** Está compuesto por secuencias que se encuentran repetidas una o muy pocas veces en el genoma. Se cree que puede actuar como espaciador entre regiones codificantes de ADN.
- **ADN de Copia Múltiple.** Las secuencias de este tipo de ADN, también denominado ADN repetitivo, pueden ser altamente repetitivas, moderadamente o poco repetitivas. Podemos clasificarlas en base a sus dos características más importantes: su disposición a lo largo del genoma y el tamaño de la unidad de repetición. Se pueden reconocer dos grupos principales:

ADN repetitivo en tándem (10% del genoma). Se compone de bloques de secuencias repetitivas agrupadas en tándem. Según el tamaño de la unidad de repetición se subdivide en tres tipos: ADN satélite, ADN minisatélite y ADN microsatélite.

ADN repetitivo disperso (15-20% del genoma). Las unidades de repetición no se agrupan, sino que aparecen dispersas a lo largo del genoma. Está representado por 2 familias: SINEs y LINEs (*ver más adelante*)

1.1.1- ADN REPETITIVO EN TANDEM

Los distintos componentes de este tipo de ADN repetitivo adoptan un patrón de distribución cromosómica diferente: El ADN satélite se sitúa en la región Centromérica, el ADN minisatélite en los telómeros o en sus proximidades, y el ADN microsatélite aparece disperso por todo el cromosoma.

Las secuencias de ADN repetido en tándem se distribuyen por el genoma de dos maneras. [3]

-Tipo I. Grandes bloques formados por repeticiones de distintas unidades de longitud variable.

-Tipo II. Pequeños bloques distribuidos a lo largo del genoma, con un número variable de unidades de repetición de secuencia similar. Pertenecen a este tipo los minisatélites y los microsatélites

- **ADN Satélite.** Las secuencias repetitivas se disponen en grandes bloques de diversas unidades de complejidad variable, con una longitud desde 100 Kilo bases (Kb) a varias Mega bases (Mb). Este tipo de ADN no se transcribe y al organizarse de un modo tan complejo es difícil su aplicación al campo forense.
- **ADN Minisatélite.** El término minisatélite se debe a Jeffreys, quien lo uso para designar un loci de ADN repetitivo de un tamaño menor que el de los satélites clásicos. [4]. Los bloques de secuencia de este ADN poseen un tamaño aproximado entre 0.1 y 40kb y la unidad de repetición es de 10-100 pb. Tiene un alto grado de variabilidad, tanto en el número de repeticiones en tándem como en la secuencia de la unidad de repetición, por lo que ante tamaños idénticos podemos estar frente a alelos diferentes.

Ambos tipos de fragmentos de ADN Satélite y Minisatélite fueron denominados “*Variable Number of Tandem Repeats*” (**VNTRs**), aludiendo a la variación en el número de unidades de repetición de cada fragmento. Tomado en sentido estricto, este término podría aplicarse a cualquier tipo de ADN repetitivo y no exclusivamente al minisatélite, y además al hacer referencia solo al número de repeticiones, los minisatélites monomórficos en poblaciones humanas no podrían incluirse. [5]

En el genoma humano los minisatélites se distribuyen al azar. Se localizan preferentemente en las regiones subterminales de los cromosomas. que son las implicadas en los fenómenos de recombinación, sobre todo en línea germinal masculina. [6]

- **ADN Microsatélite.** Los microsatélites fueron llamados así por su pequeño tamaño, hasta unas 400 pb, lo que los hace especialmente idóneos para técnicas de amplificaron in vitro mediante la Reacción en Cadena de La Polimerasa abreviada **PCR** (acrónimo en ingles de Polymerase Chain Reaction). También se conocen como *Short Tandem Repeats* (**STRs**) pues la unidad de repetición oscila entre 2 y 7 pb. [7]. Se encuentran ampliamente repartidos por todo el genoma.

Basándose en la longitud de la unidad de repetición y el número de veces que ésta se repite, junto con las posibles variaciones en secuencia, Urquhart los clasifica en STRs simples, compuestos y complejos. [8] Posteriormente Brinkman propone una clasificación alternativa: STRs con baja microvariabilidad, intermedia y alta microvariabilidad. [9]

1.1.2.- ADN REPETITIVO DISPERSO

Está representado por dos familias que se diferencian en el número de nucleótidos que constituyen la unidad de repetición. [10] Algunos componentes de estas familias pueden ser considerados como transposones (elementos genéticos móviles), que son fragmentos inestables de ADN con capacidad migratoria. [11]

-“*Short Interspersed Nuclear Elements*” (**SINEs**). Representan alrededor del 10% del genoma. Los constituyen repeticiones menores de 500pb. La familia más representativa y mejor estudiada es la *Alu*, llamada así por presentar un lugar de reconocimiento para la enzima de restricción *Alu*. [12]

Las secuencias *Alu* son las más abundantes en el genoma humano y tienen una secuencia muy conservada de unas 300pb relativamente rica en guaninas y citosinas. Se localizan en las regiones eucromatínicas, preferentemente en las llamadas “bandas R” o bandas reversas (de replicación precoz), que son las regiones cromosómicas más activas a nivel transcripcional.

Existen otras familias, como la “*Non transcribed Spacer*” (**NTS**) que se localizan en primer lugar en la región homónima del ADN ribosómico. [13]

- “*Long Interspered Nuclear Elements*” (**LINES**). Suponen del 2 al 5 % del genoma. Están constituidos por secuencias repetitivas mayores de 500 pb. El *LINE-1* o familia *L1*, llamada también *Kpn*, es el LINE más abundante en humanos, presentando un número elevado de repeticiones. Los elementos *L1* se localizan principalmente en la eucromatina, al igual que la familia *Alu*, pero en este caso a nivel de las “bandas G” (de replicación tardía) obtenidas al teñir los cromosomas con Giemsa.

2- POLIMORFISMOS DEL ADN

La mayoría del ADN de un individuo es idéntico al de otras personas. Sin embargo, hay regiones heredadas del ADN que pueden variar de una persona a otra. Las variaciones en la secuencia del ADN entre individuos se denominan “**polimorfismos**”. Las secuencias con un alto grado de polimorfismo son muy útiles para el análisis de ADN en casos de medicina legal y en pruebas de paternidad.

El término polimorfismo fue empleado para designar “la aparición conjunta en un lugar de dos o más formas discontinuas de una especie, de tal manera que la más rara de ellas no se puede mantener simplemente a través de la mutación periódica”. [14] En la práctica para que un locus sea considerado polimórfico, el alelo más común para ese locus debe tener una frecuencia poblacional menor del 99% y, de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, al menos un 2% de la población debe ser heterocigoto para ese locus.

En el ADN codificante existe poca variabilidad individual, exceptuando la región que codifica para los antígenos leucocitarios humanos abreviados **HLA** (acrónimo en inglés de *Human leukocyte antigen*). El margen de variación permitido es muy bajo y los polimorfismos suelen acompañarse de modificaciones fenotípicas. Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base hasta cambios en número y/o tamaño en la unidad de repetición. Pueden dividirse en dos tipos:

-Polimorfismos de secuencia. Se producen por el cambio de uno (mutación puntual) o más nucleótidos en una secuencia de ADN, suelen ser poco polimórficos.

-Polimorfismos de Longitud. Se producen por la inserción o deleción de uno o más nucleótidos. Este tipo es el más abundante en ADN repetitivo, sobre todo en el ADN mini y microsatélite.

Los loci minisatélites y microsatélites están formados, como ya hemos visto, por repeticiones en tándem de secuencias similares que varían en longitud, pudiéndose acompañar simultáneamente por polimorfismos de secuencia. La causa de la variación se supone distinta en ambos casos. Para minisatélites se piensa en un mecanismo de conversión génica, frecuentemente inducida por regiones con función similar a un transposón. En el caso de los microsatélites, según Armour la causa principal parece ser ocasionada por un deslizamiento de unidades de repetición durante la replicación [15], aunque Jeffreys postula que también la conversión génica, puede ser un mecanismo preferente de variabilidad. [16]

2.1- POLIMORFISMOS DE ADN CODIFICANTE

Aunque muy pocos marcadores de secuencia única son buenos candidatos para usos forenses [17, 18], el primer sistema amplificado por PCR con este fin fue un polimorfismo de la región HLA, el locus HLA DQA1. [18,19, 20] Este polimorfismo de secuencia se detecta por *dot-blot* reverso del producto de PCR con un panel de sondas de oligonucleótidos específicas de alelo (ASO), inmovilizadas sobre una membrana de nailon [21], que reconocen cada alelo del sistema.

2.2- POLIMORFISMOS DE ADN REPETIDO EN TÁNDEM

De todos los polimorfismos analizables por PCR, los de mayor interés médico legal pertenecen a los tipos minisatélites y, sobre todo, microsatélite. Ambos son particularmente útiles por ser altamente polimórficos y presentar un alto grado de heterocigosidad, dado que estos polimorfismos se deben a diferencias en el número de copias las unidades repetitivas que representan los distintos alelos, pueden detectarse tras la PCR mediante electroforesis, generalmente en geles de agarosa o poliacrilamida, como polimorfismos de longitud variable.

Cuando se trata de analizar la secuencia de algunos minisatélites se observa que raramente las unidades de repetición son iguales [22]. Este polimorfismo de secuencia puede determinarse junto con el polimorfismo de longitud por medio de una técnica denominada “*Minisatellite Variant Repeat*” (**MVR**).

-Los loci minisatélites que pueden ser amplificados por PCR se denominaron *Amplified Length Polymorphisms* (**AMPFLPs**) [23]. Generalmente tienen unidades de repetición larga en múltiples copias y fragmentos alélicos de alto peso molecular. A pesar de los buenos resultados que se obtienen con esta técnica, que conjuga la alta variabilidad de los VNTRs con la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR, no se debe olvidar que los productos de amplificación son de un tamaño relativamente grande, lo que puede constituir un factor limitante cuando las muestras se encuentran degradadas.

Los AMPFLPs fueron introducidos en el campo forense por Kasai [24]. Los más utilizados son los loci D1S80 (pMCT118) [24, 25], D17S (YZN22) [26, 27], COL2A1 [28, 29], 3'ApoB [30]. De ellos, el más empleado es el sistema D1S80 (unidad de repetición de 16 pb y 29 alelos), que tiene a su favor una elevada heterocigosidad, pero con el inconveniente de que en muestras muy deterioradas se puede potenciar la amplificación de los alelos de menor tamaño. Esto conduciría al error de tipificar como homocigoto una muestra en la que no se amplificó el alelo de mayor tamaño.

-Los minisatélites como ya se ha visto poseen dos tipos de variación una debida a la longitud (dependiendo del número de repeticiones, VNTRs) y otra ocasionada por diferencias en la unidad de repetición, lo que se denomina **MVR**.

En la actualidad este polimorfismo puede determinarse mediante PCR (MVR-PCR), técnica de gran sensibilidad y que posee una elevada capacidad de discriminación, cuyas bases metodológicas fueron descritas por Jeffreys y Tamaki [31, 32]. La introducción de secuenciadores automáticos ha puesto un gran avance en la automatización del análisis MVR-PCR facilitando su aplicación práctica [33]. Hay que destacar que el análisis no está sujeto a errores de medición en la migración de los fragmentos ni a fenómenos de distorsión en los geles.

La MVR-PCR es una técnica relativamente sensible con pequeñas cantidades de ADN e incluso se puede aplicar a muestras parcialmente degradadas, pero no se aconseja su uso para análisis de mezclas de muestras, ni en casos forenses de paternidad.

-MICROSATÉLITES. Son secuencias pequeñas de ADN repetidas en tándem (STRs), constituidas por unidades de 2 a 7 pb que se repiten un número variable de veces de forma consecutiva, en una región específica del genoma, y que dan lugar a alelos de tamaño aproximado entre 80 y 400 pb; el número de veces que se repite esta secuencia entre un individuo y otro da lugar a los polimorfismos en STR [34]. Su gran utilidad se puso de manifiesto rápidamente

debido a su abundancia, distribución bastante regular por el genoma, naturaleza polimórfica y su pequeño tamaño, que los hace idóneos para ser amplificados por PCR [34, 35, 36]. Fueron introducidos en el campo forense a principios de la década de los noventa por Edwards, Polymeropoulos y Tautz, entre otros investigadores. [7, 37, 38]

El polimorfismo de los microsatélites se debe a la variación en el tamaño de los alelos, pero también pueden presentar variaciones en la secuencia de la unidad de repetición [39]. Urquhart y colaboradores, clasificaron los STRs en simples, compuestos y complejos. Brinkman propone denominarlos STRs con microvariabilidad baja, intermedia y alta. [7, 8, 9]

- **STRs Simples o de Baja Microvariación.** Están formados por dos o más unidades de repetición contiguas e idénticas, tanto en longitud como en secuencia. La diferencia en el tamaño entre los distintos alelos es de una unidad de repetición. La presencia de alelos intermedios es excepcional. Son de fácil tiraje, pero tienen el inconveniente de su baja heterocigosidad.

Entre los STRs simples más usados están HUMTHO1 [7], HUMF13A, HUMFES/FPS [40], que contiene la unidad de repetición tetranucleotídica y HUMCD4, cuya unidad es pentanucleotídica y que presenta importantes diferencias poblacionales [41].

- **STRs compuestos o de microvariación intermedia.** Los sistemas comprenden 2 o más unidades de repetición contiguas diferentes, que varían tanto en secuencia como en longitud. El de mayor interés forense es HUMVWA31/A. [42]
- **STRs Complejos o de alta microvariación.** Pueden contener varios bloques de unidades de repetición de longitud variable, con secuencias intermedias más o menos variables. Son frecuentes los alelos y las sustituciones simples de bases en algunas unidades, lo que ocasiona importantes variaciones tanto estructurales como en tamaño, produciéndose problemas de designación de alelos. Son los STRs más difíciles de tipificar y se acompañan también de una tasa de mutación más alta. Los más utilizados son HUMACTBP2 (SE33) [43], HUMD21S11 [44] y HUMF1BRA/FGA [45], que presentan una alta tasa de heterocigosidad.

Actualmente parece que se están acumulando evidencias a favor de que incluso los microsatélites más simples presentan algún grado de variabilidad interna en su estructura, por lo que la clasificación anterior sería cuestionable. Existen STRs relativamente simples y extremadamente variables al mismo tiempo, como D12S391 y D1S1656, en los que la asociación directa entre variabilidad y la complejidad no es sostenible [46, 47].

Las grandes ventajas de los STRs son su estabilidad y la posibilidad de realizar PCR *multiplex*, amplificando varios loci simultáneamente. [48]

Además su análisis se ha facilitado con el uso de fluorocromos y secuenciadores automáticos de ADN. [49] Sus aplicaciones son muy diversas, como construcción de mapas genéticos, estudios de poblaciones, análisis de ligamento en enfermedades genéticas, investigación del cáncer, estudios forenses, etc.

Los más abundantes y fáciles de amplificar son los que contiene 2 pb como unidad de repetición, pero ciertos problemas técnicos, como la presencia de bandas inespecíficas generadas durante la amplificación hacen que se utilicen principalmente STRs con repeticiones de 4 pb más apropiados para fines forenses. [34]

Cuando se parte de ADN altamente degradado, la síntesis de los AMPFLPs suele ser negativa, mientras que la amplificación de STRs proporciona generalmente resultados satisfactorios. [50, 51, 52]

En los laboratorios forenses la tendencia actual viene marcada por la utilización de STRs simples e hipervariables. [46, 47]

En noviembre de 1997, el FBI seleccionó 13 STR para servir como la base de su sistema combinado del índice de DNA **CODIS** (*Combined DNA Index System*) Estos marcadores son CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, y D21S11. En la tabla 1 se pueden observar los 13 locus genéticos de STR.

Hay muchas ventajas en el sistema STR de CODIS:

- El sistema CODIS ha sido adoptado por numerosos analistas de ADN forense.
- Los alelos STR se pueden determinar con rapidez empleando ensayos comerciales (*kits*).
- Los alelos STR son discretos (es decir, de número reducido) y se comportan según los principios establecidos de genética de poblaciones.
- Los datos son digitales y, por tanto, adecuados para las bases de datos informatizadas.
- Laboratorios de todo el mundo están contribuyendo al análisis de frecuencia de alelos STR en distintas poblaciones humanas.
- Los perfiles STR se pueden determinar a partir de cantidades muy pequeñas de ADN.

2.2.1- UN PERFIL DE ADN BASADO EN LOCUS STR

Para el análisis de perfiles de ADN relacionados a polimorfismos STR se creó un perfil de ADN, basado en los 13 loci que conforman la base de datos nacional de los EE.UU. llamada CODIS. A continuación se muestra un perfil de ADN para estos 13 locus (TABLA 1).

TABLA 1

Locus	D3S1358	vWA	FGA	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818
Genotipo	15	16	19	12	29	12	11
	18	16	24	13	31	13	13

Locus	D13S317	D7S820	D16S539	THO1	TPOX	CSF1PO	AMEL
Genotipo	11	10	11	9	8	11	X
	11	10	11	9,3	8	11	Y

Modificado de Hallick R [53]

Los laboratorios que participaron en este proyecto, evaluaron 17 posibles loci, los cuales estaban disponibles como kits de las casas comerciales Promega Corporation (Madison, WI) o Applied Biosystems (Foster City, CA)

En julio de 2000 Applied Biosystems en un esfuerzo de encontrar loci con alta variabilidad, lanzo su kit Identifiler versión 16plex, que amplifica los 13 loci del CODIS, la amelogenina, y dos loci de tetranucleotidos (D2S1338 y D19S433). Así, la utilización de estos STR se ha dado por la selección de loci para los cuales ya se contaba con kits comerciales, así como su inclusión en las bases de datos o bien que ya habían sido previamente utilizados para estudios forenses. [54]

Los 15 marcadores que se analizaron en este trabajo: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D5S818 y FGA, más el marcador Amelogenina que determina el sexo, presentan un patrón de herencia establecido, un elevado polimorfismo, alto grado de heterocigosidad y una tasa de mutación baja, esto aunado al hecho de contar con frecuencias genotípicas establecidas, los convierte en marcadores genéticos ideales para estudios forenses de identificación humana y casos de filiación.

La información con respecto a la estructura de la repetición y al número de los alelos observados para cada loci de STR está disponible en la tabla 2. [55]

Los marcadores STR se han convertido en herramientas importantes en las pruebas de identificación humana debido a su alto grado de variabilidad, facilidad de empleo en formatos de kits comerciales que permiten la amplificación de múltiples STR en una sola reacción de PCR, y la puesta en práctica de la bases de datos de ADN. La utilización de un conjunto uniforme de loci STR en las bases

de datos proporciona la capacidad para compartir los perfiles ADN tanto nacional como internacionalmente. Los loci empleados actualmente en las pruebas de identificación humana han demostrado su utilidad al ayudar a la resolución de numerosos casos criminales, así como en las pruebas de filiación, ya que el perfil de STR que resulta tiene un alto poder de discriminación entre individuos relacionados y sin relación.

2.3- OTROS POLIMORFISMOS DE ADN.

En el ADN mitocondrial (ADN *mt*), la zona más variable se conoce como D-Loop y se han analizado dos regiones de gran interés en genética de poblaciones. La dotación mitocondrial es haploide y se hereda exclusivamente por vía materna, lo que facilita el análisis de divergencias de secuencias, aunque esta misma propiedad hace que este ADN no sea útil para el estudio de la paternidad.

El ADN *mt*, mucho más abundante que el genómico, es ideal para el análisis de cabellos y pelos sin bulbo, muestras muy envejecidas como restos óseos de gran antigüedad y en general, vestigios en los que no sea posible analizar ADN nuclear. La amplificación por PCR de regiones hipervariables del D-Loop y la posterior determinación de esta variabilidad por secuencias es el método más empleado para la resolución de estos casos. [56, 57]

El cromosoma Y de herencia exclusivamente paterna, ha suscitado un renovado interés tanto antropológico como médico-legal. Actualmente se analizan fundamentalmente haplotipos de STRs, el minisatélite MSY1 por MVR-PCR, mutaciones puntuales y algunas duplicaciones, inserciones y deleciones.

2.4- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENÉTICA FORENSE.

Desde hace poco más de una década, la tecnología del ADN ha permitido el estudio de la variabilidad humana mediante el análisis directo del propio material genético y no a través del análisis de las proteínas codificadas por éste.

Wyman y White dieron el primer paso en la identificación genética por medio del ADN al descubrir un locus polimórfico caracterizado por un número de fragmentos de restricción de longitud variable, aunque el verdadero auge de los polimorfismos del ADN se inicia con Jeffreys y colaboradores, sus introductores en el campo forense. [58]

Datos de 15 Loci STR en una muestra de la Población del Valle de México

Tabla 2. Información de los 13 loci STR utilizados en la base de datos CODIS del FBI y otros marcadores de STR presentes en kits comerciales.

Nombre del Locus	Localización Cromosómica	Secuencia repetida	Acceso en Genbank	Rango del Alelo	Numero de Alelos vistos
CSF1PO	5q33.1 c-fms proto-oncogene, 6 th intron	TAGA	X14720	6–16	15
FGA	4q31.3 a-Fibrinogen, 3 rd intron	CTTT	M64982	15–51.2	69
TH01	11p15.5 Tyrosine hydroxylase, 1 st intron	TCAT	D00269	3–14	20
TPOX	2p25.3 Thyroid peroxidase, 10 th intron	GAAT	M68651	6–13	10
VWA	12p13.31 von Willebrand factor, 40 th intron	[TCTG][TCTA]	M25858	10–24	28
D3S1358	3q21.31	[TCTG][TCTA]	NT_005997	9–20	20
D5S818	5q23.2	AGAT	G08446	7–16	10
D7S820	7q21.11	GATA	G08616	6–15	22
D8S1179	8q24.13 [[TCTA][TCTG]	G08710	8–19	13
D13S317	13q31.1	TATC	G09017	5–15	14
D16S539	16q24.1	GATA	G07925	5–15	10
D18S51	18q21.33	AGAA	L18333	7–27	43
D21S11	21q21.1	Complex [TCTA][TCTG]	AP000433	24–38	70 Other
Otros STRs incluidos en los kits de Promega o Applied Biosystems.					
Penta D	21q22.3	AAAGA	AP001752	2.2–17	14 alelos
Penta E	15q26.2	AAAGA	AC027004	5–24	21 alelos
D2S1338	2q35	[TGCC][TTCC]	G08202	15–28	14 alelos
D19S433	19q12	AAGG	G08036	9–17.2	15 alelos
SE33	6q15	AAAG	V00481	4.2–37	>50 alelos

Modificado de Butler JM. [54]

Los primeros en utilizarse con este fin fueron los denominados “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (**RFLPs**). [4, 59], estos son polimorfismos de ADN en minisatélite basados en la longitud de los fragmentos de restricción. Se identificaron mediante la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción y posterior hibridación con sondas.[60] Un problema legal de inmigración en el Reino Unido fue el primer caso resuelto satisfactoriamente con ayuda de estos polimorfismos. [61]

En un primer momento se utilizaron las denominadas sondas multilocus (MLPs, *Multilocus Probes*), que detectan múltiples loci minisatélites bajo condiciones poco rigurosas de hibridación, dando lugar a un complejo patrón de bandas. Este patrón de bandas múltiples corresponde a distintos loci con secuencias relacionadas entre si. Jeffreys y su equipo consideraron que estos patrones serian prácticamente específicos para cada individuo y los denominaron “huellas genéticas” (*DNA fingerprints*).

Poco tiempo después se comienzan a utilizar sondas que permiten detectar un único locus [22,5], las denominadas sondas unilocus (SLPs, *Single Locus Probes*) que proporcionan una o dos bandas según el carácter homocigoto o heterocigoto del individuo para ese locus. De esta manera se obtiene un perfil unilocus de ADN (*DNA profiling*).

Hoy en día solo las sondas unilocus debidamente caracterizadas están reconocidas para usos forenses. [62] Han supuesto una evidente mejora metodológica en la investigación biológica de la paternidad, pero existen importantes limitaciones para su uso en criminalística. Un método alternativo, y en determinados casos mucho más recomendable que el empleo de sondas, lo constituye la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). [63, 64], como se verá mas adelante.

En los últimos años se han desplegado nuevas tecnologías, especialmente encaminadas al análisis de STRs, como por ejemplo:

-**LightCycler®**. Esta tecnología permite llevar a cabo, en una misma reacción, la amplificación de un fragmento de ADN y la detección por fluorescencia, en tiempo real, de la hibridación con dos sondas independientes. Es de una gran especificidad y permite la cuantificación exacta del producto del amplificado y la detección de posibles mutaciones.

-**Chips o Arrays** de ADN. Son sistemas en miniatura que se incorporan de cientos a cientos de miles de sondas alelo-especificas (ASO, *Allele Specific Oligonucleotides*). Si el fragmento de ADN diana, marcado mediante la incorporación de un grupo fluorescente durante la PCR, híbrida con la sonda complementaria, se detecta una señal de fluorescencia que es recogida a través de sistemas automatizados

-Espectrofotometria de masas. Permite el análisis de una muestra en cuestión de segundos, sin la necesidad de emplear escaleras alelicas, pero de momento solo es utilizable para fragmentos de ADN menores de 100 pb. Los productos a analizar se cristalizan conjuntamente con una pequeña matriz orgánica, se volatilizan y se someten a un campo eléctrico en fase gaseosa. Se determina el peso molecular del ADN en función del tiempo empleado en el recorrido hasta llegar a un detector, ya que el tiempo es proporcional a la masa del fragmento de ADN.

-Electroforesis capilar. Se basa en la diferente velocidad de migración de las partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico, en la cual los fragmentos de ADN se separan en función de su tamaño y la carga eléctrica total de cada uno. [65]

3.- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE ADN POR PCR.

La principal limitación que presenta el empleo de sondas es que el análisis debe realizarse con ADN integro y en cantidad suficiente. Otros problemas añadidos son la laboriosidad del método, el tiempo del análisis (no menor de dos días) y la difícil estandarización de esta técnica.

La introducción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) vino a revolucionar en gran medida muchas de estas dificultades. Esta técnica ha supuesto un avance metodológico de enorme repercusión en genética forense, ya que nos permite trabajar con cantidades ínfimas de ADN aun estando degradado. Otras ventajas adicionales de la PCR son la rapidez, la sencillez, facilidad de interpretación y menor costo de la determinación, además de proporcionar una buena sensibilidad y especificidad.

3.1- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR

La PCR es una técnica de amplificación in vitro de pequeñas secuencias de ADN que permite sintetizar millones de copias idénticas a partir de una cadena única. Se basa en la facilidad que posee el ADN por desnaturalizarse y renaturalizarse

La técnica amplifica fragmentos específicos de ADN a partir de cantidades mínimas del ADN patrón, aún cuando ese ADN sea de calidad relativamente baja. Comprende la preparación de la muestra del ADN y de una mezcla maestra de cebadores (secuencias de aproximadamente 20-30 nucleótidos de longitud), y luego la detección de los productos de reacción

La ADN polimerasa, conocida como 'Taq polimerasa', se denominó así por la bacteria *Thermus aquaticus* que fue aislada originalmente de aguas termales. [66] Esta enzima puede resistir las altas temperaturas necesarias para la separación

de las cadenas del ADN, permaneciendo en el tubo de la reacción. El ciclo de calentamiento y enfriamiento se repite una y otra vez, lo que estimula a los cebadores a unirse a las secuencias originales y a las secuencias recién sintetizadas. La enzima volverá a alargar las secuencias del cebador. Este ciclo de temperaturas produce copias y luego copias de copias, y así sucesivamente, lo que lleva a un aumento exponencial del número de copias de determinadas secuencias. Dado que la cantidad de ADN colocado en el tubo al comienzo es muy pequeña, casi todo el ADN presente al final de los ciclos de reacción pertenece a secuencias copiadas.

3.2.- APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE PCR EN GENÉTICA FORENSE.

Mientras que al principio varias categorías de polimorfismos de ADN podrían utilizarse con fines de identificación, la mayor parte de los marcadores usados en Genética Forense pertenecen a la categoría del ADN altamente repetitivo.

La amplia lista de polimorfismos amplificables por PCR continúa incrementándose a medida que se estudian nuevos loci.

4.- ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS STR POR PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR.

Los marcadores STR ofrecen un número de ventajas con respecto a los métodos previamente usados para la tipificación de DNA incluyendo la capacidad de obtener resultados de muestras de DNA degradadas y cantidades extremadamente pequeñas de DNA. [67] El proceso es bastante rápido y los resultados se pueden obtener rutinariamente en menos de un día laborable. La figura 3 ilustra cómo un marcador STR dentro de un modelo de DNA se alinea en forma delantera y reversa en una PCR el primer se alinea de cualquier lado de la región de la repetición. Uno de los primers se pega en el extremo-5' con un tinte fluorescente que permite la detección del producto de PCR que resulta después de la amplificación. La posición de los primers define el tamaño total del producto de PCR al igual que el número de las repeticiones presentes en la región STR.

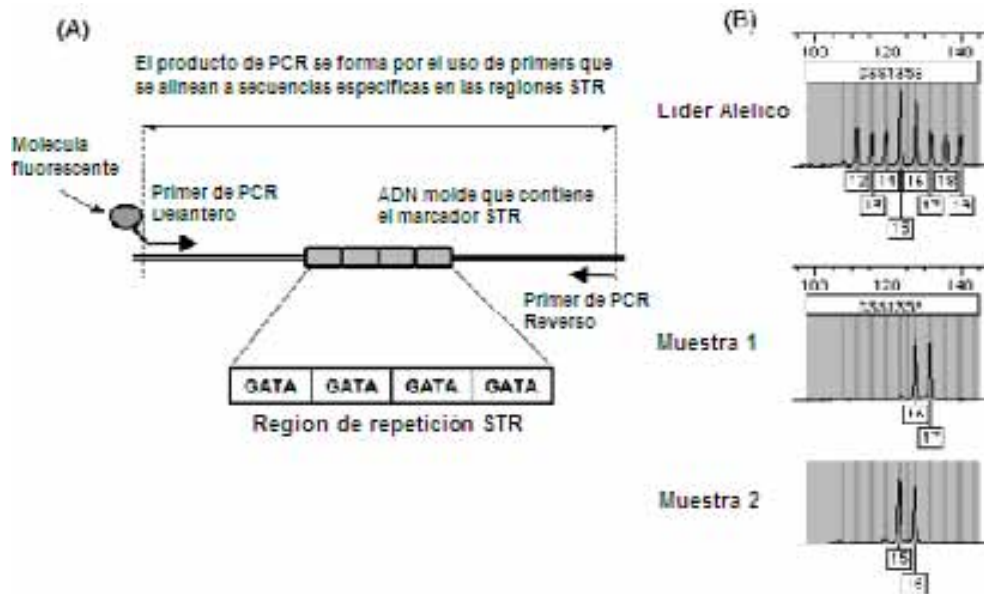


Figura 3 (a) Diagrama esquemático de las posiciones de primers en una PCR para la amplificación de un STR. Un fluorocromo está presente en uno de los primers para marcar el producto de PCR con un color específico. (b) Escala Alélica para el STR D3S1358 mostrada sobre dos muestras heterocigotas de DNA que exhiben diversos genotipos. Los valores debajo de los picos indican el número de las repeticiones en tándem presentes en el alelo medido. Modificado de Butler JM. [67]

Los productos de PCR son separados por tamaño y por el color con el que son marcados usando la electroforesis, seguido por una detección de fluorescencia de múltiples longitudes inducida con láser. Un estándar interno, conteniendo los fragmentos de ADN de tamaño conocido y marcado con un diverso color, es corrido electroforéticamente junto con cada muestra para calibrar los tamaños de corrida en corrida. Los datos obtenidos en la forma de electroferogramas multicolores son analizados por el software que determina automáticamente el tamaño del alelo STR basándose en una curva estándar producida por el estándar de tamaño interno. El genotipado del STR es realizado comparando los tamaños del alelo en cada muestra con los tamaños de los alelos presentes en una escala alélica, que contiene los alelos comunes que se han ordenado previamente. [68]

4.1- CÁLCULOS DE FRECUENCIA EN LOS PERFILES DE ADN

Para que cualquier polimorfismo pueda ser utilizado en la práctica forense es preciso conocer los valores que expresen la frecuencia alélica y genotípica en la población implicada y comprobar que se cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población donde va a ser utilizado.

Los cálculos de probabilidad se basan en el conocimiento de las frecuencias de los alelos en una población humana representativa, para cada locus y en mostrar el equilibrio de “Hardy-Weinberg” para la población mediante pruebas estadísticas.

El equilibrio de Hardy-Weinberg establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. [69] **Es decir, la herencia mendeliana, por sí misma, no engendra cambio evolutivo.**

En el lenguaje de la genética de poblaciones, el equilibrio de Hardy-Weinberg afirma que, bajo ciertas condiciones, tras una generación de apareamiento al azar, las frecuencias de los genotipos de un locus individual se fijarán en un valor de equilibrio particular. También especifica que esas frecuencias de equilibrio se pueden representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en ese locus.

Dicho de otra forma el equilibrio de Hardy-Weinberg es un conjunto de fórmulas matemáticas que describen cómo la proporción de distintos genes (unidades de herencia que determinan una característica particular en un organismo) puede permanecer igual a lo largo del tiempo en una población numerosa de individuos.

Esta ley indica la frecuencia con la que determinados *alelos* (variantes de un gen determinado que contienen información específica respecto a un carácter, por ejemplo el color de los ojos), deberían aparecer en una población. La ley establece también la frecuencia con la que determinados **genotipos** (combinación real de genes de la que un organismo es portador y puede transmitir a sus descendientes), deberían aparecer en esta misma población. Mediante el estudio de estas frecuencias alélica (o frecuencia génica) y genotípica, se pueden identificar poblaciones que están cambiando genéticamente o evolucionando. También es posible predecir la presencia de anomalías genéticas en las poblaciones.

4.1.1.-Frecuencias génica y genotípica.

En una población, cada individuo tiene dos alelos para cada gen. Estos alelos pueden ser iguales (individuos homocigotos) o diferentes (individuos heterocigotos), además un alelo puede ser dominante sobre el otro.

La frecuencia de un alelo se define como el número de copias del alelo en la población, dividido por la suma de todos los alelos en esa población.

Para un individuo heterocigótico, si los dos alelos tienen frecuencias p y q en una población, la probabilidad (P) de que un individuo tenga ambos alelos en un solo locus es

$$P = 2pq$$

Si un individuo es homocigótico para un alelo cuya frecuencia es p , la probabilidad (P) del genotipo es

$$P = p^2.$$

Por ejemplo, en una muestra de 100 individuos de una población determinada, el gen que corresponde a una característica específica posee alelos A y a , en el que A es dominante sobre a . Cada individuo del grupo es portador de dos de estos alelos en una de las dos combinaciones o genotipos siguientes: AA , Aa , o aa . En una muestra de 100 personas, 33 individuos tienen el genotipo AA , es decir dos alelos A ; 54 personas tienen el genotipo Aa , es decir un alelo A y otro a ; y 13 sujetos presentan un genotipo aa , o lo que es lo mismo dos alelos a .

La frecuencia real para cada alelo en el grupo de muestra o frecuencia génica, viene determinada por la división del número total de cada tipo de alelo entre el número total de todos los alelos. Por ejemplo, la frecuencia real del alelo A en el grupo de muestra es de 0,60, dato que procede de dividir 120, el número total de alelos A (dos de cada uno de los 33 individuos con el genotipo A y uno de cada uno de los 54 individuos con genotipo Aa) entre 200, el número total de todos los alelos (dos para cada uno de los 100 individuos).

La ley de Hardy-Weinberg utiliza las frecuencias reales de alelos de una población para predecir las frecuencias genotípicas esperadas de ésta; es decir, el número de genotipos que deberían tener lugar en la población. Si se asume que un gen tiene dos alelos, A y a (cuyas frecuencias se representan matemáticamente como p y q , respectivamente), que pueden formar tres genotipos, AA , Aa y aa , pueden utilizarse las siguientes fórmulas para predecir las frecuencias genotípicas esperadas:

- Frecuencia de $AA = p \times p = p^2$
- Frecuencia de $Aa = 2 \times p \times q = 2pq$
- Frecuencia de $aa = q \times q = q^2$

4.1.2.- Probabilidad para un perfil de ADN de múltiples loci

Si se demuestra mediante pruebas estadísticas adecuadas sobre las bases de datos de frecuencia alélica que los alelos de varios loci se heredan de forma independiente, entonces la probabilidad del genotipo combinado se puede calcular multiplicando.

La probabilidad (P) para un perfil de ADN es el producto de las probabilidades ($P_1, P_2, \dots P_n$) para cada locus individual; es decir:

$$\text{Probabilidad del perfil} = (P_1) (P_2) \dots (P_n)$$

Las probabilidades pueden ser números extremadamente pequeños, cuando se incluyen en el perfil los 15 marcadores STR que se utilizaran para el presente estudio.

Por ejemplo, si la frecuencia de un alelo *A* en una población es igual a 0,60, entonces la frecuencia esperada de individuos con un genotipo *AA* es de 0,36, el resultado de multiplicar 0,60 por 0,60.

Para determinar si la población conserva la misma proporción, o *equilibrio*, de genotipos a lo largo del tiempo, se comparan las frecuencias genotípicas esperadas de una población con sus frecuencias genotípicas reales (determinadas por la división del número total de cada genotipo en el grupo, entre el número total de individuos de dicho grupo)

De acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg, este equilibrio se conserva en una población siempre que se cumplan cuatro condiciones. En primer lugar, los individuos deben seleccionar parejas al azar con independencia de los caracteres visibles, o *fenotipos*. Segundo, ningún genotipo puede verse favorecido de manera que su frecuencia aumente en la población a lo largo del tiempo. La tercera condición establece que no pueden introducirse alelos nuevos en la población, bien procedentes de individuos externos a la población o como consecuencia de alelos que han cambiado, o mutado, de una forma a otra. La última condición establece que el número de individuos y genotipos en la población debe permanecer elevado. Una población que cumple estos requisitos mantiene constantes las frecuencias génicas y genotípicas de generación en generación -la composición genética de la población nunca varía. [70] Los genes poco comunes nunca desaparecen y los genes más habituales siguen siendo numerosos.

Dada la imposibilidad de genotipar a todos y cada uno de los individuos de la población, se realiza una estimación de las frecuencias alélicas mediante un genotipado muestral representativo.

Los siguientes parámetros estadísticos nos indican la utilidad a priori de los marcadores:

1.-Probabilidad de exclusión a priori (CE). Se define como la probabilidad de exclusión de un individuo como padre en un análisis de paternidad.

Para sistemas autosómicos se calcula mediante la siguiente formula:

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

Siendo p_i, p_j = frecuencias génicas respectivas. [71]

El CE depende del número de alelos identificados y de la distribución de las frecuencias alélicas. Es un valor porcentual que es función directa del polimorfismo de un sistema. Cuanto mas polimórfico sea éste y más equilibradas estén las frecuencias de sus alelos, mayor será su CE, lo que lo convierte en un parámetro de gran utilidad médico-legal, especialmente en determinaciones biológicas de paternidad.

2.-Poder de discriminación (PD). Es una medida relativa de la eficacia de un sistema, sobre todo con fines de identificación forense. Se define como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar, pertenecientes a la misma población, posean diferentes genotipos.

Se calcula mediante la siguiente formula:

$$PD = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Siendo p_i = frecuencias genotípicas esperadas, y siendo $\sum p_i^2$ la probabilidad de coincidencia o "matching". [72]

3.-Probabilidad de coincidencia (PM) o matching probability. Se define como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la misma población coincidan en su genotipo para un locus determinado y se calcula a partir de la siguiente formula:

$$PM = \sum_{i=1}^n p_i^2$$

siendo p_i = la frecuencia esperada de cada genotipo. [73]

Como se observa, el poder de discriminación y la probabilidad de coincidencia son conceptos opuestos ($PD=1-PM$).

4.1.3.- Evolución de las poblaciones

Sin embargo, la mayoría de las poblaciones no mantienen un equilibrio genético y los genes existentes son remplazados por genes nuevos o más ventajosos. Esta evolución puede estar en relación con la selección natural -es decir, algunos miembros de la población con ciertos genotipos originan descendientes más fuertes o más sanos-. Los cambios pueden deberse también a una mutación genética, (variación o cambio en la información genética); a una deriva genética, (pérdida de un alelo en una población por azar); a la migración, (salida de individuos de la población por emigración o llegada de individuos de otra población); o a una disminución en el tamaño de una población. Todos estos factores suceden de forma natural a lo largo del tiempo. No obstante, las mutaciones genéticas pueden producirse también por la exposición a sustancias químicas y a materiales radiactivos nocivos.

4.1.4.- Reportes de frecuencias alélicas en la población mexicana.

Las frecuencias alélicas de los locis D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D5S818 y FGA, para la población del Valle de México, así como para la zona central del país han sido reportadas previamente por Luna Vázquez y Hernández Gutiérrez respectivamente. [74, 75] los datos de dichas frecuencias para estas poblaciones pueden observarse en las tablas 3 y 4

Datos de 15 Loci STR en una muestra de la Población del Valle de México

Tabla 3. Frecuencias alélicas reportadas en el año 2005 para una muestra de la población del valle de México [74]

Alelo	D8S1179	D21S11	D7S820	CSFIPO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	VWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6						27.69									
7			0.83	0.62		37.81						0.41		6.42	
8	1.04		7.64	0.62		5.79	6.4	0.83				52.48		0.21	
9	0.83		4.34	1.45		6.4	26.03	10.12				4.34		4.8	
9.3						20.66									
10	8.7		23.76	28.72		1.62	12.6	24.17			0.21	2.48	0.41	5.18	
10.2										0.41					
11	3.73		33.88	24.79			16.94	23.14		0.83		28.1	0.21	50.52	
11.2										0.21					
12	11.8		24.79	36.57			20.25	31.61				11.98	9.71	21.33	
12.2										2.69					
13	34.37		4.34	6.8	1.03		10.33	9.30			0.41		14.88	11.59	
13.2										10.54					
14	28.99		0.21	0.4	5.99		7.44	0.62		24.17	6.4	0.21	16.94		
14.2										6.40					
15	9.52		0.21		49.59			0.21		14.67	6.2		16.3		
15.2										10.74					
16	0.83				24.79				1.4	4.13	35.71		9.9		
16.2										1.65					
17	0.21				13.84				16.3	0.83	29.3		16.7		
18					4.13				5.8		14.9		5.6		0.8
19					0.62				26.9		6.4		2.9		9.09
20									16.3		0.4		2.3		7.44
20.2															0.21
21									1.0				1.9		9.3
22									6.2				1.4		11.36
22.2													0.2		0.21
23									17.8				0.2		16.94
24									6.0						12.4
24.2		0.41													0.21
25															19.42
26									1.7				0.4		10.33
27		0.83							0.6						1.65
28		6.61													0.21
29		19.01													0.41
29.2		1.03													
30		28.1													
30.2		2.89													
31		9.3													
31.2		14.3													
32		1.9													
32.2		10.3													
33.2		5.2													
35		0.21													

Datos de 15 Loci STR en una muestra de la Población del Valle de México

Tabla 4. Frecuencias alélicas reportadas el año 2004 para la población de la Zona Central de México [75]

Alelo	D8S1179	D21S11	D7S820	CSFIPO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	VWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
4						0.47									
5						0.24		0.24							
6						25.59						0.71		0.24	
7			0.95	0.24		31.75								4.74	
8	1.18		13.03	0.47		7.58	7.58	0.95				45.58		2.13	
9	1.18		8.29	2.61		12.80	18.96	10.90		0.24		6.64		4.98	
9.2			1.18			0.24				0.95			9.2		
9.3						18.72									
10	9.00		22.04	26.78		2.61	10.90	13.27		0.24		3.32		6.40	
10.2				0.24						0.24					
11	6.64		32.22	29.62	1.66		23.22	27.01		0.71		26.07	1.44	44.08	
11.2										0.24					
12	14.46		17.54	34.12			26.54	33.18		7.58		14.45	13.88	26.30	
12.2										3.08					
13	31.99		4.50	4.98	0.71		9.00	12.56		15.64		0.24	16.99	9.95	
13.2				0.24						8.77			0.96		
14	22.99		0.24	0.47	6.16		2.61	1.90	0.24	23.46	11.61		16.27	0.95	
14.2										5.45					
15	9.95			0.24	21.56		0.47		0.48	15.88	9.48		12.44		
15.2					0.24					8.06	0.24				
16	2.37				28.67				3.83	6.64	31.75		11.72	0.24	
16.2					1.18					2.37					
17	0.24				21.56		0.24			16.03	0.24	26.54	15.07		0.47
18					10.90		0.47			5.74		13.74	6.22		0.71
18.2					0.24										
19		0.24			6.87					22.73		5.69	2.39		8.53
20					0.24					16.75			0.96		7.58
21										2.63	0.24		0.48		13.03
22										6.47	0.24		0.48		13.27
23										11.24	0.47		0.24		17.30
24										8.37					14.69
25		0.47								5.02					12.56
26		0.71								0.24					7.11
26.2															0.95
27		1.66							0.24				0.24		2.61
28		9.48													0.95
28.2		0.24													
29		21.33													0.24
29.2		0.47													
30		23.46													
30.2		2.61													
31		6.40													
31.2		12.80													
32		0.71													
32.2		11.37													
33.2		5.69													
34.2		0.71													
35		0.47													
36.2		0.24													
37		0.24													

II.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para que cualquier marcador genético pueda ser utilizado de manera rutinaria en criminalística para la identificación de individuos, así como en la investigación biológica de la paternidad, es necesario determinar las frecuencias alélicas del sistema polimórfico en la población donde va a ser utilizado. Dada la imposibilidad de genotipar a todos y cada uno de los integrantes de la población para obtener su valor exacto, es necesario realizar una estimación de dichas frecuencias a través de un genotipado muestral representativo de dicha población.

III.- HIPÓTESIS

Se espera que la distribución de las frecuencias alélicas para cada uno de los diferentes marcadores genéticos analizados, cumplan con el equilibrio de Hardy-Weinberg, así mismo se espera que no existan diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de la población de estudio con respecto a las reportadas con anterioridad para el Valle de México y la Zona Central del País.

IV.-OBJETIVOS:

- 1.-Conocer los alelos que se presentan con mayor frecuencia en una muestra de la población del Valle de México.
- 2.-Comparar la frecuencia de los alelos encontrados en la población de estudio con los reportados anteriormente para dicha población, así como con los reportados para la zona central del país.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIAL Y EQUIPO

- Alcohol isopropílico de grado de pureza biología molecular
- AmpF1STR® Identifiler® Kit PCR
- AmpliTaq Gold® DNA Polymerase
- Espectrofotómetro de luz U.V. Biomate 3 de Thermo Electron Corporation.
- Etanol Anhídrido desnaturalizado de grado de pureza biología molecular
- Genetic Analyzers 3130 de Hitachi.
- Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems.
- Incubador GALLENKAMP PLUS OVEN.
- Kit para extracción de ADN de de la casa comercial Qiagen.
- Pipeta Automática de 0.5-10 µL
- Pipeta Automática de 20-2000 µL

- Pipeta Automática de 100-1000 μ L
- Puntas para pipeta de 10 μ L
- Puntas para pipeta de 200 μ L
- Puntas para pipeta de 1000 μ L
- Tubos de eppendorf de 1.5mL.
- Tubos de eppendorf de 0.6mL.
- Vortex Deluxer Mixer.

2.- MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente estudio se analizaron 135 muestras, de diferente origen biológico como: sangre periférica, células de mucosa oral, cabello, que fueron obtenidas de casos rutinarios de reconocimiento de paternidad realizados en Laboratorios Clínicos Azteca.

Criterios de inclusión.

Se incluyeron en el estudio individuos entre los cuales no existía ninguna relación de parentesco, por lo que en los casos de inclusión de la paternidad los datos de los hijos quedaron excluidos

Criterios de exclusión.

Se excluyeron a todos los hijos de aquellos casos en los que se incluyó a la madre en el estudio, así como a los hijos en los casos en lo que se comprobó la relación de paternidad.

3.- OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Sangre Periférica

Se obtuvieron por punción venosa 5 mL de sangre periférica, recogándose en tubos estériles conteniendo EDTA como anticoagulante. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el momento de la extracción del ADN y el cual se obtuvo de acuerdo con el procedimiento indicado en el punto 1 de la sección 3.1.

Mucosa Oral

Se obtuvieron con un cepillo para muestras de células epiteliales una muestra de células de mucosa oral, una vez realizado el cepillado de la mucosa, el cepillo se colocó en 3 ml de solución salina fisiológica y de esta se tomó un mililitro, se centrifugo a 10,000 rpm durante 5 minutos. El pellet de células se sometió al proceso de extracción de ADN como se describe a partir del punto 3 de la sección 3.1.

Cabello

Se tomó una muestra de cabellos del individuo utilizando unas pinzas de uso capilar tomando los cabellos del extremo proximal (cercano al bulbo) con la finalidad de arrastrar el mayor numero de células posible, una vez desprendido el cabello este se depositó en un tubo tipo eppendorff de 0.6 ml, y se procedió al proceso de extracción como se describe a partir del punto 3 de la sección 3.1.

3.1- EXTRACCIÓN DE ADN

Se utilizó el método de extracción de Qiagen adecuado al siguiente protocolo:

- 1.-Retirar con pipeta 100µL de muestra y agregar 1000 µL de solución de lisis de eritrocitos.
- 2.-Mezclar con vortex durante 1 minuto, dejar reposar 5 minutos y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
- 3.-Desechar el sobrenadante y al sedimento agregar 300 µL de solución de lisis de células (para las muestras de cabello se emplearon 100 µL).
- 4.- Incubar a 60 ° C por una hora.
- 5.-Agregar 100 µL de solución de precipitación de proteínas y mezclar con vortex durante 30 segundos. (Para las muestras de cabello se emplearon 30 µL).
- 6.-Centrifugar a 10, 000 rpm durante 5 minutos.

- 7.- Recoger el sobrenadante con pipeta y pasarlo a otro tubo.
- 8.- Añadir 1000 μ L de isopropanol absoluto frío y mezclar por inversión 50 veces. (Para las muestras de cabello se emplearon 500 μ L).
- 9.-Centrifugar a 10, 000 rpm durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante.
- 10.-Añadir 100 μ L de etanol absoluto frío y mezclar suavemente. El pellet de ADN aparecerá rápidamente por precipitación.
- 11.-Centrifugar a 10, 000 rpm durante 1 minuto. Retirar el etanol, por decantación, cuidando de no perder el pellet.
- 12.-Dejar secar los tubos a temperatura ambiente 5 o 10 minutos.
- 13.-Resuspender el DNA en 100 μ L de agua bidestilada estéril (o EDTA 0.1 mM).
- 14.-Cuantificar en espectrofotómetro y conservar el DNA extraído a 4 ° C (si no se va utilizar enseguida es preferible congelarlo a -20° C).

4.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Cada muestra de ADN se cuantifico por medio de un espectrofotómetro (*BioMate 3TM Thermo*, Electrón Corporation).

La cuantificación del ADN se realizo mediante espectrofotometría utilizando el rango de luz UV. Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del ADN, esta molécula tiene absorbancia máxima a 260 nm. Para determinar la pureza, se utiliza la razón de ADN/proteínas. La abundancia de proteínas residuales en el extracto se determina midiendo absorbancia a 280 nm. Un buen ADN (calidad y pureza) es aquel cuyo cociente A260/A280 es de 1.7 a 2.0.

5.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Se amplificaron en multiplexes mediante PCR los sistemas D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, FGA, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, D3S1358, más el marcador del sexo AMEL.

5.1-REACCIÓN DE PCR

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la reacción, fueron suministrados por la casa comercial Applied Biosystems. Para la amplificación de las muestras se utilizaron 1-2 ng de ADN en un volumen final de 25 μ L. El volumen de los de la mezcla de cebadores fue de 5.5 μ L a la concentración proporcionada por el proveedor y la concentración de la enzima *taq* DNA polimerasa fue de 2.5 unidades de reacción equivalentes a 0.5 μ L

5.1.1.-PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN

Al preparar las muestras para amplificación de PCR usando el AmpF1STR® Identifiler® PCR Amplification Kit el volumen total (Master Mix y ADN) fue de 25 μ L siguiendo las siguientes indicaciones:

1.-Colocar el número requerido de tubos de reacción de 1.5 mL con tapa dentro de una gradilla y rotularlos. Asegurarse de incluir tubos para los controles positivo y negativo.

2.-De los kits AmpF1STR® Identifiler® Kit PCR, agitar el tubo de Reaction Mix, el tubo de Primer Set y AmpliTaq Gold® DNA Polymerase por 5 segundos. Centrifugar brevemente los tubos en una microcentrifuga para remover cualquier rastro de líquido de las tapas.

3.-Preparar el AmpF1STR® Identifiler® Kit Master Mix añadiendo los siguientes volúmenes de los reactivos indicados en un tubo de microcentrifuga de 1.5mL:

- Número de muestras X 10.5 μ L de AmpF1STR® Identifiler® Kit PCR Reaction Mix.
- Número de muestras X 0.5 μ L de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase.
- Número de muestras X 5.5 μ L de AmpF1STR® Identifiler® Primer Set.

Nota: La formulación anterior provee un ligero exceso para prevenir la pérdida de volumen en el pipeteo. El máximo volumen de Master Mix contenido en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL puede ser dispensado en 84 tubos de PCR.

4.-Mezclar minuciosamente con vortex a velocidad media por 5 segundos. Centrifugar brevemente el tubo en una microcentrifuga para remover cualquier líquido de la tapa. Dispensar 15 μ L de Master Mix dentro de cada tubo de PCR.

5.-Añadir 0.5-10 μ L de extracto de ADN basado en las concentraciones de ADN obtenidas previamente. La cantidad objetivo de ingreso de ADN para los AmpF1STR® Identifiler® PCR Amplification Kit es de 1-2 ng.

6.-Añadir TE-1 buffer para completar el volumen faltante.

Para el control positivo:

1.- Homogenizar el tubo de AmpF1STR® Control DNA 9947A (0.10 ng/ μ L).

2.-Centrifugar brevemente el tubo en una microcentrifuga para remover cualquier liquido de la tapa.

3.-Agregar 10 μ L (1ng) de AmpF1STR® Control DNA 9947A a los tubos etiquetados como control positivo.

Para el control negativo:

1.-Agregar 10 μ L de TE-1 buffer a los tubos marcados como control negativo.

5.1.2.-CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS.

Los programas de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de ADN (*Gene Amp PCR System 9700*, Applied Biosystems) con arreglo al siguiente protocolo:

1.- Se calentaron las muestras a 94°C durante 1 minuto con el fin de desnaturalizar el ADN. Posteriormente se bajo la temperatura a 59°C durante 1 minuto para que se lleve a cabo la fase de acoplamiento y, finalmente la extensión transcurrirá a 72°C durante 1 minuto. Se realizaron 28 ciclos. Con un ciclo final de 60°C durante 1 hora.

Una vez finalizado el proceso de amplificación, las muestras fueron conservadas a 4°C.

6.-DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR ANÁLISIS DE FRAGMENTOS EN EL SECUENCIADOR DE ADN.

6.1.-PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1.- Se preparó un Master Mix combinando la cantidad necesaria de Hi-Di™ formamida y GeneScan™ 500-LIZ® internal size standard en un tubo simple de microcentrifuga como se menciona a continuación:

- (Número de muestras +2) X 8.7 µL Hi-Di formamida.
- (Número de muestras +2) X 0.3 µL GeneScan™ 500-LIZ® internal size Standard.

2.- Agitar la mezcla con vortex y centrifugar brevemente.

3.-Colocar en una placa de muestras de 96 pozos del Genetic Analyzer 9 µL del Master Mix en el numero adecuado de pozos.

4.-Agregar 1 µL de cada producto de PCR en cada uno de los pozos de muestras correspondientes.

5.- Agregar 1 µL de AmpF1STR® Identifiler® Allelic Ladder en cada uno de los pozos de muestra "ladder". Nota: Preparar un ladder en cada grupo de 16 muestras.

6.-Sellar la placa con una septa.

7.-Desnaturalizar las muestras por 3 minutos a 95°C.

8.-Enfriar las muestras por al menos 3 minutos en hielo.

9.-Llenar el registro de una nueva placa y comenzar la corrida.

6.2.- ELECTROFORESIS Y DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE FRAGMENTOS MARCADOS CON FLUORESCENCIA.

Un secuenciador automático de ADN, el Genetic Analyzer 3130 (*Hitachi*, Applied Biosystems), proporcionará el método para la visualización de los productos amplificados. Consta de una unidad de electroforesis y sistema de detección fluorescente asociado a un ordenador, permitiendo controlar el proceso electroforético, así como el almacenamiento de datos y su posterior análisis.

Este sistema detecta directamente los fragmentos de ADN marcados fluorescentemente en el transcurso de una electroforesis capilar, permitiendo medirlos y cuantificarlos.

El recorrido electroforético se realizó bajo las siguientes condiciones propuestas por el fabricante:

Temperatura del Horno 60 °C.

Voltaje de precorrimento electroforético 5.0 μ Amps.

Tiempo de precorrimento electroforético 180 segundos.

Voltaje de inyección 1.2 K. Volts.

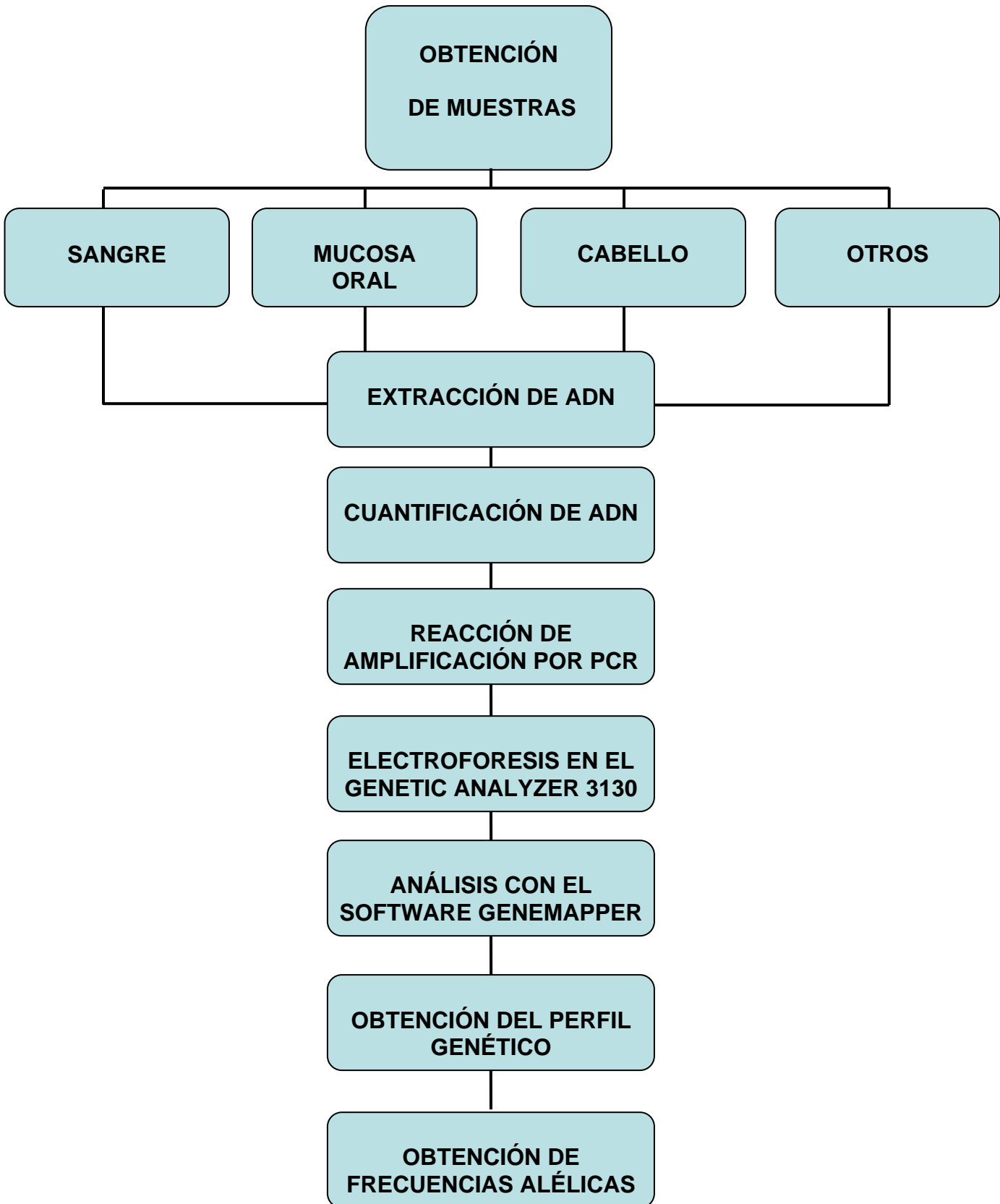
Tiempo de inyección 12 segundos.

Voltaje de corrimiento electroforético 15 K. Volts

Tiempo de corrimiento electroforético 1500 segundos.

Para el análisis de los fragmentos se utilizó el Software GeneMapper 3.2, con el cual se obtuvo el perfil genético de cada individuo a partir del cual se conocieron los alelos de los STR que se encuentran en la muestra analizada. Una vez realizado este análisis, se procedió a determinar la frecuencia de los alelos encontrados y a realizar el análisis comparativo con los resultados reportados para las poblaciones del Valle de México y de la zona central del País.

6.3.-DIAGRAMA DE FLUJO



V.-RESULTADOS

1.-RESULTADOS GENÉTICO-POBLACIONALES

1.1.- CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN.

Se llevó a cabo un análisis genético poblacional de 135 individuos no emparentados mediante el estudio de los marcadores: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D5S818 y FGA,

1.1.1.-Determinación de frecuencias alélicas

Una vez identificados los alelos de cada individuo mediante el software GeneMapper, la determinación de las frecuencias alélicas en la población estudiada se realizó mediante el uso del software PowerStats V 1.2. [76] (Tabla 20), el cual genera además parámetros estadísticos de aplicación forense, los cuales se muestran en la tabla 21

1.1.2.-Análisis del equilibrio genético.

Para realizar la prueba exacta del equilibrio genético se utilizó el software Genetic Data Analysis (GDA) [77], el cual utiliza la prueba de χ^2 la cual es una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica, indicando en qué medida las diferencias existentes entre ambas, (de haberlas), se deben al azar en el contraste de hipótesis (también denominado prueba de significación es una técnica de inferencia estadística para juzgar si una propiedad que se supone cumple una población estadística es compatible con lo observado en una muestra de dicha población). Este software realiza también la prueba de probabilidad exacta de Fisher, la cual permite analizar si dos variables están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación de la prueba de Chi cuadrada (χ^2) sea adecuada. Figuras 4 y 5

Datos de 15 Loci STR en una muestra de la Población del Valle de México

```

Data matrix has 1 populations, 15 loci, and 135 individuals
Missing data represented by the symbol ?
Different genes at one locus separated by the symbol /
Multicharacter allele names.
Labels provided for individuals.
Respecting case for allele names.
Data matrix not interleaved.
All loci are diploid.
    
```

Descriptive statistics (by population):

Population	n	P	A	Ap
AZTK	135.000000	1.000000	9.666667	9.666667
Mean	135.000000	1.000000	9.666667	9.666667

Population	He	Ho	f
AZTK	0.784192	0.800494	-0.020867
Mean	0.784192	0.800494	-0.020867

Descriptive statistics (by locus):

Locus	n	P	A	Ap
D8S1179	135.000000	1.000000	9.000000	9.000000
D21S11	135.000000	1.000000	15.000000	15.000000
D7S820	135.000000	1.000000	8.000000	8.000000
CSF1PO	135.000000	1.000000	8.000000	8.000000
D3S1358	135.000000	1.000000	7.000000	7.000000
TH01	135.000000	1.000000	7.000000	7.000000
D13S317	135.000000	1.000000	7.000000	7.000000
D16S539	135.000000	1.000000	7.000000	7.000000
D2S1338	135.000000	1.000000	11.000000	11.000000
D19S433	135.000000	1.000000	12.000000	12.000000
vWA	135.000000	1.000000	10.000000	10.000000
TPOX	135.000000	1.000000	7.000000	7.000000
D18S51	135.000000	1.000000	15.000000	15.000000
D5S810	135.000000	1.000000	9.000000	9.000000
FGA	135.000000	1.000000	13.000000	13.000000
All	135.000000	1.000000	9.666667	9.666667

Locus	He	Ho	f
D8S1179	0.814952	0.792593	0.027537
D21S11	0.831778	0.837037	-0.006347
D7S820	0.777200	0.800000	-0.029449
CSF1PO	0.708936	0.770370	-0.087009
D3S1358	0.687953	0.725926	-0.055415
TH01	0.725458	0.718519	0.009601
D13S317	0.817816	0.844444	-0.032685
D16S539	0.779485	0.837037	-0.074129
D2S1338	0.852265	0.859259	-0.008238
D19S433	0.859094	0.903704	-0.052130
vWA	0.775657	0.755556	0.026010
TPOX	0.656451	0.601401	-0.030279
D18S51	0.076194	0.037037	0.044050
D5S810	0.721135	0.748148	-0.037605
FGA	0.878508	0.896296	-0.020326

Figura 4. Reporte generado por el software GDA. (n) Tamaño de la Muestra, (P) loci Polimórficos, (A) Numero de Alelos por Locus, (Ap) Numero de Polimorfismos de Alelos por Locus, (He) Numero de Heterocigotos Esperados, (Ho) Numero de Heterocigotos Observados, (f)² Índice de Fijación Estimado.

Datos de 15 Loci STR en una muestra de la Población del Valle de México

```

MEasure      = FISHER
Missings     = DISCARD
Upto         = 1
Permute      =

Exact tests for linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium:

Subsets of loci will be analyzed
Subsets will be comprised of up to 1 loci
Individuals with missing data will be discarded
Number of runs: 2000
Measure: Fisher
Shufflings will break up genotypes for all loci

Population # 1 (AZTK) of 135 individuals

```

Runs	Prob	Locus combination
2000	0.099500	D8S1179
2000	0.015000	D21S11
2000	0.720500	D7S820
2000	0.355000	CSF1PO
2000	0.492500	D3S1358
2000	0.277000	TH01
2000	0.964500	D13S317
2000	0.572500	D16S539
2000	0.648000	D2S1338
2000	0.044500	D19S433
2000	0.088000	vWA
2000	0.002000	TPOX
2000	0.251000	D18S51
2000	0.709500	D5S010
2000	0.725500	FGA

```

Exact tests for linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium:

Subsets of loci will be analyzed
Subsets will be comprised of up to 1 loci
Individuals with missing data will be discarded
Number of runs: 2000
Measure: Chi-square
Permute methods string: bbbbbbbbbbbbbbbb

Population # 1 (AZTK) of 135 individuals

```

Runs	Prob	Locus combination
2000	0.379000	D8S1179
2000	0.219500	D21S11
2000	0.551000	D7S820
2000	0.168000	CSF1PO
2000	0.657500	D3S1358
2000	0.413500	TH01
2000	0.959500	D13S317
2000	0.518000	D16S539
2000	0.220500	D2S1338
2000	0.193500	D19S433
2000	0.002500	vWA
2000	0.005500	TPOX
2000	0.000500	D10S51
2000	0.679000	D5S818
2000	0.172500	FGA

Figura 5. Reporte generado por el software GDA para la prueba del equilibrio genético mediante el análisis de Fisher y de χ^2

Frecuencias Alélicas para el locus D8S1179	
Alelos	Frecuencia %
7	0.4
8	0.4
9	1.1
10	28.1
11	28.9
12	35.9
13	4.1
14	1.1

Tabla 5. Frecuencias Alélicas para el locus D8S1179

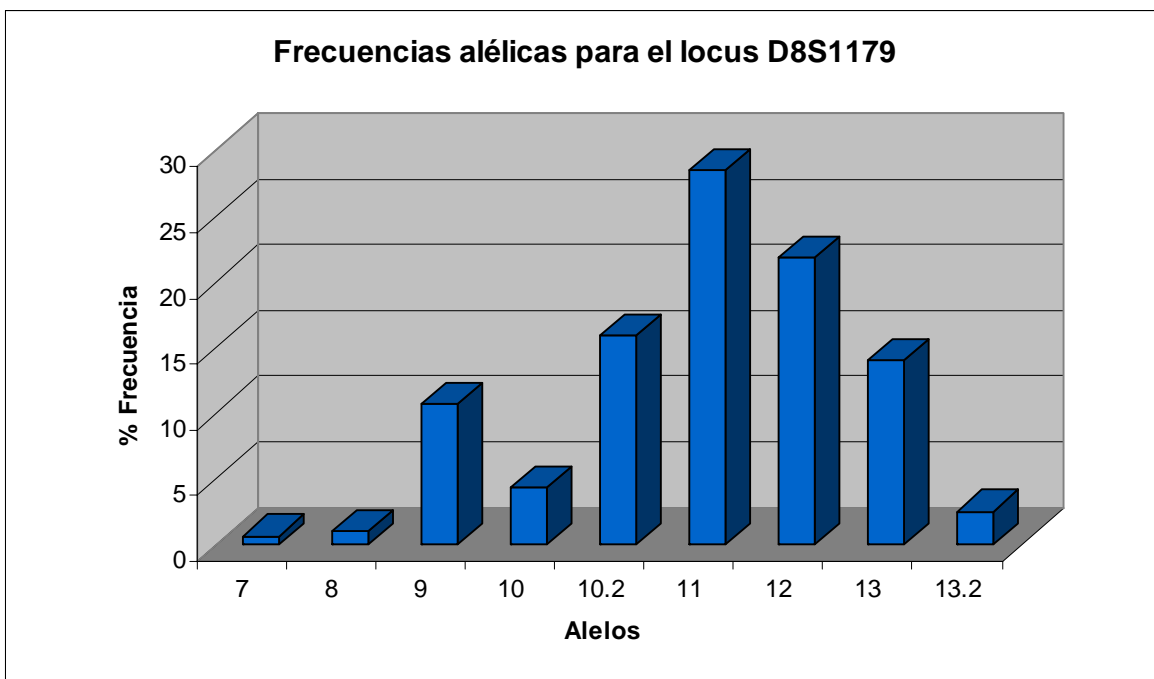


Figura 6. Sistema D8S1179: Frecuencias alélicas as en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D21S11	
Alelos	Frecuencia %
24.2	1.1
26	0.4
27	1.1
28	7.4
29	20.4
30	28.5
30.2	0.4
31	5.6
31.2	15.2
32	1.5
32.2	13.7
33.2	3.7
34.2	0.7
36	0.4

Tabla 6. Frecuencias Alélicas para el locus D21S11

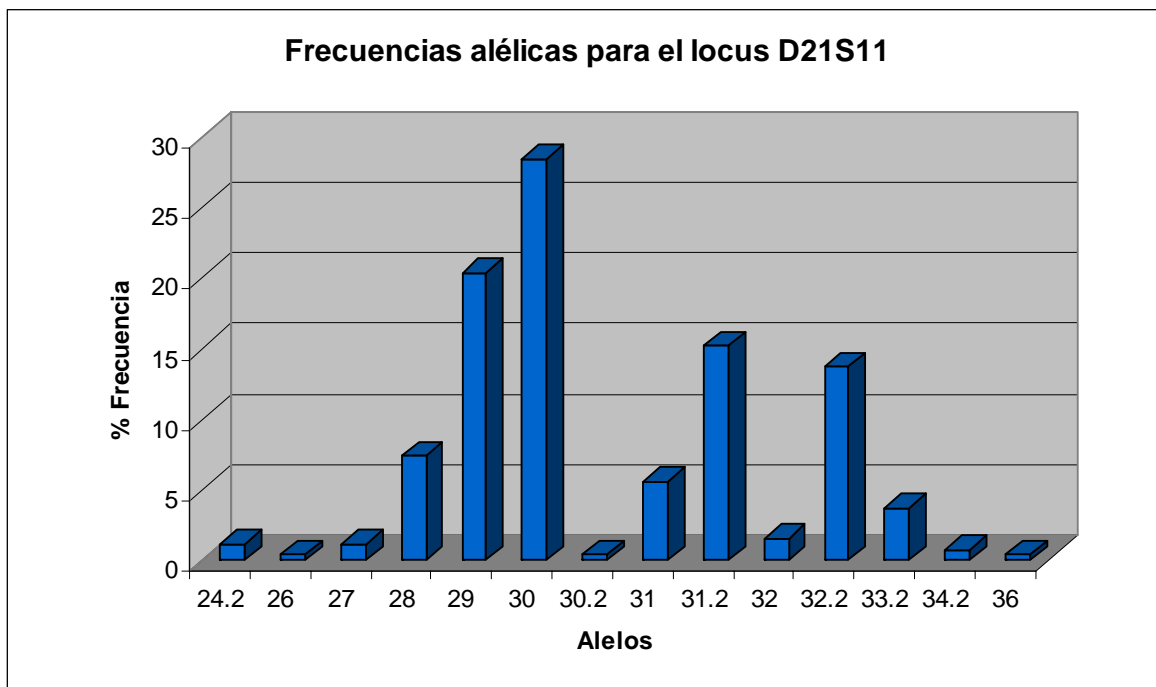


Figura 7. Sistema D21S11: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D7S820	
Alelos	Frecuencia %
7	0.4
8	8.9
9	5.9
10	26.7
11	30
12	22.6
13	4.4
14	1.1

Tabla 7. Frecuencias Alélicas para el locus D7S820

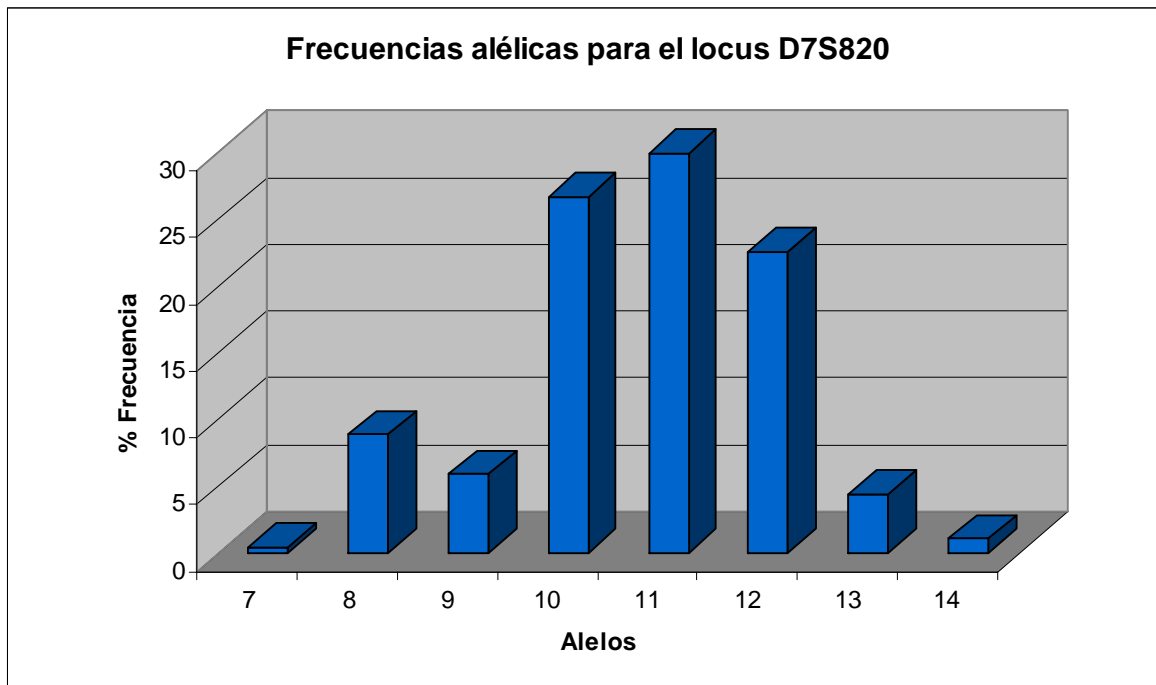


Figura 8. Sistema D7S820: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus CSF1PO	
Alelos	Frecuencia %
7	0.4
8	0.4
9	1.1
10	28.1
11	28.9
12	35.9
13	4.1
14	1.1

Tabla 8. Frecuencias Alélicas para el locus CSF1PO

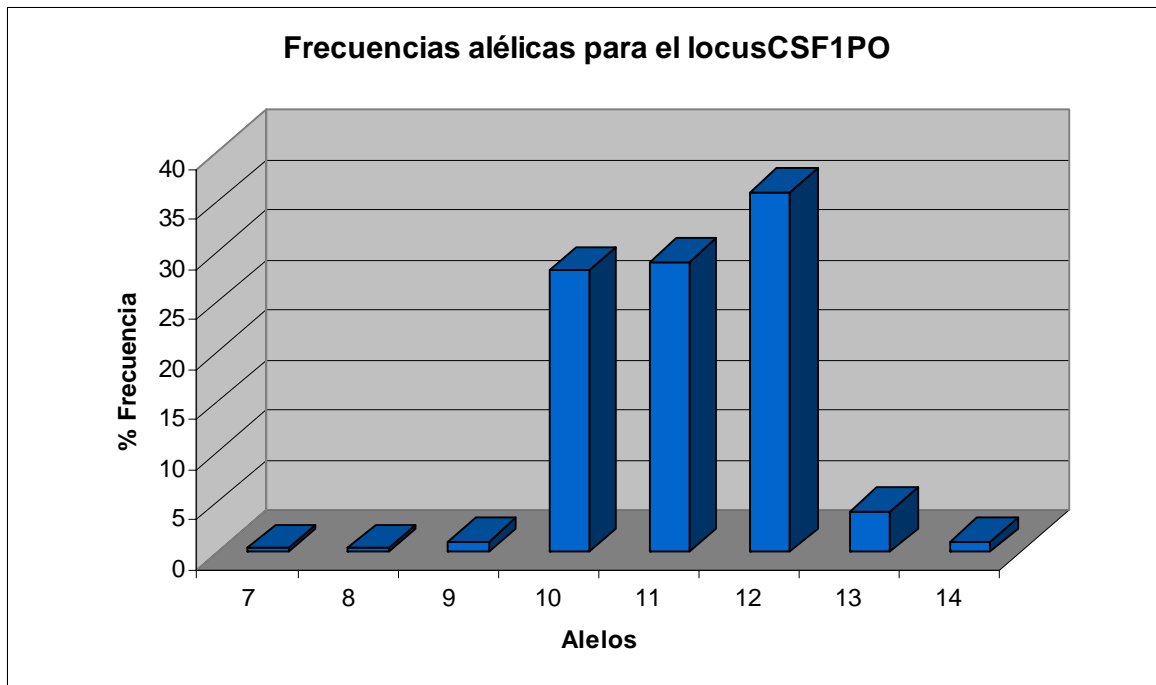


Figura 9. Sistema CSF1PO: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D19S433	
Alelos	Frecuencia %
11	1.1
12	5.2
12.2	2.2
13	16.3
13.2	13.3
14	25.6
14.2	5.9
15	10.7
15.2	11.1
16	4.4
16.2	3.7
17.2	0.4

Tabla 9. Frecuencias Alélicas para el locus D19S433

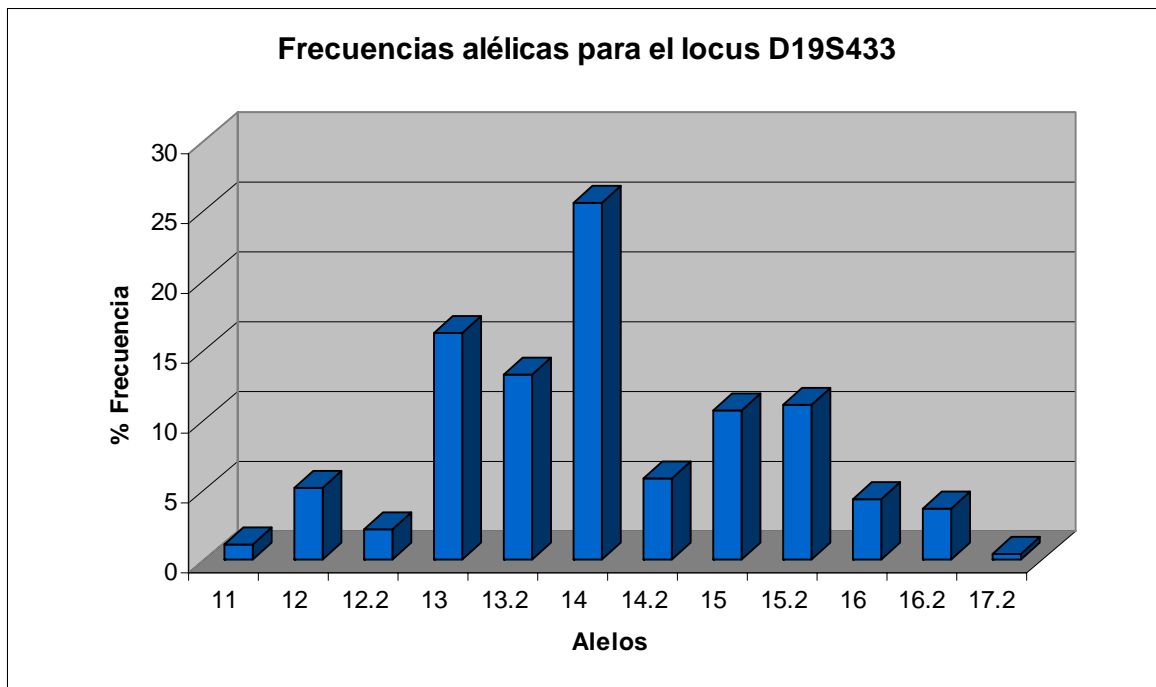


Figura 10. Sistema D19S433: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus vWA	
Alelos en el locus vWA	Población de estudio
13	0.7
14	4.4
15	7.8
16	33.2
17	25.2
18	20.7
19	6.7
20	1.1

Tabla 10. Frecuencias Alélicas para el locus vWA

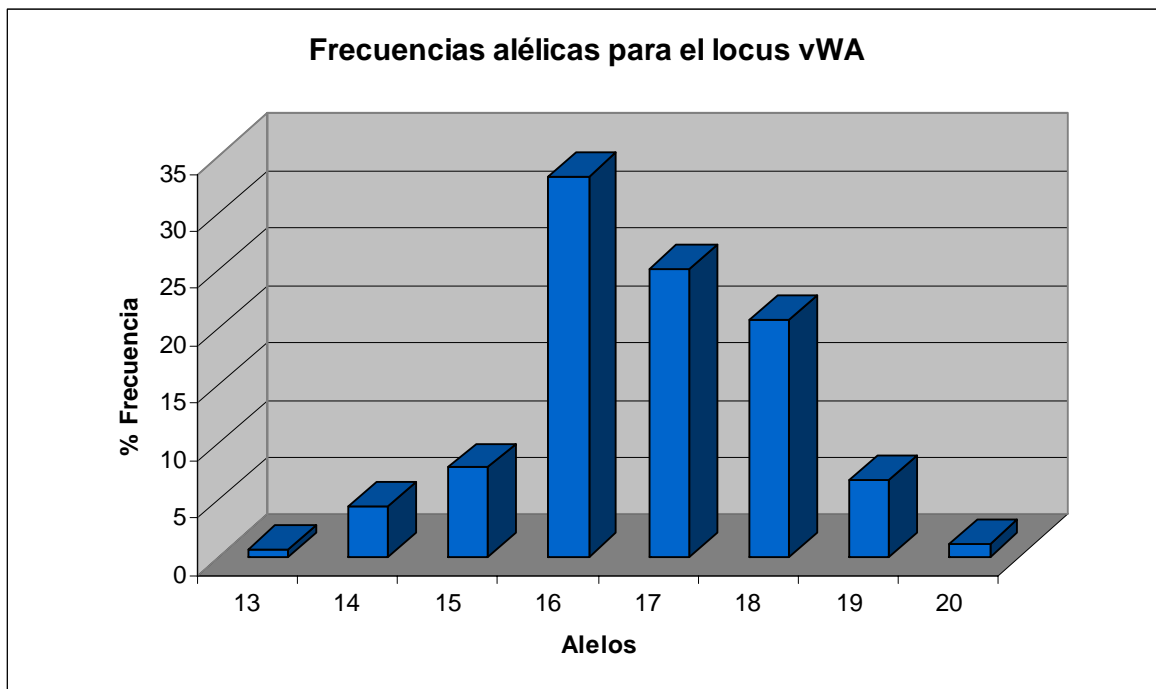


Figura 11. Sistema vWA: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus TPOX	
Alelos en el locus TPOX	Población de estudio
6	0.7
7	1.1
8	50.7
9	3.7
10	5.9
11	26.7
12	11.1

Tabla 11. Frecuencias Alélicas para el locus TPOX

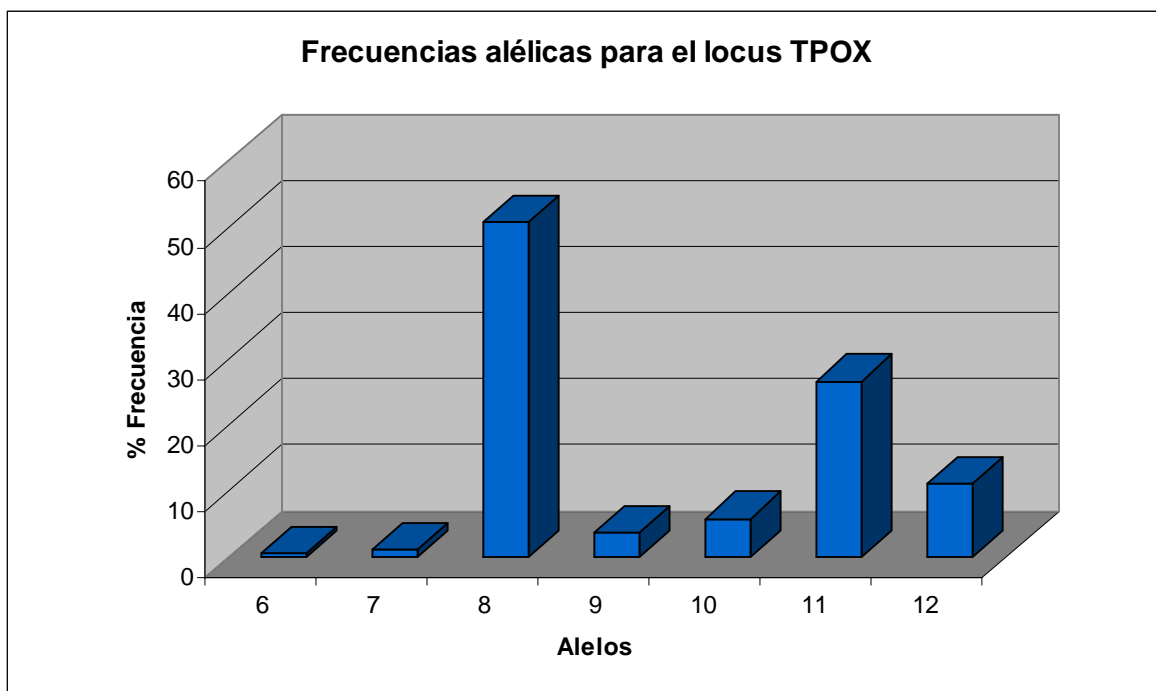


Figura 12. Sistema TPOX: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D18S51	
Alelos en el locus D18S51	Población de estudio
11	1.5
12	13
13	12.6
13.2	1.1
14	17.8
15	17
16	10.7
17	13.7
18	5.2
19	3.3
20	2.2
22	0.4
23	0.7
26	0.7

Tabla 12. Frecuencias Alélicas para el locus D18S51

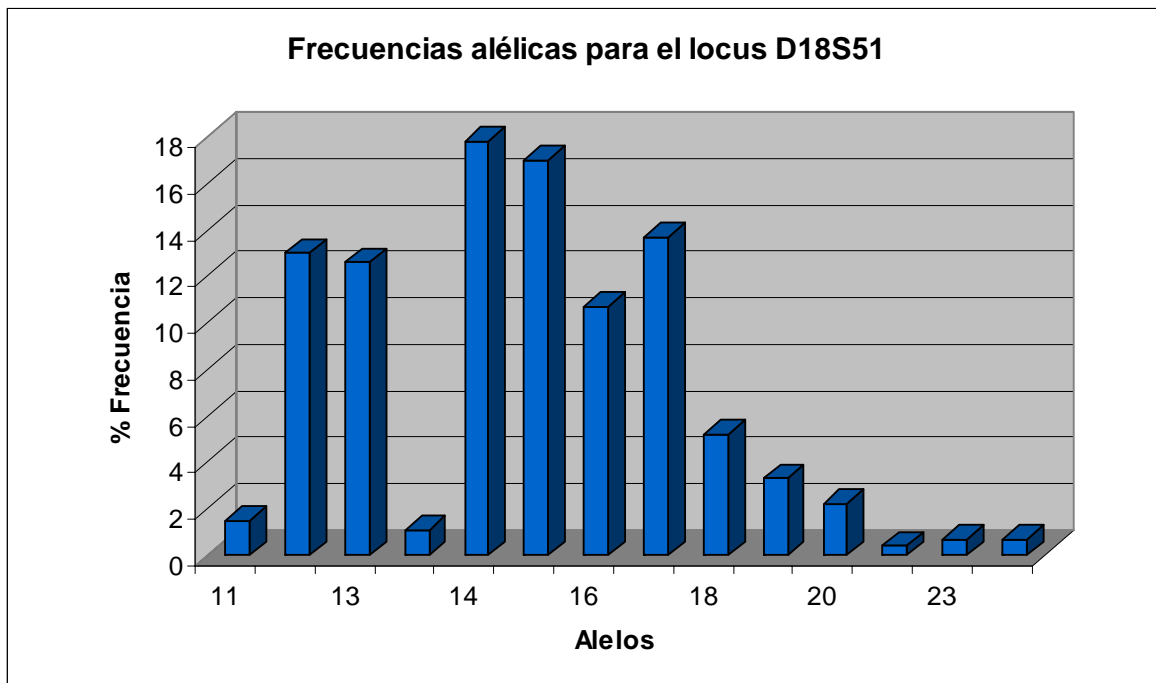


Figura 13. Sistema D18S51: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D3S1358	
Alelos en el locus D3S1358	Población de estudio
13	1.1
14	7
15	45.9
16	28.1
17	12.2
18	5.2
19	0.4

Tabla 13 Frecuencias Alélicas para el locus D3S1358

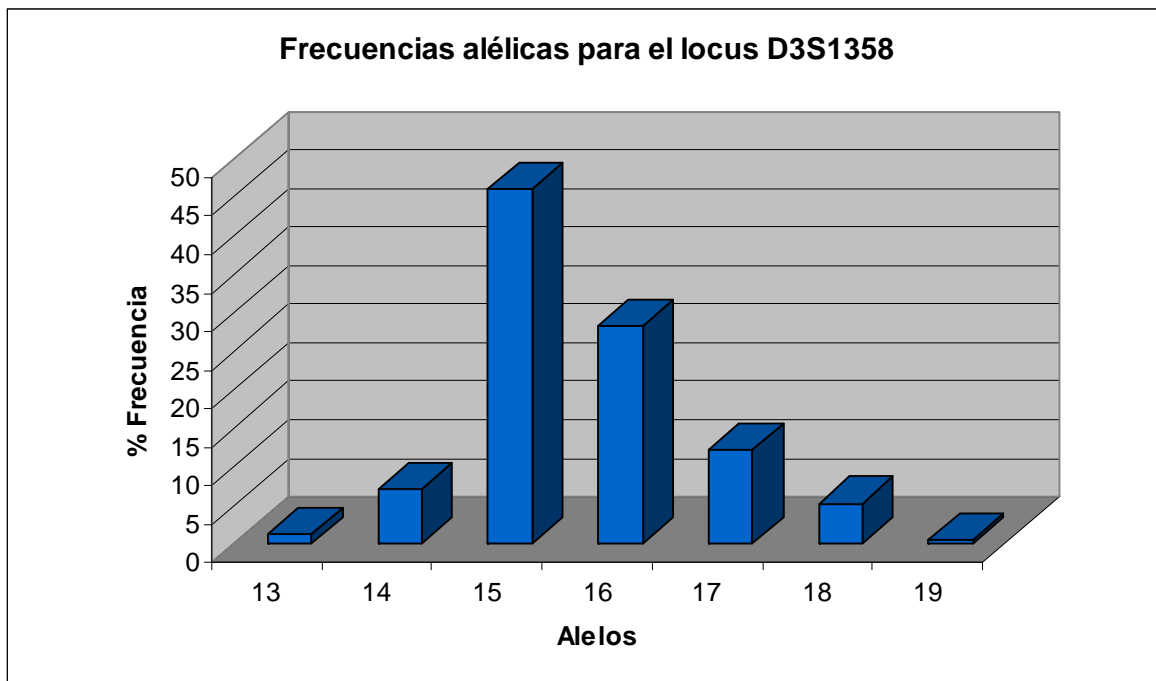


Figura 14. Sistema D3S1358: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus TH01	
Alelos en el locus TH01	Población de estudio
4	0.4
6	33.7
7	35.6
8	5.9
9	7.8
9.3	15.9
10	0.7

Tabla 14.- Frecuencias Alélicas para el locus TH01

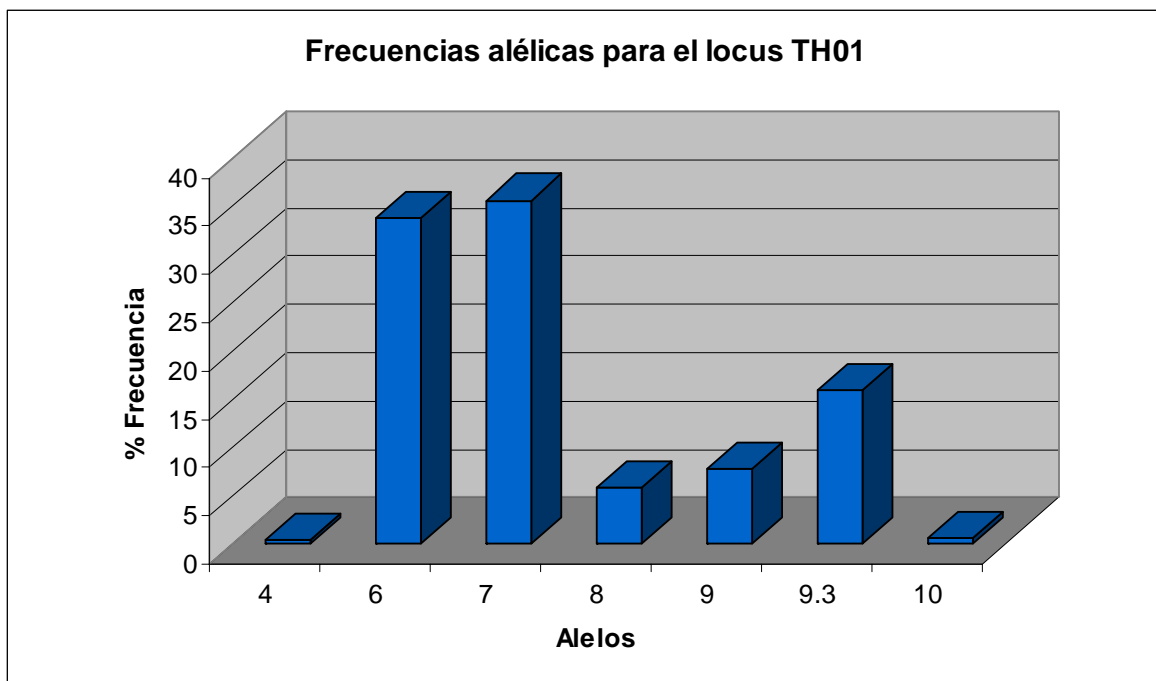


Figura 15. Sistema TH01: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D13S317	
Alelos en el locus D13S317	Población de estudio
8	7.4
9	26.3
10	15.6
11	21.5
12	18.5
13	6.3
14	4.4

Tabla 15. Frecuencias Alélicas para el locus D13S317

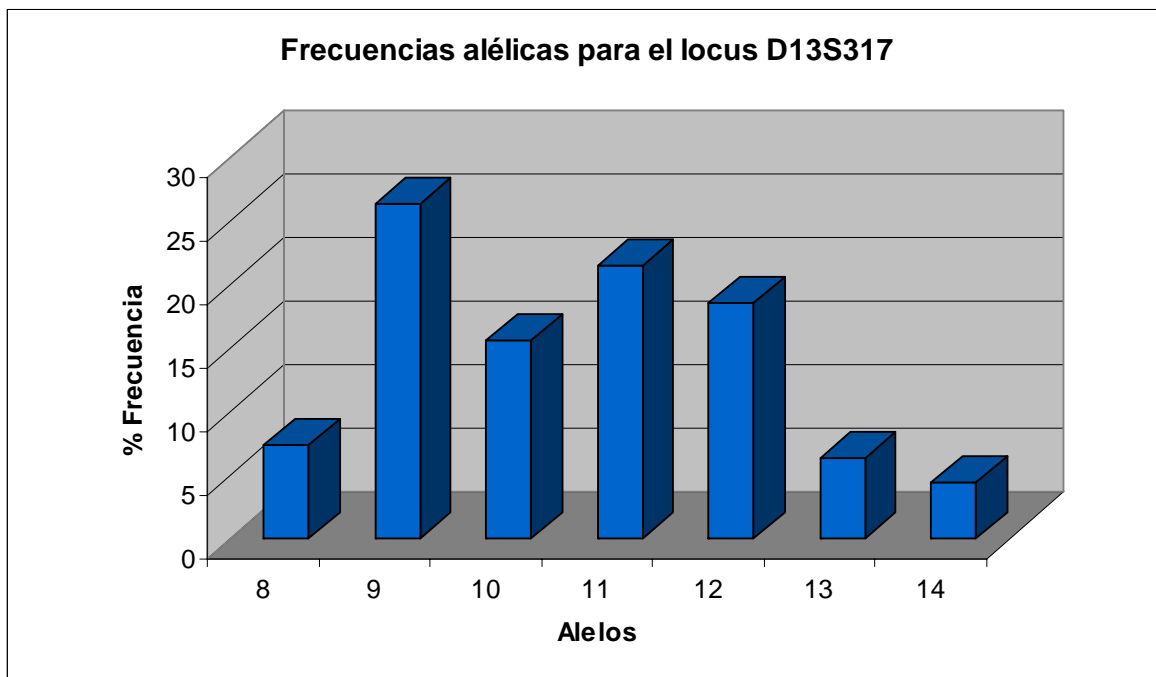


Figura 16. Sistema D13S317: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D16S539	
Alelos en el locus D16S539	Población de estudio
8	1.1
9	8.5
10	21.9
11	25.9
12	30
13	10.7
14	1.9

Tabla 16. Frecuencias Alelicas para el locus D16S539

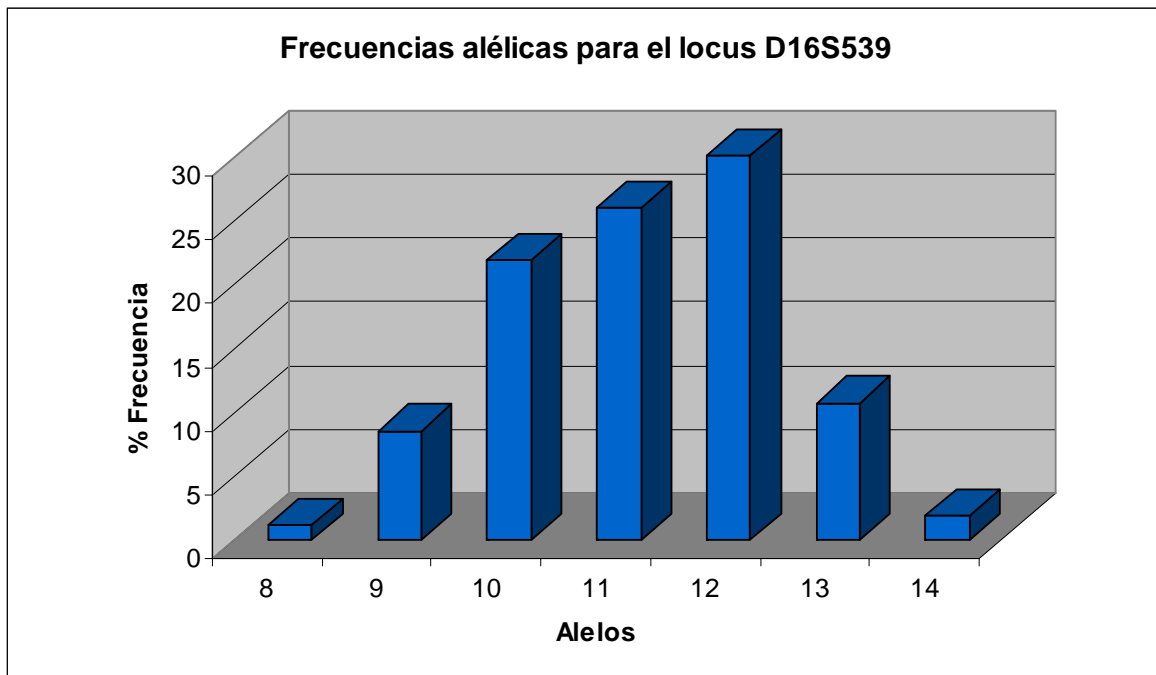


Figura 17. Sistema D16S539: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D2S1338	
Alelos en el locus D2S1338	Población de estudio
16	1.9
17	15.6
18	5.9
19	19.6
20	12.6
21	3.3
22	9.3
23	23.3
24	6.3
25	1.9
26	0.4

Tabla 17. Frecuencias Alélicas para el locus D2S1338

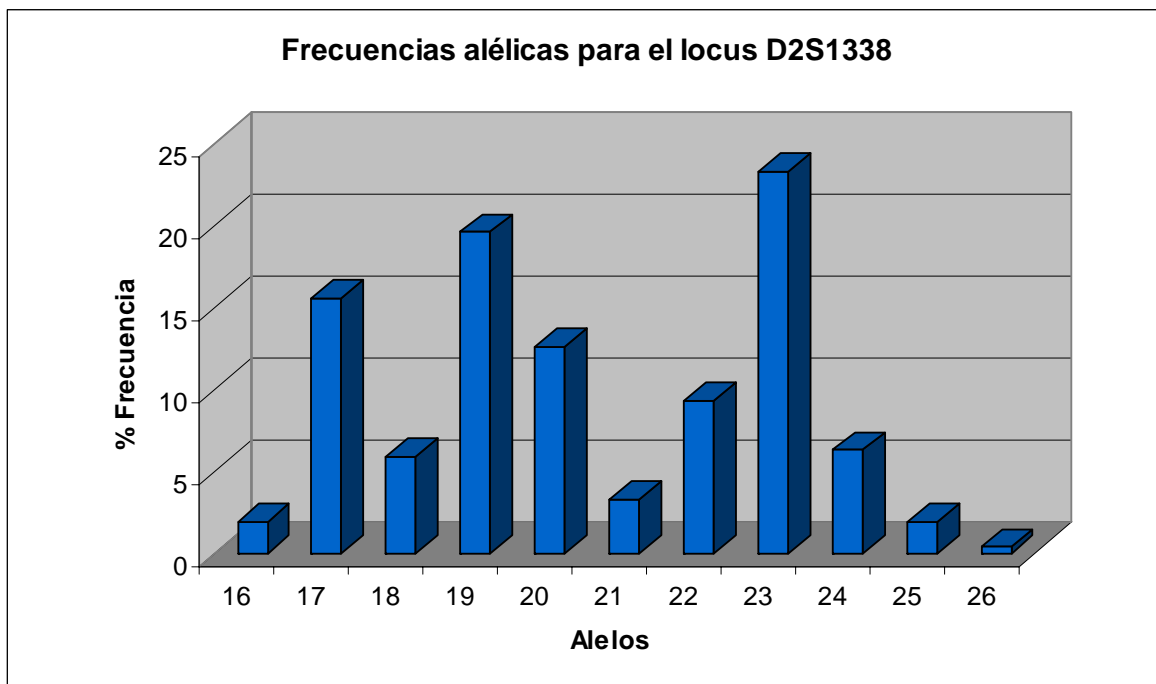


Figura 18. Sistema D2S1338: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus D5S818	
Alelos en el locus D5S818	Población de estudio
7	7
8	1.1
9	4.4
10	8.9
11	44.4
12	25.2
13	7.4
14	1.1
16	0.4

Tabla 18. Frecuencias Alélicas para el locus D5S818

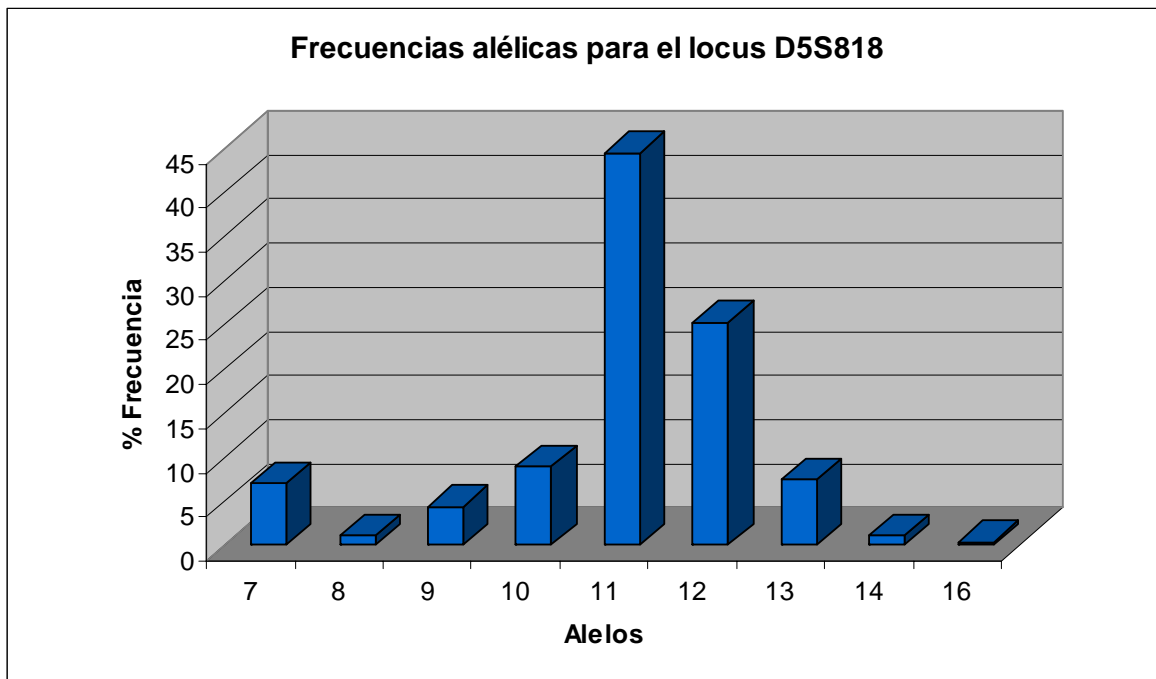


Figura 19. Sistema D5S818: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Frecuencias Alélicas para el locus FGA	
Alelos en el locus FGA	Población de estudio
18	0.7
19	8.1
20	6.7
21	11.9
22	15.2
23	14.1
24	17.4
25	15.2
26	7
27	3
29	0.4
32.2	0.4

Tabla 19. Frecuencias Alélicas para el locus FGA

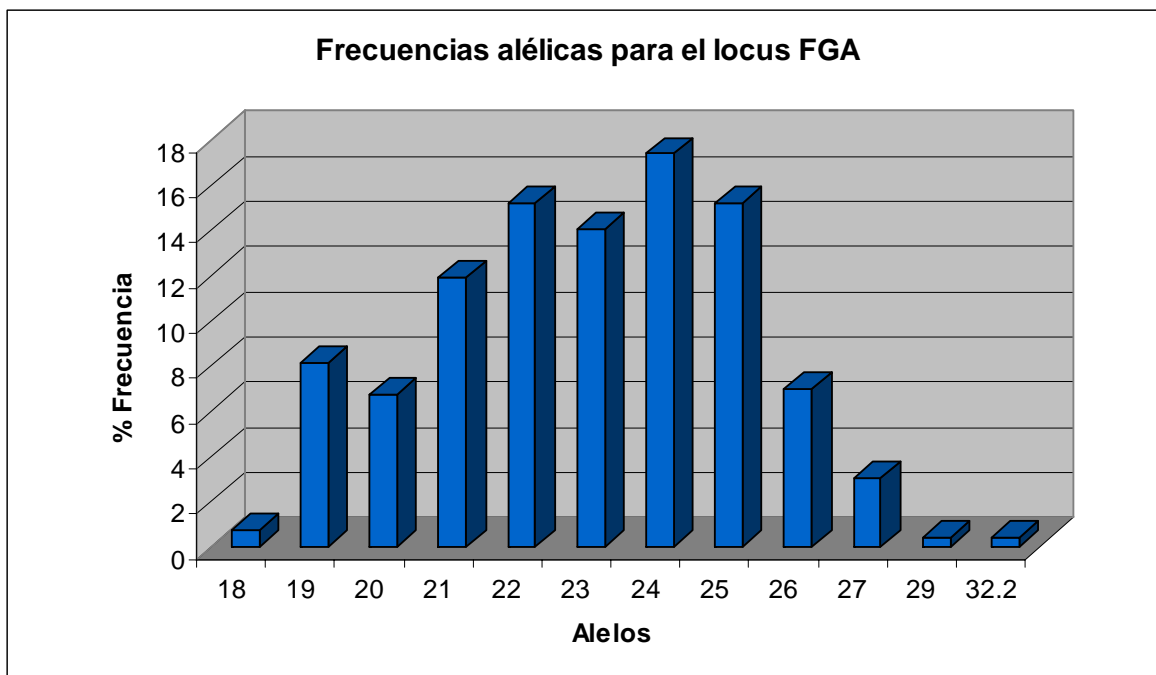


Figura 20. Sistema FGA: Frecuencias alélicas en la población de estudio

Datos de 15 Loci STR en una muestra de la Población del Valle de México

Tabla 20. Frecuencias Alélicas encontradas en la población de estudio.

Alelo	D8S1179	D21S11	D7S820	CSFIPO	D3S1358	THO1	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	VWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
4						0.4									
6						33.7						0.7			
7			0.4	0.4		35.6						1.1		7.0	
8	0.7		8.9	0.4		5.9	7.4	1.1				50.7		1.1	
9	1.1		5.9	1.1		7.8	26.3	8.5				3.7		4.4	
9.3						15.9									
10	10.7		26.7	28.1		0.7	15.6	21.9				5.9		8.9	
11	4.4		30	28.9			21.5	25.9		1.1		26.7	1.5	44.4	
12	15.9		22.6	35.9			18.5	30		5.2		11.1	13.0	25.2	
12.2										2.2					
13	28.5		4.4	4.1	1.1		6.3	10.7		16.3	0.7		12.6	7.4	
13.2										13.3			1.1		
14	21.9		1.1	1.1	7.0		4.4	1.9		25.6	4.4		17.8	1.1	
14.2										5.9					
15	14.1				45.9					10.7	7.8		17.0		
15.2										11.1					
16	2.6				28.1				1.9	4.4	33.2		10.7	0.4	
16.2										3.7					
17					12.2				15.6		25.2		13.7		
17.2										0.4					
18					5.2				5.9		20.7		5.2		0.7
19					0.4				19.6		6.7		3.3		8.1
20									12.6		1.1		2.2		6.7
21									3.3						11.9
22									9.3				0.4		15.2
23									23.3				0.7		14.1
24									6.3						17.4
24.2		1.1													
25								1.9							15.2
26		0.4						0.4					0.7		7.0
27		1.1													3.0
28		7.4													
29		20.4													0.4
30		28.5													
30.2		0.4													
31		5.6													
31.2		15.2													
32		1.5													
32.2		13.7													0.4
33.2		3.7													
34.2		0.7													
36		0.4													

STR	PM	PD	PIC	PE	PIT	Het (%)	Hom (%)
D8S1179	0.075	0.925	0.79	0.585	2.41	79.3	20.7
D21S11	0.063	0.937	0.80	0.655	2.93	83.0	17.0
D7S820	0.091	0.909	0.74	0.599	2.50	80	20
CSFIPO	0.159	0.841	0.65	0.545	2.18	77	23
D3S1358	0.143	0.857	0.64	0.469	1.82	72.6	27.4
THO1	0.121	0.879	0.68	0.469	1.82	72.6	27.4
D13S317	0.063	0.937	0.79	0.684	3.21	84.4	15.6
D16S539	0.097	0.903	0.74	0.655	2.93	83.0	17.0
D2S1338	0.044	0.956	0.83	0.713	3.55	85.9	14.1
D19S433	0.045	0.955	0.84	0.803	5.19	90.4	9.6
VWA	0.087	0.913	0.74	0.519	2.05	75.6	24.4
TPOX	0.201	0.799	0.61	0.4	1.57	68.1	31.9
D18S51	0.035	0.965	0.86	0.669	3.07	83.7	16.3
D5S818	0.111	0.889	0.68	0.507	1.99	74.8	25.2
FGA	0.037	0.963	0.86	0.818	5.63	91.1	8.9

Tabla 21 Índices forenses generados con el programa PowerStat V1.2
 Probabilidad de concordancia o Matching (PM); Poder de Discriminación (PD), Poder de Contenido de Información (PIC); Probabilidad de Exclusión (PE); Índice Típico de Paternidad (PIT).

1.2.- ESTUDIO COMPARATIVO CON OTRAS POBLACIONES.

Se compararon los datos obtenidos de 15 STRs autosómicos obtenidos de la población de estudio con los datos publicados con anterioridad para esta misma población, así como con los datos referidos a una muestra de la población de la zona central del país.

La comparación se llevo acabo mediante el software Arlequín. V 3.11, comparando la homogeneidad de las frecuencias alélicas de las tres poblaciones analizadas. [78]

STR	Valor de p para la Población de estudio vs Valle de México	Valor de p para la Población de estudio vs Zona Central del país
D8S1179	0.43405 ± 0.0401	0.96705 ± 0.0053
D21S11	0.77035 ± 0.0376	0.95635 ± 0.0046
D7S820	0.96325 ± 0.0089	0.79090 ± 0.0087
CSFIPO	0.96915 ± 0.0052	0.98735 ± 0.0026
D3S1358	0.96565 ± 0.0078	0.00001 ± -0.0000
THO1	0.56670 ± 0.0202	0.41860 ± 0.0355
D13S317	0.66365 ± 0.0585	0.40915 ± 0.0456
D16S539	0.93220 ± 0.0038	0.50250 ± 0.0333
D2S1338	0.53470 ± 0.0273	0.41670 ± 0.0709
D19S433	0.93065 ± 0.0183	0.82815 ± 0.0421
VWA	0.80355 ± 0.0114	0.21120 ± 0.0641
TPOX	0.46790 ± 0.0182	0.55885 ± 0.0157
D18S51	0.52825 ± 0.0480	0.96580 ± 0.0095
D5S818	0.35835 ± 0.0136	0.96860 ± 0.0017
FGA	0.80245 ± 0.0127	0.98115 ± 0.0011

Tabla 22 Valores de Fst entre: A) la población de estudio con respecto a los datos reportados con anterioridad y B) la población de estudio con respecto a la población de la zona central del país, aun nivel de significancia de 0.05. Los valores de p menores al valor de significancia indican que las poblaciones son apreciablemente diferentes. [78]

1.2.1.-Locus D8S1179.

En el estudio comparativo de las frecuencias alélicas de la población de estudio con respecto a las frecuencias alélicas reportadas anteriormente para esta población y las frecuencias reportadas para la población de la zona central del país no se observan diferencias significativas para este locus.

En la muestra de estudio no se encontró el alelo 17 el cual está presente en las otras dos poblaciones, siendo este alelo el menos común en ambas, mientras que en la población estudiada el alelo menos común fue el 8.

En el caso de las tres poblaciones el alelo 13 es el que presenta una frecuencia mayor.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D8S1179			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
8	1.04	1.18	0.7
9	0.83	1.18	1.1
10	8.7	9	10.7
11	3.73	6.64	4.4
12	11.8	14.46	15.9
13	34.37	31.99	28.5
14	28.99	22.99	21.9
15	9.52	9.95	14.1
16	0.83	2.37	2.6
17	0.21	0.24	

Tabla 23. Frecuencias Alélicas para el locus D8S1179

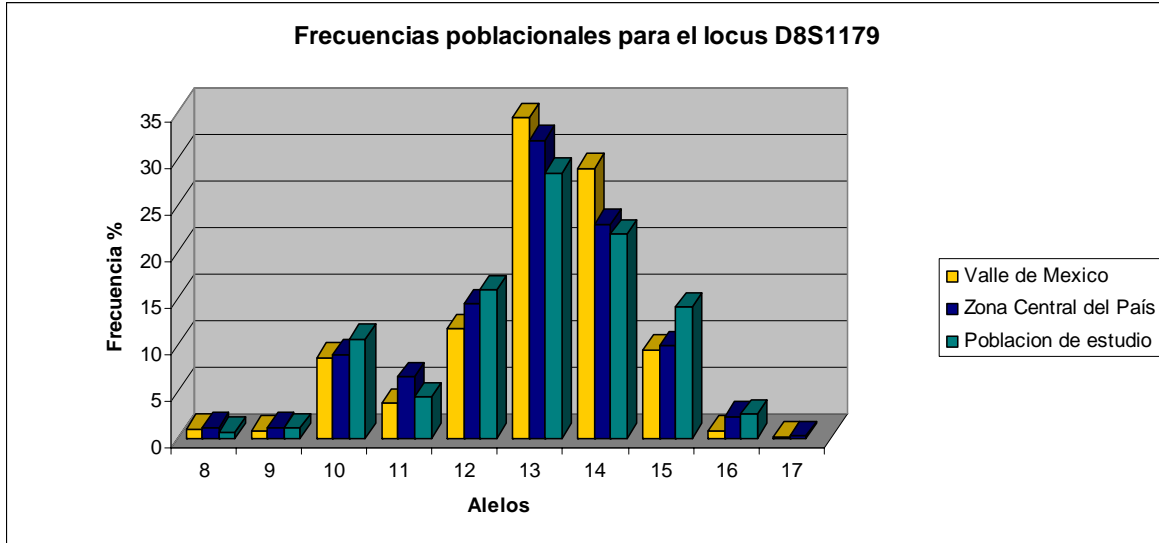


Figura 21. Sistema D8S1179: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.2. - Locus D21S11.

Se observa una gran variabilidad alélica en las tres poblaciones, en la población de la zona central del país se observa la presencia de los alelos 19, 31.1, 36.2 y 37, los cuales se encuentran ausentes en los datos de las muestras de la población del valle de México; además se encontró en la población analizada la presencia del alelo 26, el cual no se encuentra en los datos reportados anteriormente para esta población y el alelo 36, el cual solo no se encuentra reportado en otras dos poblaciones. Puede observarse también que el alelo 34.2 esta presente tanto en la población de la zona central del país como en la población analizada, pero no se había reportado anteriormente para esta última.

El alelo 30 es el más común en las tres poblaciones analizadas, por otra parte se observa que el alelo 35, es el menos común en la población del valle de México, mientras que para la población de la zona central del país los alelos menos comunes son el 19, 36.2 y 37, y en la población de estudio el alelo menos común fue el 36.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D21S11			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
19		0.24	
24.2	0.41		1.1
25		0.47	
26		0.71	0.4
27	0.83	1.66	1.1
28	6.61	9.48	7.4
28.2		0.24	
29	19.01	21.33	20.4
29.2	1.03	0.47	
30	28.1	23.46	28.5
30.2	2.89	2.61	0.4
31	9.3	6.4	5.6
31.1		0.47	
31.2	14.3	12.8	15.2
32	1.9	0.71	1.5
32.2	10.3	11.37	13.7
33.2	5.2	5.69	3.7
34.2		0.71	0.7
35	0.21	0.47	
36			0.4
36.2		0.24	
37		0.24	

Tabla 24. Frecuencias Alélicas para el locus D21S11

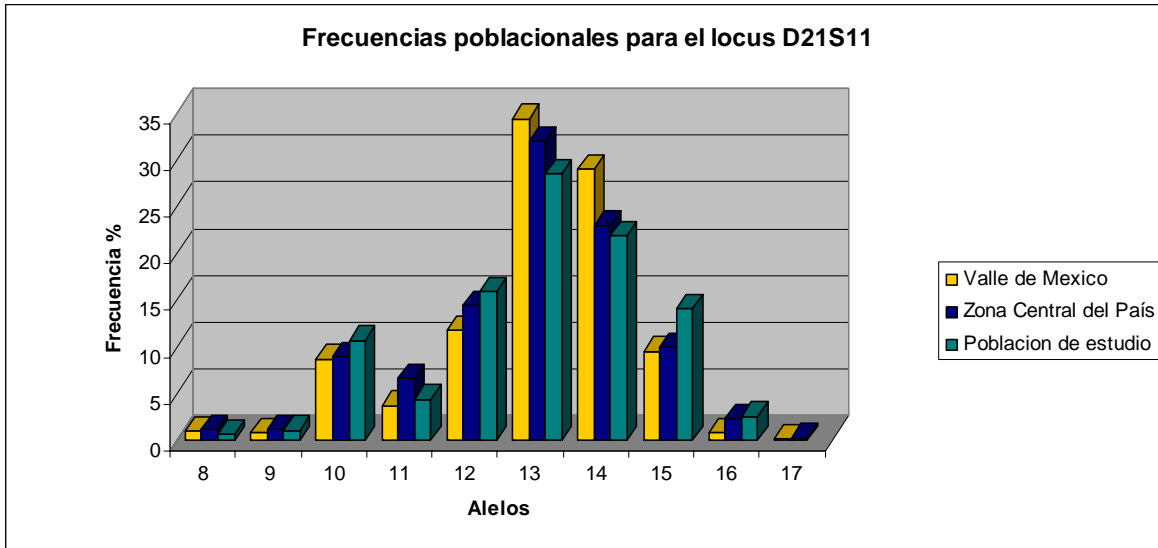


Figura 22. Sistema D21S11: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.3.- Locus D7S820

Se encontraron 8 alelos en la población de estudio, siendo el alelo 11 el más frecuente lo cual concuerda con los datos reportados con anterioridad, no así para el alelo menos común el cual en la población analizada fue el 7, mientras que los datos previos arrojan al alelo 14 como el de menor frecuencia.

En la población de la región central del país se reportan 9 alelos, de los cuales el de mayor frecuencia es al igual que las poblaciones del valle de México el alelo 11 y el de menor frecuencia el 14.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D7S820			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
7	0.83	0.95	0.4
8	7.64	13.03	8.9
9	4.34	8.29	5.9
9.2		1.18	
10	23.76	22.04	26.7
11	33.88	32.22	30
12	24.79	17.54	22.6
13	4.34	4.5	4.4
14	0.21	0.24	1.1

Tabla 25. Frecuencias Alélicas para el locus D7S820

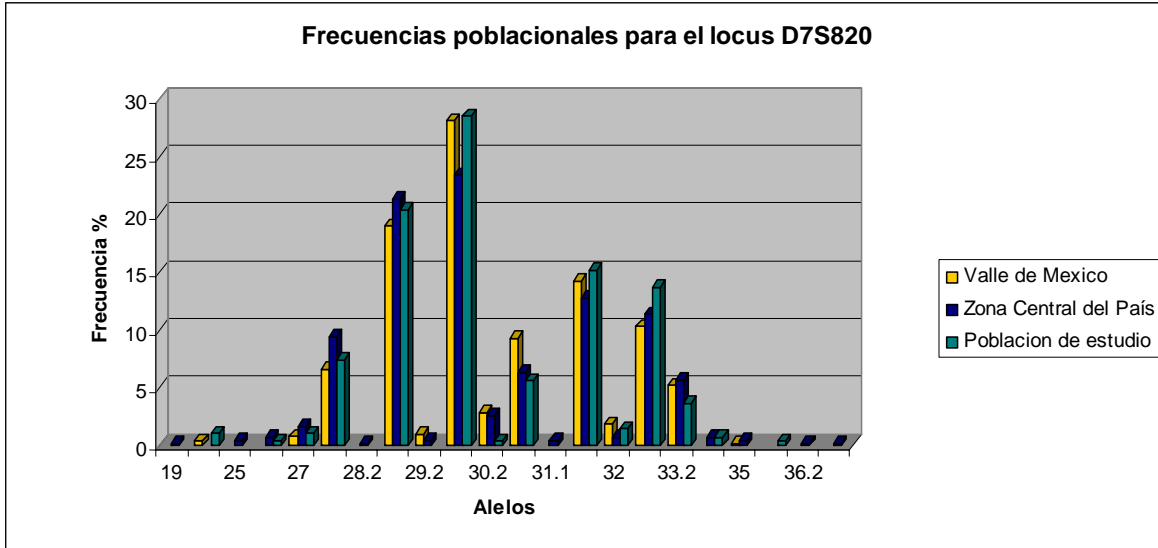


Figura 23. Sistema D7S820: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.4.- Locus CSFIPO

Para este sistema el alelo más común en las tres poblaciones es el alelo 12, mientras que los alelos menos comunes son el 14 para el valle de México y los alelos 7 y 8 para la población estudiada, mientras que para la zona central del país los alelos menos comunes son los alelos 7, 13.2 y 15

Se encontró que el alelo 10.2 y 13.2 solo están presentes en la población de la zona central del país. Mientras que el alelo 15 no se encuentra en la población de estudio pero si en los datos reportados anteriormente para la población del valle de México.

% de Frecuencias Alélicas para el locus CSF1PO			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
7	0.62	0.24	0.4
8	0.62	0.47	0.4
9	1.45	2.61	1.1
10	28.72	26.78	28.1
10.2		0.24	
11	24.79	29.62	28.9
12	36.57	34.12	35.9
13	6.8	4.98	4.1
13.2		0.24	
14	0.4	0.47	1.1
15		0.24	

Tabla 26. Frecuencias Alélicas para el locus CSF1PO

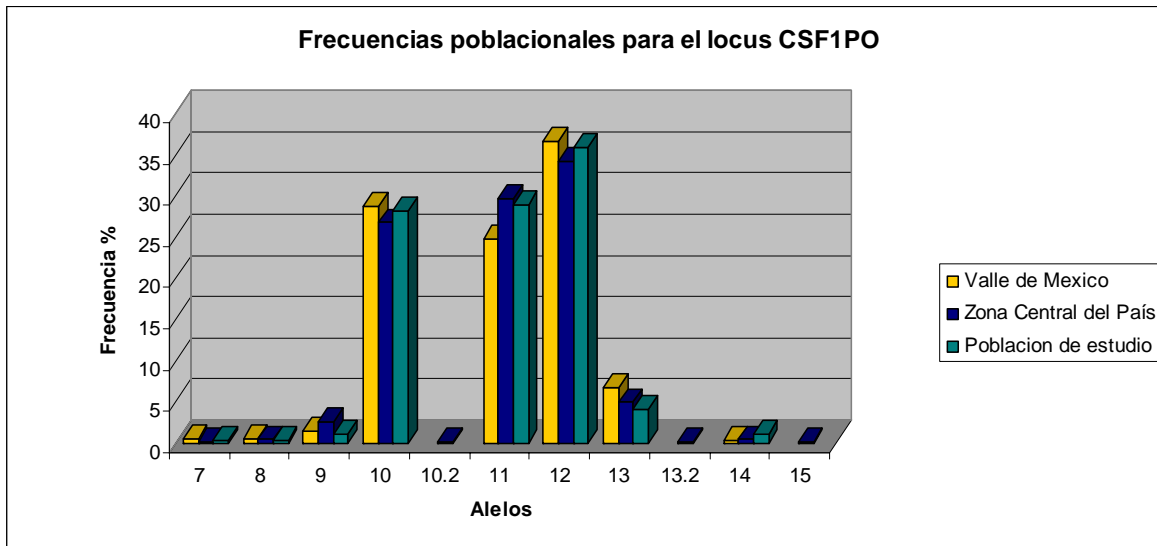


Figura 24. Sistema CSF1PO: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.5.- Locus D3S1358

Para este locus se encontraron los alelos 11, 15.2, 16.3, 18.2 y 20; los cuales no están presentes en las dos poblaciones del Valle de México.

Se observa que el alelo 15 es el más común en las poblaciones del Valle de México, mientras que para la zona central del país el alelo mas común es el 16, aunque la frecuencia con que este alelo aparece en las tres poblaciones es

similar. Por otra parte se encontró que los alelos menos comunes en la población de la zona central del país son los alelos 15.2, 18.2 y 20, los cuales presentan la misma frecuencia, y para las muestras de la poblaciones del valle de México el alelo menos frecuente es el 19.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D3S1358			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
11		1.66	
13	1.03	0.71	1.1
14	5.99	6.16	7
15	49.59	21.56	45.9
15.2		0.24	
16	24.79	28.67	28.1
16.2		1.18	
17	13.84	21.56	12.2
18	4.13	10.9	5.2
18.2		0.24	
19	0.62	6.87	0.4
20		0.24	

Tabla 27. Frecuencias alélicas para el locus D3S1358

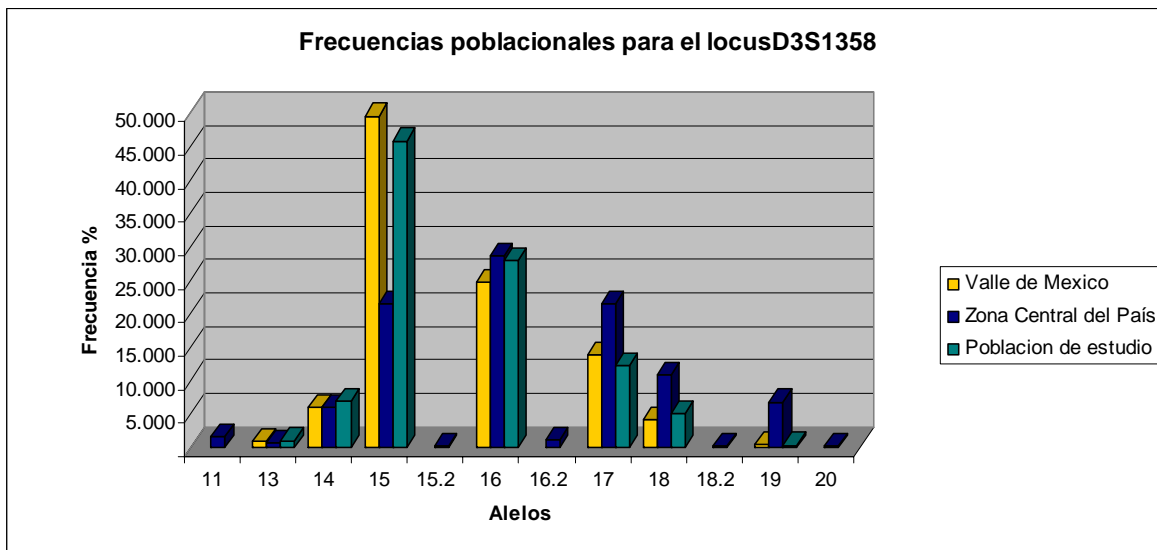


Figura 25. Sistema D3S1358: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.6.- Locus THO1.

Se encontró que en los datos reportados para la población de la zona central del país están presentes los alelos 5 y 9.2 los cuales no se encontraron en las poblaciones del valle de México, siendo también estos alelos los que aparecen con menor frecuencia en esta población. Mientras que el alelo más común para este locus en las tres poblaciones es el 7.

Por otra parte en la población de estudio se encontró el alelo 4, el cual no se encuentra en los datos reportados anteriormente para esta población, siendo también este alelo el que presenta una menor frecuencia en comparación con los datos anteriores en lo que el alelo menos frecuente es alelo 10.

% de Frecuencias Alélicas para el locus THO1			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
4		0.47	0.4
5		0.24	
6	27.69	25.59	33.7
7	37.81	31.75	35.6
8	5.79	7.58	5.9
9	6.4	12.8	7.8
9.2		0.24	
9.3	20.66	18.72	15.9
10	1.65	2.61	0.7

Tabla 28. Frecuencias alélicas para el locus THO1

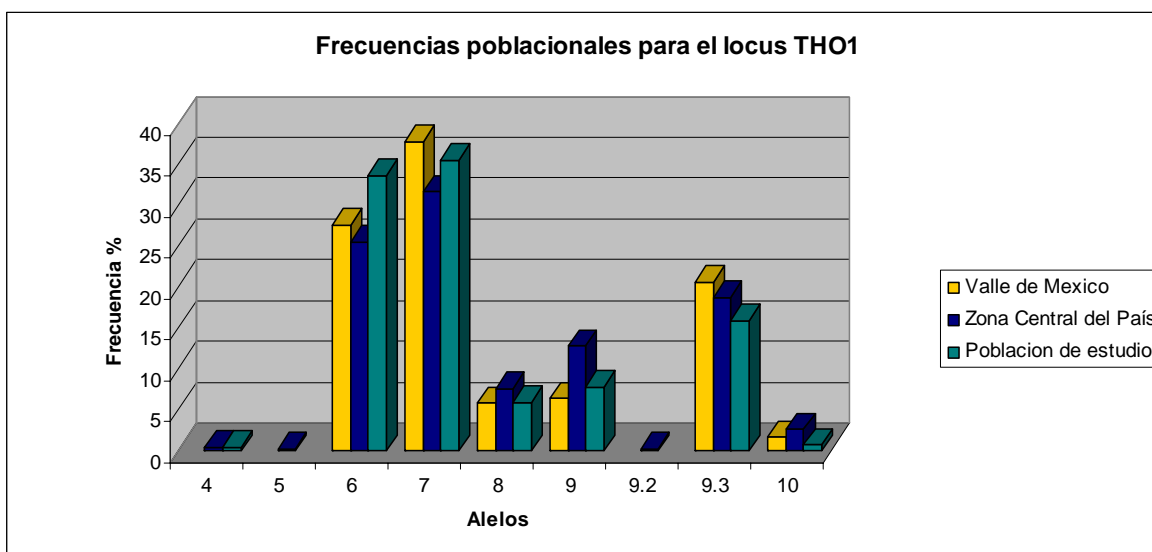


Figura 26. Sistema THO1: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.7.-Locus D13S317.

El alelo mas común en este sistema para la población de estudio es el alelo 12, mientras que en los datos reportados previamente para la población del Valle de México, así como en los datos reportados para la zona central del país el alelo mas común es el 12. En el caso de los alelos menos frecuentes en la población de estudio, así como en los datos reportados anteriormente para una muestra de esta misma población se encontró que los alelos menos comunes son el 14 y el 8 respectivamente, mientras que para la población de la zona centro del país los alelos menos frecuentes son los alelos 17 y 18 los cuales comparten la misma frecuencia, además de que junto con el alelo 15 solo están presentes en esta población.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D13S317			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
8	6.4	7.58	7.4
9	26.03	18.96	26.3
10	12.6	10.9	15.6
11	16.9	23.22	21.5
12	20.25	26.54	18.5
13	10.33	9	6.3
14	7.44	2.61	4.4
15		0.47	
17		0.24	
18		0.47	

Tabla 29. Frecuencias Alélicas para el locus D13S317

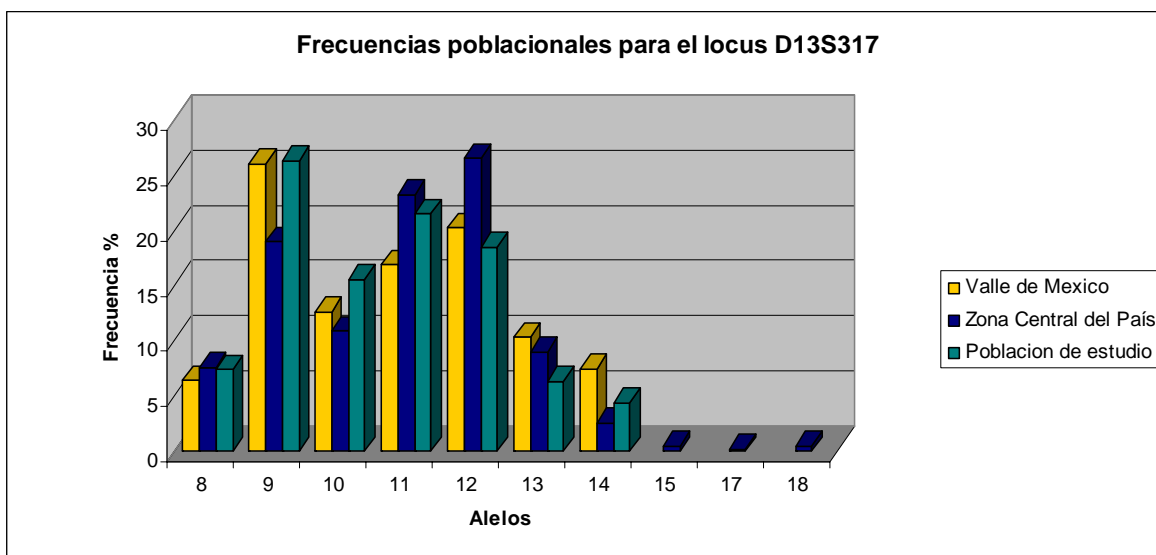


Figura 27. Sistema D13S317: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.8.- Locus D16S539.

En los datos reportados anteriormente para la zona del valle de México se observa la presencia del alelo 15 el cual no se encuentra en los datos de las otras dos poblaciones, siendo también dicho alelo el menos frecuente en esa población; mientras que en la población de estudio, así como para la región central del país los alelos menos comunes son el alelo 8 y 5 respectivamente, encontrándose este último solo en dicha población. El alelo más común para las tres poblaciones es el alelo 12.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D16S539			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
5		0.24	
8	0.83	0.95	1.1
9	10.12	10.9	8.5
10	24.17	13.27	21.9
11	23.14	27.01	25.9
12	31.61	33.18	30
13	9.3	12.56	10.7
14	0.62	1.9	1.9
15	0.21		

Tabla 30. Frecuencias Alélicas para el locus D16S539

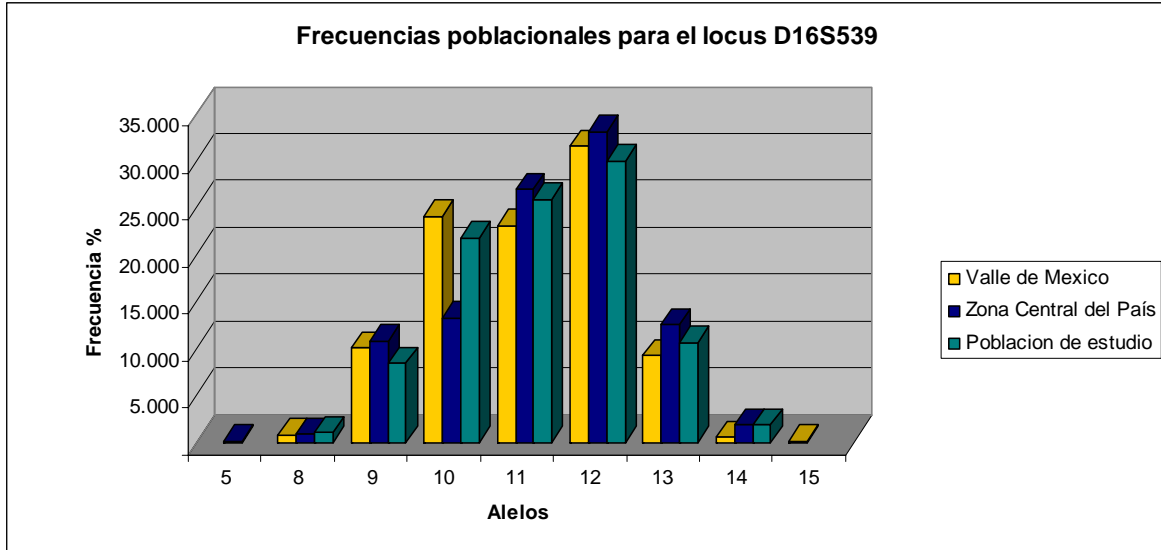


Figura 28. Sistema D16S539: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.9.- Locus D2S1338.

En la población de la zona central del país se observa una gran diversidad alelica, ya que en dicha población están presentes 3 alelos que no se encuentran en las dos poblaciones del valle de México, dichos alelos son el 14, 15 y 27, siendo también el primero y el último los que comparten una menor frecuencia junto con el alelo 26 para dicha población; siendo también este mismo alelo el menos común en ambas muestras poblacionales del valle de México. No así para el caso del alelo que presenta una mayor frecuencia, siendo este el alelo 23 para la población de estudio, mientras que para las otras dos poblaciones el alelo más común es el 19.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D2S1338			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
14		0.24	
15		0.48	
16	1.4	3.83	1.9
17	16.3	16.03	15.6
18	5.8	5.74	5.9
19	26.9	22.73	19.6
20	16.3	16.75	12.6
21	1	2.63	3.3
22	6.2	6.47	9.3
23	17.8	11.24	23.3
24	6	8.37	6.3
25	1.7	5.02	1.9
26	0.6	0.24	0.4
27		0.24	

Tabla 31. Frecuencias Alélicas para el locus D2S1338

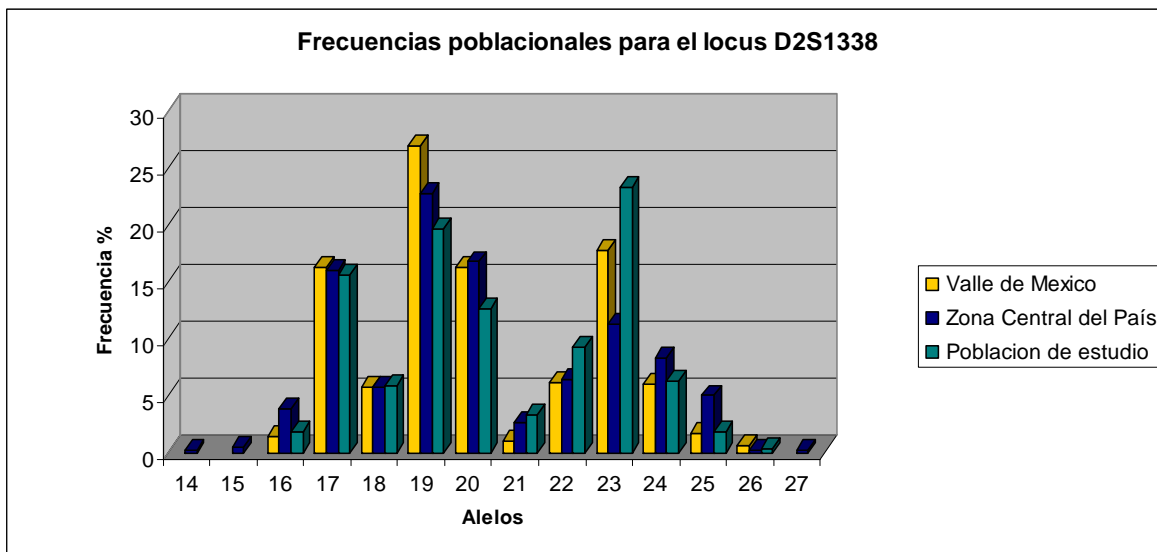


Figura 29. Sistema D2S1338: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.10.- Locus D19S433.

Se encontró en la población analizada la presencia de alelo 17.2, siendo dicho alelo el menos frecuente a diferencia de los datos reportados con anterioridad en los cuales el alelo menos común es el 11.2, mientras que para la zona central del país los alelos menos comunes son 9, 10, 10.2 y 17, los cuales aparecen con la misma frecuencia poblacional.

Al igual que en el locus anterior se observa una gran variabilidad alélica en la población de la zona centro del país ya que se encuentran reportados tres alelos mas que no aparecen en ninguno de los datos de ambas poblaciones del valle de México, y en el caso de la población de estudio además de los tres alelos mencionados se observa la ausencia de los alelos 10.2, 11.2 y 17, los cuales si se encuentran en las otras dos poblaciones. Por otra parte las tres poblaciones comparten el alelo 14 como alelo más común en ellas.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D19S433			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
9		0.24	
9.2		0.95	
10		0.24	
10.2	0.41	0.24	
11	0.83	0.71	1.1
11.2	0.21	0.24	
12	5.58	7.58	5.2
12.2	2.69	3.08	2.2
13	17.15	15.64	16.3
13.2	10.54	8.77	13.3
14	24.17	23.46	25.6
14.2	6.4	5.45	5.9
15	14.67	15.88	10.7
15.2	10.74	8.06	11.1
16	4.13	6.64	4.4
16.2	1.65	2.37	3.7
17	0.83	0.24	
17.2			0.4

Tabla 32. Frecuencias Alélicas para el locus D19S433

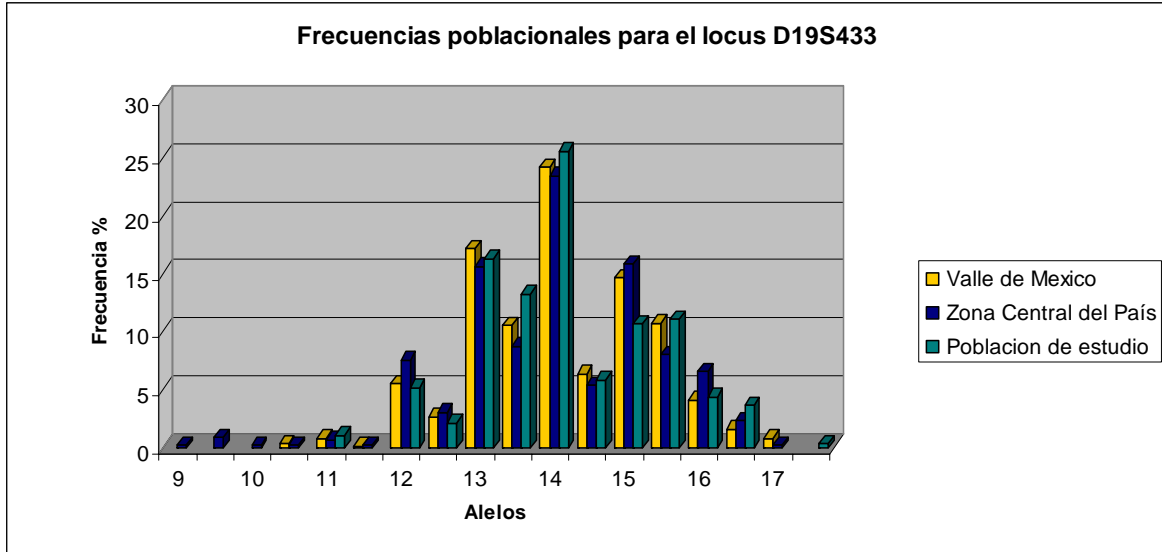


Figura 30. Sistema D19S433: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.11.- Locus vWA.

En la tres poblaciones se observa variabilidad alélica al encontrar la presencia o ausencia de ciertos alelos en las diferentes poblaciones, no obstante se puede apreciar que el alelo que presenta una mayor frecuencia en las tres poblaciones es el alelo 16, lo cual no ocurre para el alelo menos frecuente el cual en el caso de los datos reportados con anterioridad para el valle de México, así como para la población de estudio dicho alelo es 10 y 13 respectivamente. Mientras que los alelos 21 y 22 los cuales tienen la misma frecuencia son los menos comunes para la región central del país.

% de Frecuencias Alélicas para el locus vWA			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
10	0.21		
13	0.41		0.7
14	6.4	11.61	4.4
15	6.2	9.48	7.8
15.2		0.24	
16	35.71	31.75	33.2
17	29.3	26.54	25.2
18	14.9	13.74	20.7
19	6.4	5.69	6.7
20	0.4		1.1
21		0.24	
22		0.24	
23		0.47	

Tabla 33. Frecuencias Alélicas para el locus vWA

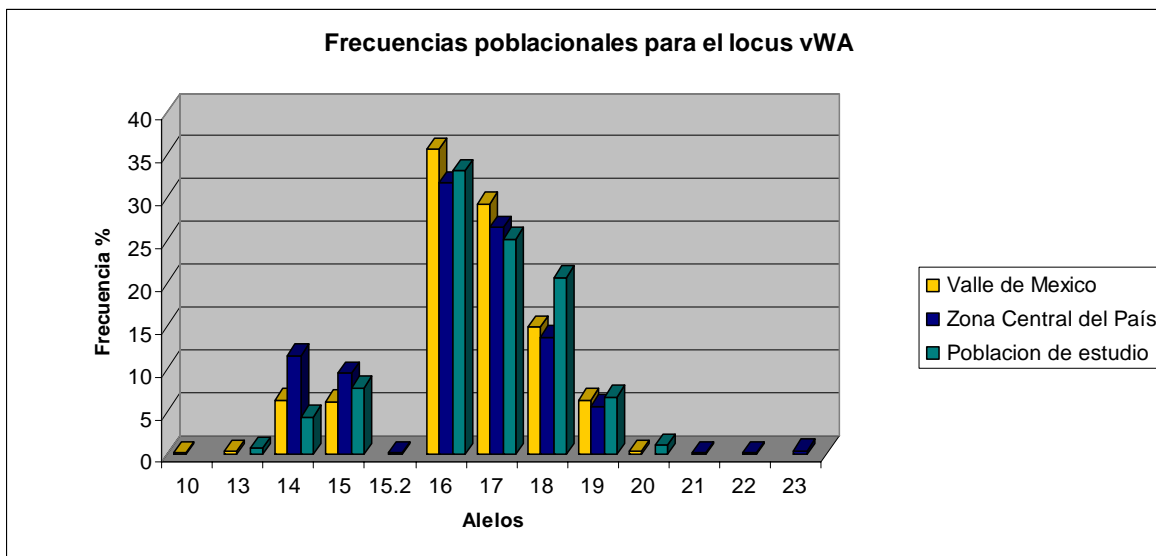


Figura 31. Sistema vWA: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.12.- Locus TPOX.

Para este locus el alelo 6 es el alelo menos frecuente en la población de estudio, así como en la zona central del país, mientras que en los datos reportados previamente para el valle de México dicho alelo es el 7; no obstante las tres poblaciones comparten el alelo 8 como el alelo más frecuente.

% de Frecuencias Alélicas para el locus TPOX			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
6		0.71	0.7
7	0.41		1.1
8	52.48	48.58	50.7
9	4.34	6.64	3.7
10	2.48	3.32	5.9
11	28.1	26.07	26.7
12	11.98	14.45	11.1
13		0.24	

Tabla 34. Frecuencias Alélicas para el locus TPOX

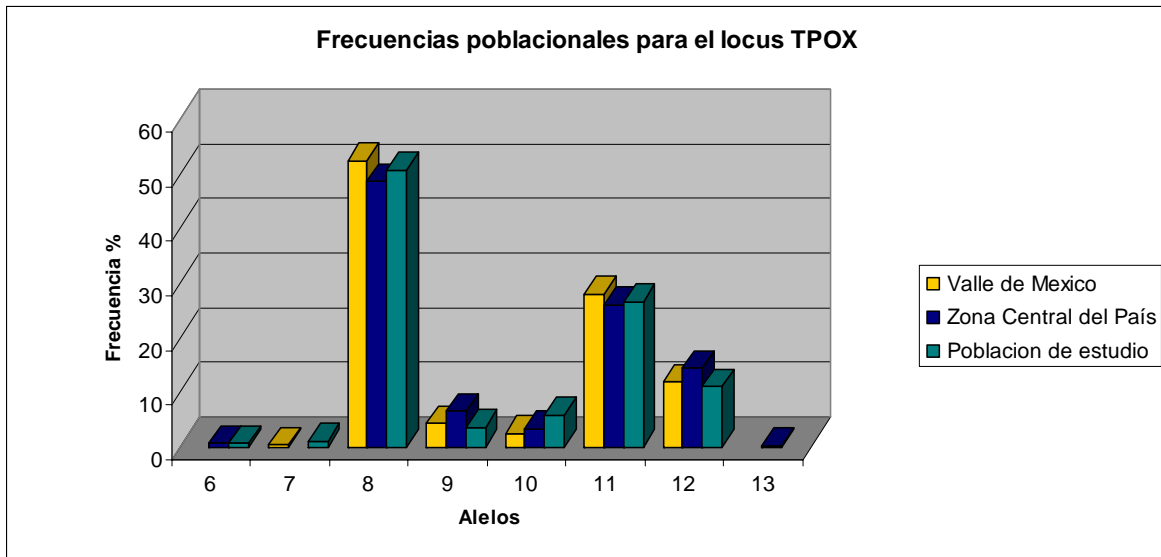


Figura 32. Sistema TPOX: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.13.- Locus D18S51.

La población de estudio para este locus es la que presenta un menor número de alelos encontrados con 14, en comparación con los 16 alelos reportados anteriormente; este mismo número de alelos es el que se puede observar en la población del centro del país, sin embargo los diferentes alelos reportados varían entre una población y otra en cuanto a su aparición y frecuencia, aunque para las tres poblaciones el alelo más común es el alelo 14; mientras que los alelos que aparecen con menor frecuencia son el 22 para la población de estudio, 22.2 y 23 para los datos previamente reportados y 9.2, 23 y 27 para la zona central del país.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D18S51			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
9.2		0.24	
10	0.41		
11	0.21	1.44	1.5
12	9.71	13.88	13
13	14.88	16.99	12.6
13.2		0.96	1.1
14	16.94	16.27	17.8
15	16.3	12.44	17
16	9.9	11.72	10.7
17	16.7	15.07	13.7
18	5.6	6.22	5.2
19	2.9	2.39	3.3
20	2.3	0.96	2.2
21	1.9	0.48	
22	1.4	0.48	0.4
22.2	0.2		
23	0.2	0.24	0.7
25	0.4		
26			0.7
27		0.24	

Tabla 35. Frecuencias Alélicas para el locus D18S51

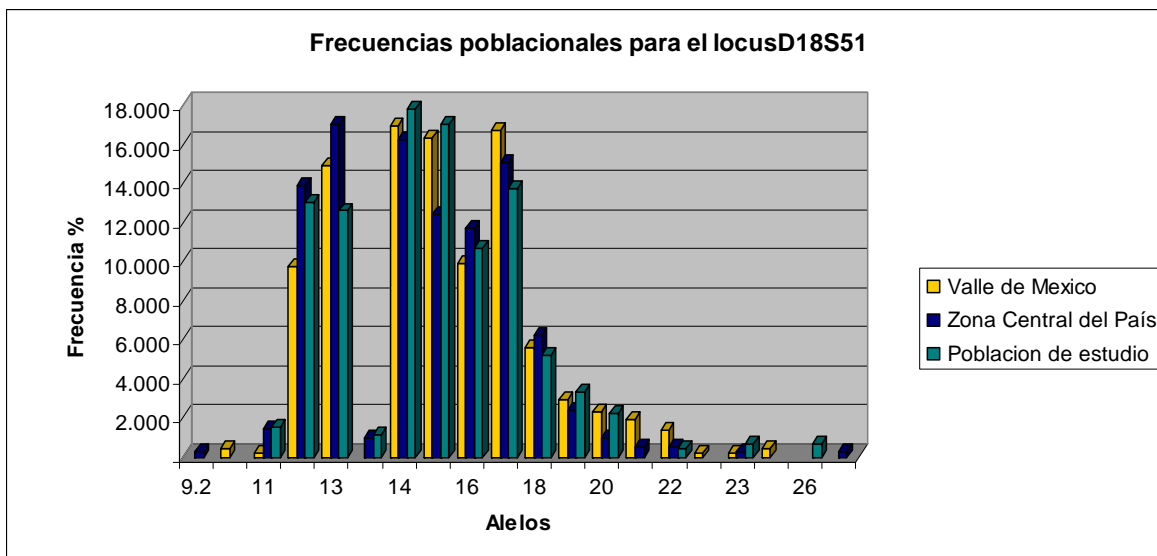


Figura 33. Sistema D18S51: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.14.- Locus D5S818.

Se encontraron 9 alelos en la población de estudio, en contraste con los 7 alelos reportados anteriormente para la población del valle de México y los 10 alelos reportados en para la zona centro de México.

Los alelos con menor frecuencia para el valle de México son el 8 y el 16 para la población previamente reportada y para la población de estudio respectivamente, mientras que para la zona central del país dichos alelos son el 6 y 16.

% de Frecuencias Alélicas para el locus D5S818			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
6		0.24	
7	6.42	4.74	7
8	0.21	2.13	1.1
9	4.8	4.98	4.4
10	5.18	6.4	8.9
11	50.52	44.08	44.4
12	21.33	26.3	25.2
13	11.59	9.95	7.4
14		0.95	1.1
16		0.24	0.4

Tabla 36. Frecuencias Alélicas para el locus D5S818

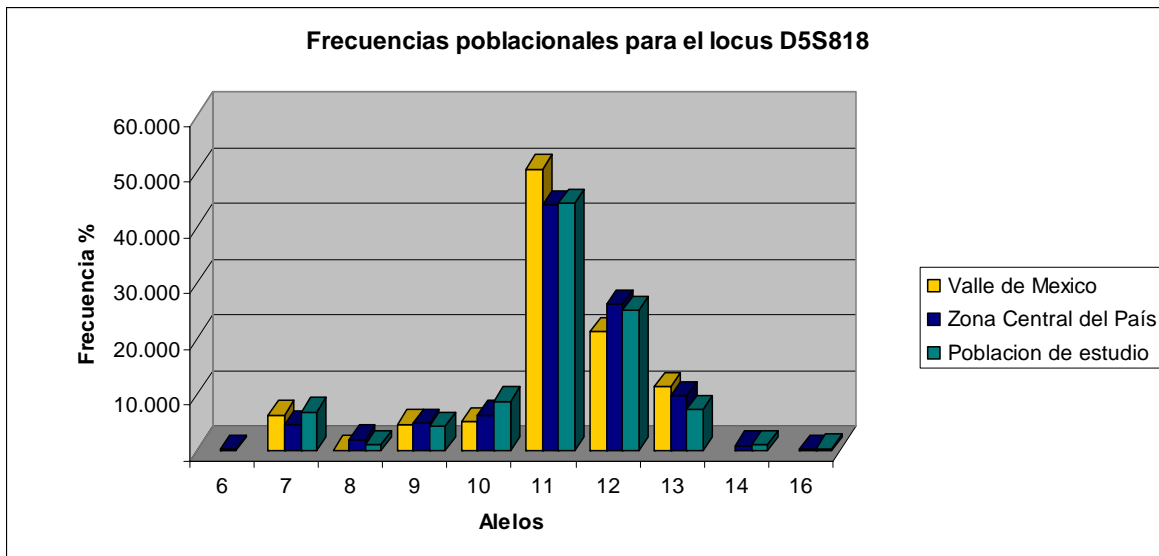


Figura 34. Sistema D5S818: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

1.2.15.- Locus FGA.

En la población de estudio se encontraron 12 alelos para este locus, siendo los alelos 29 y 32.2 los que presentan una frecuencia menor, en comparación con el alelo 24 el cual presenta la mayor frecuencia en comparación con los datos reportados previamente para esta población, en los cuales el alelo 25 es el que se presenta con una mayor frecuencia, mientras que los alelos 24.2 y 28 son los que tienen una frecuencia menor. Para la zona central del país, los alelos 29 y 24 son los que presentan una frecuencia menor y mayor respectivamente.

% de Frecuencias Alélicas para el locus FGA			
Alelos	Valle de México	Zona Central del País	Población de Estudio
17		0.47	
18	0.8	0.71	0.7
19	9.09	8.53	8.1
20	7.44	7.58	6.7
20.2	0.21		
21	9.3	13.03	11.9
22	11.36	13.27	15.2
22.2	0.21		
23	16.94	17.3	14.1
24	12.4	14.69	17.4
24.2	0.21		
25	19.42	12.56	15.2
26	10.33	7.11	7
26.2		0.95	
27	1.65	2.61	3
28	0.21	0.95	
29	0.41	0.24	0.4
32.2			0.4

Tabla 37. Frecuencias Alélicas para el locus FGA

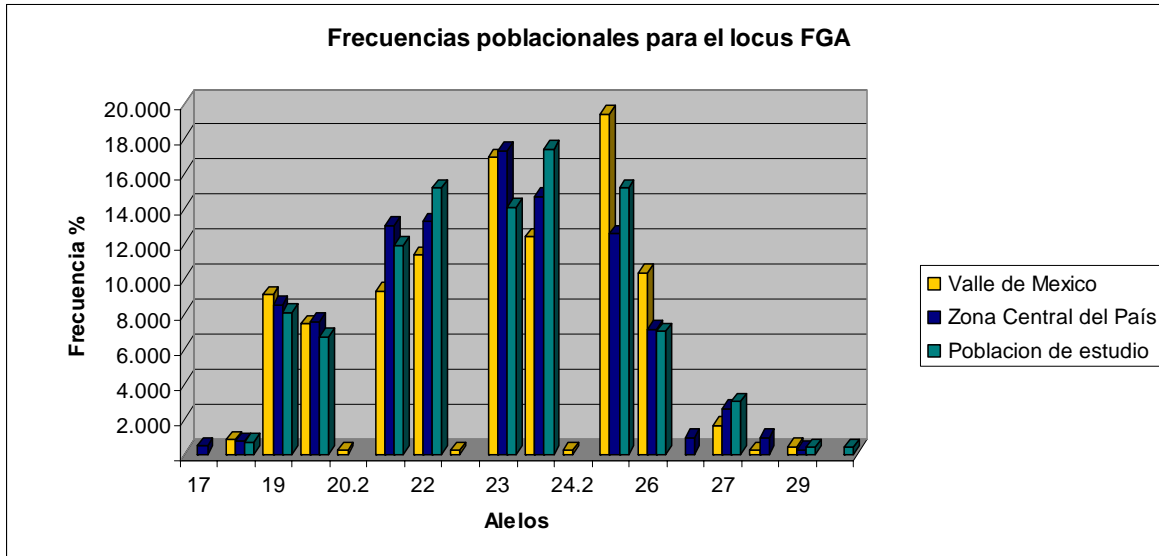


Figura 35. Sistema FGA: Comparación de frecuencias alélicas en tres poblaciones de México

VI.- DISCUSIÓN

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en un estudio de ADN para lograr un "índice de parentesco" o una "probabilidad combinada de coincidencia al azar" requiere del conocimiento de la frecuencia poblacional de los marcadores genéticos empleados en la determinación de los perfiles genéticos, ya que esta información es parte constitutiva de todas las fórmulas utilizadas en los casos forenses, así como en la investigación biológica de la paternidad.

Analizando las proporciones genotípicas esperadas para la población de estudio en el equilibrio genético de los 15 loci analizados, después de realizar la prueba de Chi cuadrada (X^2), se determinó que la población está en equilibrio, debido a que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias genotípicas esperadas y observadas. Es importante considerar que el mismo resultado de equilibrio fue obtenido usando la prueba exacta de Fisher, que es más adecuada para muestras poblacionales de un número pequeño mayor a 30 con distribución normal. [79]

La prueba exacta de diferenciación poblacional utilizada, evalúa la hipótesis de que cierto número de alelos diferentes están distribuidos aleatoriamente y que esta distribución alélica es idéntica entre las poblaciones analizadas, es decir, no existen diferencias a nivel genético entre las poblaciones. [80]

El valor de la prueba de F_{st} es obtenido empleando la varianza de las frecuencias alélicas de las poblaciones, dividido entre el promedio de las frecuencias alélicas por uno, menos el promedio de las frecuencias alélicas, [81] mientras que el software Arlequín genera un valor de F_{st} corregido, es decir más cercano a lo que ocurre en poblaciones naturales, empleando el algoritmo matemático de las cadenas de Markov.[78] Los resultados obtenidos de la prueba exacta de diferenciación se muestra en la tabla 22.

Los valores de p obtenidos de la prueba de F_{st} al comparar la distribución de las frecuencias alélicas de las dos poblaciones del Valle de México utilizando el software Arlequín muestran no ser estadísticamente significativos, por lo tanto, se acepta la hipótesis, por consiguiente, no existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de los 15 loci STR de la población de estudio con respecto a los datos reportados anteriormente; por otra parte al comparar las distribuciones de las frecuencias alélicas de la población de estudio con respecto a la de la zona central del país, se observa que existen diferencias significativas en el locus D3S1358 no así, para los otros 14 loci; dichas diferencias pueden explicarse por la presencia de 5 alelos más reportados para la zona central del país, los cuales se encuentran ausentes en la población de estudio, además de que la distribución de las frecuencias alélicas entre estas dos poblaciones es notablemente diferente; cabe resaltar que dicha diferencia puede deberse al número de muestras analizadas en ambas poblaciones, así como a la diversidad alélica que puede

encontrarse entre los propios individuos de las diferentes zonas geográficas estudiadas.

Los STRs analizados constituyen un método de screening rápido y fiable, que permite la inclusión o exclusión del implicado en la investigación biológica de la paternidad, así como en los casos de criminalística, lo que permite hacer una identificación individualizada basada exclusivamente en ellos.

Los 15 STRs tuvieron un poder de coincidencia total de 1 en 3.41×10^{13} individuos y un poder de exclusión combinado de 0.99999999999999

Cuanto más frecuente es en la población un alelo en un marcador genético, contribuye con menor certeza a la discriminación individual. Es por ello que la elaboración y actualización de bases de datos que contengan dichas frecuencias constituyen un aspecto metodológico de importancia; las mismas acumulan información de personas no emparentadas pertenecientes a la población de referencia, entendiendo como tal la población general del área geográfica donde transcurren los hechos.

El empleo de frecuencias distintas a las observadas en esa población de referencia para el cálculo de los índices, tanto de filiación y criminalística debe evitarse, ya que distorsiona los valores de estos índices y en consecuencia afecta la interpretación de los resultados.

VII. - CONCLUSIONES

Primera.- Las frecuencias genotípicas de los 15 microsatélites de la población estudiada cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cuál se constato después de realizar el análisis de Chi cuadrada (χ^2).

Segunda.- No existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de la población estudiada, con respecto a los datos reportados con anterioridad.

Tercera.- Con un valor de p de 0.00001 ± -0.0000 existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de la población estudiada y la de la población de la zona central del país para el locus D3S1358, no así para los restantes 14 loci.

ANEXO

LA PCR

Las etapas de la PCR se llevan a cabo, una tras otra, en episodios cíclicos. [21] El ciclo 1 es como sigue:

- Durante la desnaturalización (cerca de 1 min a 95°C), las cadenas del ADN se separan para formar cadenas sencillas.
- Durante la hibridación (cerca de 1 min a temperaturas que oscilan entre 45°C y 60°C), un cebador se une a una cadena de ADN y otro se une a la cadena complementaria. Los sitios de hibridación de los cebadores se han elegido para que fomenten la síntesis del ADN en la región de interés durante la extensión.
- Durante la extensión (cerca de 1 min a 72°C), la síntesis del ADN se lleva a cabo en la región de interés y con distancias variables en la región flanqueante, produciendo fragmentos de longitudes variables.

Cuando comienza el segundo ciclo, hay en realidad dos tipos de patrón: (1) las cadenas del ADN original; y (2) las cadenas del ADN recién sintetizadas, que constan de la región de interés y de fragmentos de longitud variable de la región flanqueante, en el extremo 3'. Cuando se usa este último patrón en este ciclo, solamente se copia la región de interés.

En el tercer ciclo, la región de interés recién sintetizada (es decir, sin regiones flanqueantes) actúa como patrón. La molécula de ADN original está todavía presente y lo estará hasta el final de la reacción. Sin embargo, después de unos pocos ciclos, el fragmento de ADN recién sintetizado se establece rápidamente como el patrón predominante. [82]

Lo usual es que los ciclos se repitan de 25 a 45 veces. La estandarización de las condiciones de funcionamiento del termociclador es esencial para poder reproducir los resultados.

En la etapa inicial de desnaturalización, es esencial que se desnaturalice completamente el patrón de ADN. La desnaturalización incompleta del ADN dará como resultado el uso ineficiente del patrón en el primer ciclo de amplificación y, en consecuencia, en un escaso rendimiento del producto de la PCR.

La temperatura de hibridación se calcula en 5°C por debajo de la temperatura de fusión del duplo cebador-patrón de ADN. Si se obtienen productos de la PCR no específicos, además del producto esperado, la temperatura de hibridación se puede optimizar aumentándola por incrementos de 1 a 2°C.

La etapa de extensión se realiza, generalmente, a 72°C y una extensión de 1 min es suficiente para sintetizar fragmentos de PCR de hasta 2 kb (kb = kilobase = 1000 pb).

Cuando se amplifican fragmentos de ADN más grandes, el tiempo generalmente se extiende a razón de 1 min por cada 1000 pb.

El número de ciclos de la PCR dependerá, básicamente, del rendimiento esperado del producto de la PCR.

Después del último ciclo, las muestras suelen incubarse a 72°C durante 5 min para completar los extremos que sobresalen de los productos de la PCR recién sintetizados.

Actualmente hay muchas máquinas de PCR disponibles en formatos de 48, 96 ó 384 pocillos. Esta opción, combinada con el uso de pipetas multicanal, puede aumentar enormemente el número de reacciones que se pueden hacer simultáneamente. Para preparar varias reacciones a la vez, se debe hacer una mezcla maestra que contenga lo siguiente: agua, solución tampón, dNTP, cebadores, MgCl₂ y Taq polimerasa, en un solo tubo. Luego se repartirán alícuotas en los tubos individuales.

Consideraciones:

ADN patrón. Casi todos los métodos estándar de extracción de ADN son apropiados. La cantidad adecuada está entre 0.1 y 1 µg de ADN genómico, para una mezcla total de reacción de 100 µl. Cantidades más grandes de ADN patrón elevan, generalmente, el rendimiento de productos de la PCR no específicos. [83]

Cebadores. (1) Los cebadores de la PCR deben tener entre 10 y 24 nucleótidos de longitud. (2) El contenido de GC debe estar entre 40% y 60%. (3) El cebador no debe ser auto-complementario o complementario de otro cebador en la mezcla de reacción, para evitar así la formación de dímeros de cebadores u horquillas. (4) Las temperaturas de fusión de los pares de cebadores no deben diferir en más de 5°C, de modo que tanto el contenido de GC como la longitud se deben elegir adecuadamente. (5) Las temperaturas de fusión y de hibridación de un cebador se calculan así: si la longitud del cebador es menor que 25 nucleótidos, el valor de la temperatura de fusión se calcula con la fórmula: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$. (6) La temperatura de hibridación debe ser, aproximadamente, 5°C inferior que la temperatura de fusión. [64]

Concentración de MgCl₂. Puesto que los iones Mg⁺⁺ forman complejos con los dNTP, con los cebadores y los patrones de ADN, hay que establecer la concentración óptima de MgCl₂ para cada experimento. Si los iones Mg⁺⁺ son demasiado escasos, se obtiene un bajo rendimiento del producto de la PCR y si son demasiado abundantes, aumentará el rendimiento de productos no

específicos. El intervalo recomendado de concentración de MgCl₂ es de 1 a 3 mM, en las condiciones de reacción estándar especificadas.

Taq polimerasa. Si las concentraciones de Taq polimerasa son mayores que las requeridas pueden sintetizarse productos no específicos.

dNTP. La concentración de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción es, generalmente, de 200 µM. Se debe comprobar que estas concentraciones sean iguales, porque una inexactitud aumentará el grado de incorporación errónea.

ELECTROFORESIS CAPILAR (EC)

Desde la primera descripción de la electroforesis en los tubos de diámetro pequeño [84, 85], la electroforesis capilar (EC) se ha identificado como una técnica analítica de gran alcance capaz de sustituir a la electroforesis de ácidos nucleicos basada en geles. En la EC la separación ocurre en un tubo capilar con un diámetro interno de 50-100 micrómetros. El tubo capilar estrecho permite la aplicación de altos campos eléctricos, y con esto tiempos de corrida más rápidos, sin los problemas de sobrecalentamiento asociados a los altos voltajes usados. Además, el tubo capilar se puede manipular fácilmente para las inyecciones automatizadas. La EC ha demostrado ser una técnica versátil y se ha utilizado para una variedad de aplicaciones forenses incluyendo el análisis de los residuos de pólvora producidos por el disparo de un arma de fuego, residuos de explosivos, y de drogas, así como para tipificar el ADN. Desde 1996, los resultados de la EC han sido admisibles en las cortes de Estados Unidos. El Trabajo temprano con EC y STR utilizaba los instrumentos que se basaban en la detección por luz UV o detección de fluorescencia inducida por laser de un solo color. [86] En estos casos, los estándares internos de tamaño tuvieron que ajustarse a la escala alelica entrar exactamente en los alelos STR. El advenimiento de analizadores genéticos en julio de 1995 con capacidades para detectar fluorescencias multicolores, abrió un mundo nuevo en la detección de STR. La capacidad de examinar más de una longitud de onda durante la electroforesis permite simultáneamente que una cantidad más alta de la información genética sea obtenida. Los sistemas de EC han desempeñado un papel vital en otras aplicaciones tales como ordenar el genoma humano.

En un sistema de electroforesis capilar (EC), la escala alelica se corre junto con el estándar de tamaño interno en una inyección, y los alelos de la muestra junto con el estándar de tamaño interno se corren en inyecciones subsecuentes en el tubo capilar de forma secuencial. [87]

Para que el genotipado con marcadores STR tenga orden y precisión usando la separación y detección multicolor fluorescente, la técnica de debe exhibir las siguientes características:

- (i) Métodos de detección confiables sobre un rango que va de 75-500 pb;
- (ii) Alta precisión entre las muestras procesadas corrida tras corrida para permitir la comparación de las secuencias STR con las escalas alelicas;
- (iii) Efectiva separación de diversos conjuntos de tintes espectrales fluorescentes, para evitar el corrimiento de cuatro o cinco diversos colores por separado;
- (iv) Resolución de por lo menos de 1 a 350 pb para permitir la detección confiable de microvariantes de alelos.

En un inicio el análisis de los marcadores STR requirió del uso de geles de poliacrilamida. [7, 88, 89] Sin embargo, la EC, donde las moléculas de ADN se separan en un tubo de cristal estrecho, ha llegado a ser cada vez más popular para la tipificación de STR porque elimina la necesidad de verter los geles y de cargar las muestras de DNA sobre este. La EC ofrece la mayor automatización en las fases de inyección y detección para el análisis de ADN; además, la EC consume solamente una porción pequeña de la muestra real para poderla reexaminarla si es necesario.

El instrumento ABI Prism, es probablemente la plataforma de prueba más extensamente usada para el análisis genéticos de STR. Las muestras de ADN se procesan en una manera serial en un índice de aproximadamente cuatro muestras por 30 minutos. Los pasos de progresión para procesar muestras de ADN con tamaño y las separaciones de colores se ilustran en fig. 36. Las condiciones que afectan la inyección, la separación, la detección, y la interpretación de la muestra para la detección confiable del STR se tratan abajo (fig. 37).

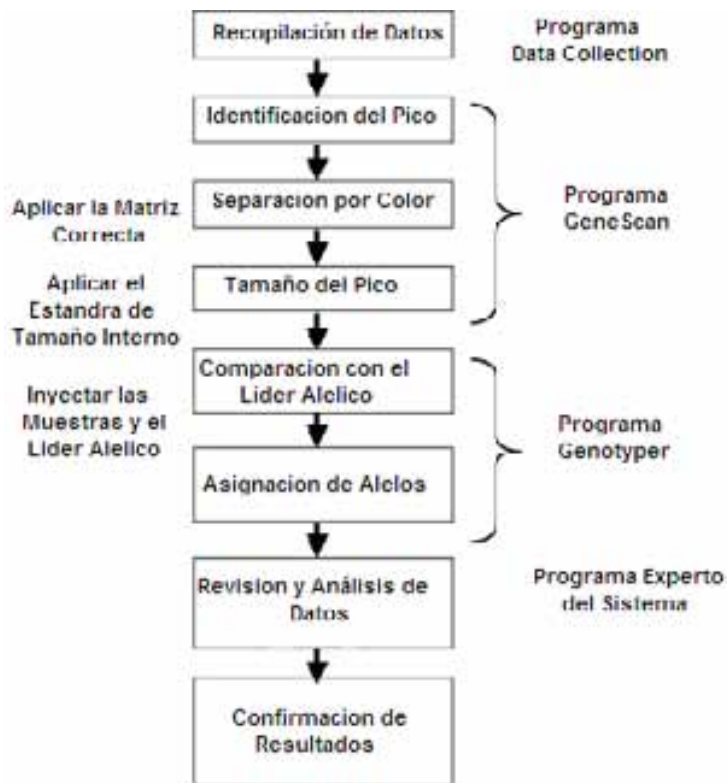


Figura 5 36.- Ilustración esquemática de la separación y de la detección de alelos STR con un analizador genético del prisma de ABI. 3130. Modificado de: Butler, J.M. [67]

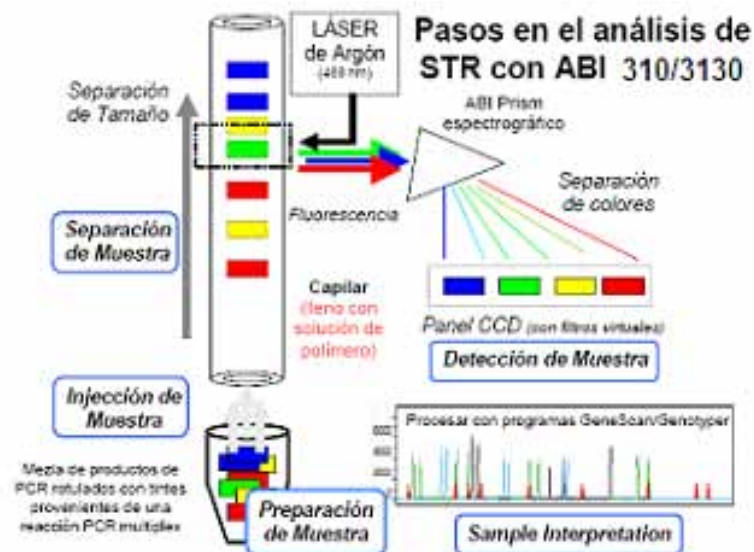


Figura 6 37. Interpretación de la muestra y proceso de genotipificación para la determinación del alelo STR. Modificado de Butler JM. [67]

Inyección de la muestra

Una ventaja importante de la EC es que las muestras se pueden cargar de manera separada y automatizada en una placa de muestras.

Las técnicas tradicionales de electroforesis del gel requieren el cargamento manual y cuidadoso de las muestras antes de iniciar la electroforesis.

Las muestras para la separación por EC son preparadas generalmente diluyendo una porción pequeña del producto de PCR en agua desionizada o en formamida. Otra ventaja significativa para la EC en el contexto del análisis forense es que solamente una porción pequeña de la muestra real es examinada cada vez y puede ser reinyectada tiempo después si está necesita ser reexaminada. La mayoría de los sistemas de EC utilizan la inyección electrocinética, donde un voltaje se solicita por un tiempo definido, para mover las moléculas cargadas desde la muestra al tubo capilar. Mientras que el ADN se carga negativamente, un voltaje positivo se aplica para trazar las moléculas de ADN dentro del tubo capilar. Las inyecciones electrocinéticas producen zonas estrechas de inyección, pero son altamente sensibles a la matriz de la muestra. En general, la cantidad de ADN inyectada sobre una columna de EC (Q_{inj}) es una función del campo eléctrico (E), del tiempo de la inyección (t), de la concentración verdadera de DNA en la muestra ($[DNA_{muestra}]$), del área de la apertura capilar (r^2), y de la fuerza iónica de la muestra ($I_{muestra}$) contra el buffer (I_{buffer}). Esto se puede describir por la ecuación siguiente [90] :

$$Q_{inj} = Et(r^2)(\mu_{mep} - \mu_{eof})[DNA_{muestra}](I_{buffer}/I_{muestra})$$

Donde: r es el radio del tubo capilar, μ_{mep} es la movilidad de las moléculas de la muestra, y el μ_{eof} es la movilidad electroosmótica, que es relativamente insignificante en un tubo capilar revestido. Sin embargo, esta ecuación asume que no hay iones presentes que interfieren. La adición de iones tales como Cl^- de la mezcla de reacción de PCR competirá con el ADN y reducirá la cantidad total de ADN inyectado sobre el tubo capilar porque la conductividad de la muestra ($I_{muestra}$) será más alta. Pues los iones de Cl^- son más pequeños que las moléculas de DNA, tendrán una relación de transformación más alta y posteriormente una movilidad más alta de la muestra (μ_{mep}) de carga/masa. Asimismo, moléculas más pequeñas de ADN, tales como primers restantes de PCR, viajarán más rápidamente en la apertura capilar de la solución que los productos más grandes de PCR de la muestra. Para reducir este problema de diagonal de la muestra con la inyección electrocinética, las muestras de PCR se pueden purificar por medio de diálisis, columnas de separación o por la precipitación en etanol. El paso de diálisis parece ser el más eficaz para quitar exceso de sales, mientras que las columnas de la separación son más eficaces en quitar trifosfatos resultantes de la incorporación de los desoxinucleotidos (dNTPs) por acción de la enzima. Sin embargo, el desarrollo temprano de las pruebas de ADN con EC, era demostrar que una dilución simple de la muestra en agua desionizada o formamida puede ser un método eficaz para la preparación de la

muestra porque la fuerza iónica de la muestra se reduce concerniente a la fuerza iónica del buffer.

Puesto que la formamida es un desnaturalizante fuerte, se utiliza comúnmente en la EC para la preparación de las muestras de ADN de doble hélice. Simplemente con la colocación de una muestra en formamida es suficiente para desnaturalizarla. Sin embargo, la calefacción rápida a 95°C y el enfriamiento en el hielo se realiza comúnmente para asegurarse de que ha ocurrido el proceso de la desnaturalización. El uso de formamida de alta calidad con una conductividad baja es importante. La descomposición de la formamida produce productos iónicos, incluyendo el ácido fórmico, que se carga negativamente en un pH neutro y será inyectado preferencialmente en el tubo capilar. Los subproductos de la formamida pueden causar problemas en la sensibilidad y la resolución. [91] La calidad de la formamida se puede medir fácilmente usando un contador portable de conductividad y debe ser de 80 μ S o menos para obtener mejores resultados. Muchos laboratorios compran formamida de ultra pureza y congelan alícuotas inmediatamente para asegurar la calidad de la muestra. El agua también se ha utilizado con éxito en la preparación de muestras de STR para el análisis por EC en vez de la formamida. [92] El uso del agua desionizada puede eliminar el peligro para la salud y el costo de la formamida así como problemas con la disposición. Mientras que los estudios han mostrado que el agua da resultados completamente concordantes con la formamida, la estabilidad a largo plazo de la muestra sufre porque las moléculas de DNA tienden a renaturalizarse en agua después de algunos días.

Un método útil para mejorar la cantidad de analito implica el comúnmente llamado empaquetamiento de la muestra sobre la columna durante una inyección [93, 94] En el empaquetamiento, la inyección, ocurre cuando la fuerza iónica de la zona de la muestra es más baja que la del buffer. Esto es en efecto lo que sucede cuando una muestra se diluye en agua desionizada o formamida. Pues la corriente a través del sistema es constante, la carencia de los portadores de la carga en la zona de la muestra produce un campo eléctrico fuerte que termina precipitadamente en la interfaz entre la zona de la muestra y el buffer dentro del tubo capilar. Las moléculas de ADN son movilizadas por el flujo del campo hacia el capilar, como el voltaje de la inyección se aplica rápidamente y queda en una zona estrecha en el interfaz. El agrupamiento permite que una zona grande de la muestra sea cargada sobre el tubo capilar y también ayuda a producir separaciones eficientes. Con tubos capilares más cortos y zonas de inyección sostenidas, y se requieren menos cantidad de polímero para efectuar una separación, la clave al producir una buena interacción es producir una zona de conductividad baja inmediatamente delante de la muestra. Esto es facilitado en muchos sistemas de EC sumergiendo el tubo capilar en agua apenas antes de la inyección de la muestra. Otros métodos que se pueden también utilizar son por ejemplo diálisis de la muestra o la neutralización en línea del buffer con NaOH, [95] pero éstos son más difíciles de poner en práctica. En análisis forenses estos métodos no se emplean típicamente puesto que el agrupamiento de la muestra en el capilar ocurre con la dilución de la muestra amplificada.

Separación de la muestra.

Además de la anchura de la zona de la inyección de la muestra, hay otros varios componentes que afectan las separaciones de ADN dentro de sistemas de EC como son: el polímero usado para permitir la separación, el tubo capilar, el buffer de la electroforesis, y la fuerza del campo. [96] Las escalas alelicas de STR son herramientas útiles para el monitoreo de la resolución del sistema. (Figura 38)

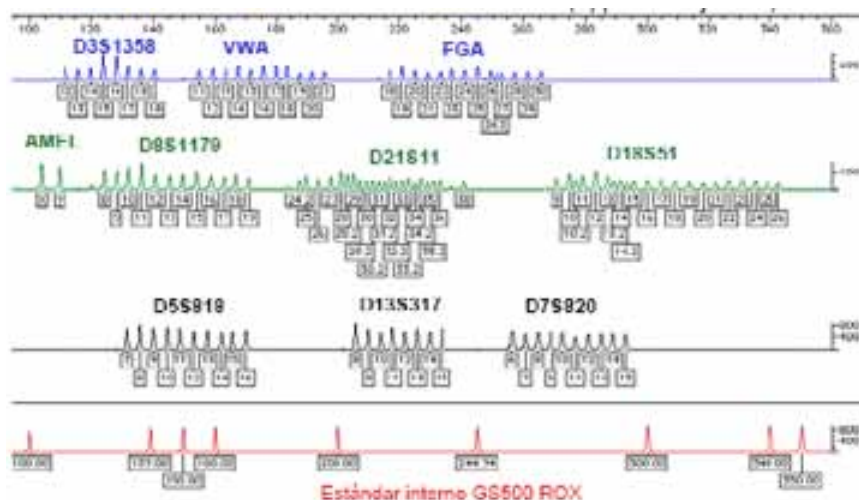


Figura 7. 38 Escalas Alelicas presentes en el kit de STR profiler de Applied Biosystems. Observe la separación de colores limpia. Modificado de Butler JM. [67]

El polímero

Existen diversos polimeros utilizados en separaciones electrofreticas, el tamaño depende de las características físicas del gel utilizado. Los geles químicos tales como los geles de poliacrilamida utilizados comúnmente en las electroforesis son los materiales reticulados rígidos cuya estructura porosa es mantenida junta por los enlaces covalentes fuertes. En los geles físicos producidos por la agarosa, la dimensión tan variable de este material es el resultado de fuerzas intermoleculares más débiles producidas por el enredo de varios hilos de las diversas moléculas de agarosa. Los polímeros enredados son el tercer tipo de medio que se utiliza como tamiz. Similar a los geles físicos, estos materiales también son caracterizados por interacciones intermoleculares. Sin embargo, tales sustancias no son geles verdaderos, pues no pueden mantener su forma a menos que estén colocados en algún contenedor tal como un tubo capilar. Los polímeros enredados se caracterizan por un aumento rápido en viscosidad conforme la concentración del

polímero alcanza cierto valor de umbral. La viscosidad de estos materiales es también dependiente en el peso molecular del polímero.

Todos los tipos de materiales antes mencionados se han utilizado en separaciones de EC, y no hay así nada especialmente nuevo sobre el método de EC con respecto a la electroforesis convencional, con excepción de la conveniencia de contener el gel en un tubo capilar y la elevada disipación de calor que resulta en la pequeña área representativa del tubo capilar. Las tentativas aplicaciones de la EC en la separación por tamaño de biomoléculas fueron basadas en tubos capilares llenados con geles (poliacrilamida o agarosa). [97] Sin embargo, los tubos capilares llenados con gel presentaron varias desventajas: la formación de burbujas de aire durante el relleno del tubo capilar así como en el proceso de la contracción del gel durante la polimerización, limitaba sus aplicaciones. [98]

Por otra parte los geles, con acrilamida, sufren de la degradación por hidrólisis, al pH alcalino usado comúnmente para separar biomoléculas. [99] Esta degradación propicia que los tiempos de vida media de los tubos capilares llenados con geles sean más cortos. Actualmente, los tubos capilares llenados con gel desempeñan un papel de menor importancia en las aplicaciones de separación de ADN. Los sistemas capilares con geles reticulados se han substituido por las soluciones del polímeros con entrecruzamientos lineares tales como poliacrilamida. La idea de usar soluciones del polímero para separar biomoléculas no es nueva. Sin embargo, llegó a ser popular conjuntamente con la EC, porque las características muy eficientes de la disipación anticonvectiva y de calor de tubos capilares finos permiten la separación en líquidos sin la pérdida de resolución. [100] Aunque existen una gran cantidad de polímeros que se podrían utilizar potencialmente como matriz para la separación de moléculas biológicas, no todos son convenientes para los sistemas estándares de EC. Especialmente en los nuevos dispositivos multicapilares, en cuya técnica es necesario mantener una viscosidad baja. [101] Por lo tanto, el polímero ideal debe tener por lo menos las mismas características de la separación que los geles clásicos, combinados con una viscosidad baja que permitiría el reemplazo fácil. Estas condiciones de funcionamiento se han alcanzado con los polímeros optimizados, POP-4 y POP-6, de Applied Biosystems. [102] POP-4 se utiliza comúnmente para el análisis de fragmentos de ADN incluyendo los STR, mientras que el polímero POP-6, que es el mismo polímero del polidimetilacrilamida presente en una concentración mayor, tiene una resolución más alta y es capaz de resolver las necesidades de resolución de una solo base al ordenar el ADN

El buffer

En el buffer que se utiliza para disolver el polímero en sistemas de EC es importante como se estabiliza y solubiliza el ADN, ya que proporciona a los portadores de la carga para la corriente electroforetica, y puede realzar la inyección. Si la concentración del buffer y la conductividad concomitante es demasiado alta, puede originara que la columna se sobrecaliente dando por

resultado una pérdida de resolución. En el proceso de electroforesis, la composición del buffer, de ánodo y el cátodo puede cambiar debido a la electrólisis y a la migración de los iones del buffer. Así, substituir periódicamente el buffer de la EC por la solución nueva de este, es una buena práctica para evitar problemas con la calibración del sistema en un cierto plazo.

El buffer del analizador genético usado comúnmente tiene una concentración de 100 Mm de TAPS (Acido-N-Tris(hidroximethyl)metil-3 aminopropanosulfónico), y EDTA a una concentración de 1 mM, ajustado a pH 8.0 con NaOH. [103]

Los TAPS se utilizan en vez del TBE (Tris-borato-EDTA) puesto que el TBE es sensible a la temperatura y al pH. Mientras que la temperatura del análisis se aumenta con TBE, el pH disminuye en un índice de 0.02 unidades con cada 17C. Así las emisiones de fluorescencia de muchos tintes disminuyen con el pH. [104]

Los científicos forenses utilizan sobre todo la EC para analizar STRs. bajo parámetros del análisis en los cuales los fragmentos de STRs amplificados deben de permanecer desnaturalizados. Para lograr esta desnaturalización del ADN, la temperatura de funcionamiento de la columna capilar se fija a un más alto que temperatura ambiente, y los añadidos del buffer tales como formamida, urea, y 2-pirrolidona se agregan para evitar el rearreglo del ADN. Incluso bajo fuertes condiciones de desnaturalización, las moléculas de ADN pueden asumir a veces varias conformaciones debido a las atracciones intramoleculares, así las temperaturas del funcionamiento del tubo capilar de 60°C comúnmente empleadas ayudan a reducir la formación de estructuras secundarias en el ADN. Así, las altas concentraciones de la urea y las temperaturas elevadas se utilizan para mantener los diferentes alelos de los STRs desnaturalizados uniformemente. Puesto que la movilidad de los fragmentos de ADN se puede afectar por su conformación. Incluso con estas medidas, se debe tener cuidado para mantener el sistema en una temperatura ambiente estable, pues las variaciones de la temperatura pueden tener efectos profundos en la migración de los alelos. [105]. Muchos laboratorios evalúan un pico estándar interno (tal como el pico 250 en el estándar interno de ABI GS500, ver figuras. 38 y 39), que es sensible a la variación de la temperatura y es utilizado para demostrar que sus sistemas del EC son estables y bien calibrados. Un pH elevado condiciona el análisis con EC de los fragmentos de DNA. Para los sistemas en los que se observan variaciones en la determinación del tamaño de los alelos en donde la molécula de la ADN predominante se encuentra desnaturaliza, se sugiere que la estructura secundaria del ADN junto con las fluctuaciones de temperatura son las responsables de dichas variaciones observadas en las determinaciones de tamaño del ADN. [106, 107, 108] Controlando cuidadosamente las condiciones de funcionamiento, es decir, pH, buffer, desnaturalizantes, y temperatura, las variaciones en y entre funcionamientos se pueden reducir al mínimo y así mejorar notablemente la precisión en el funcionamiento.

El capilar

La columna capilar es la pieza central en las capacidades de separación por EC. En columnas capilares sin recubrimiento, las cargas residuales en la superficie de silicon inducen un flujo de la solución hacia el electrodo negativo. Este proceso conocido como flujo electroosmótico (FEO) crea los problemas de reproducibilidad entre las separaciones de ADN porque la velocidad de las moléculas de ADN puede cambiar entre cada corrida. El tubo capilar y el microchip acanalan las paredes, que contienen grupos cargados del silanol, químicamente se modifican o están cubiertos dinámicamente para prevenir el FEO en las separaciones de ADN. [103, 109, 110] Un método para lograr la supresión del FEO en un canal o un tubo capilar del silica fundida es enmascarar los sitios cargados en la pared por la adsorción de los polímeros lineales neutrales que proporcionan una capa viscosa en la superficie del capilar. Los polímeros de poli-dimetilacrilamida POP-4 y POP-6 disponibles comercialmente son utilizados con éxito en la genotipificación de ADN por EC porque proporcionan un tamiz para la separación de ADN solo de doble hélice y al mismo tiempo, suprimen el FEO. POP-4 consiste en el dimetilacrilamida lineal al 4%, urea al 8 M y 2-pirrolidona al 5%. Para el análisis de STR, la temperatura del funcionamiento se fija típicamente en 60°C para ayudar a mantener más tiempo la hélice de ADN desnaturalizada. Al usar el analizador genético, un operador carga simplemente una corrida por lote de muestras. Así, es importante entender los puntos potenciales implicados en la ruptura de un tubo capilar o en la serie de análisis. A menudo, las causas de un incidente en el capilar son desconocidas pero pueden dar lugar a pérdida de tiempo y de esfuerzo valiosos; además las fallas en los capilares pueden ocasionar que los tiempos de migración cambien y que los picos se puedan ensanchar (fig.40). Para evitar este problema, se debe contar con tubos capilares para reemplazar el que está en uso antes de que este haya expirado su vida media útil. Las causas de no obtener resultados acertados con EC también pueden ser debidas a los efectos de la pared capilar, que son el resultado de la adsorción de los componentes de la muestra y del buffer en la superficie capilar. La teoría de separaciones basadas en EC generalmente no hace caso de la pared del capilar como contribuidor a la separación, pero bajo ciertas condiciones la pared del capilar puede desempeñar un papel importante en la calidad de la separación de las moléculas de ADN. Un efecto, que podría conducir a este tipo de comportamiento, es el FEO. Bajo condiciones normales estos fenómenos no ocurren porque la solución viscosa del polímero enmascara los sitios cargados en la pared y resiste así el flujo a granel. Sin embargo, con la operación continua, la acumulación de contaminantes muchas separaciones consecuencia de el uso, puede producir gradualmente sitios activos a lo largo de la pared. Estos sitios producen una capa doble de carga a lo largo de la pared capilar, que puede inducir el flujo a granel, destruyendo la reproducibilidad de los tiempos de la migración y haciendo a los datos resultantes ilegibles. Otro problema potencial con la acumulación de sitios activos en la pared del capilar es la adsorción de las moléculas de ADN dando por resultado la pérdida de resolución pues las bandas de la muestra llegan a ser difusas. Los fabricantes de tubos capilares sugieren a menudo substituir un tubo capilar

aproximadamente después de 100 inyecciones para evitar problemas en la resolución. [96]

Los tiempos de vida útil de los capilares pueden ser mejorados aclarando el tubo capilar con lavados consecutivos de agua, tetrahidrofurano, ácido clorhídrico y solución del polímero.

Detección de la muestra

La detección de múltiples longitudes de onda, junto con la amplificación simultánea de múltiples STRs ha ampliado las capacidades de análisis de ADN permitiendo analizar más de una fluorescencia a la vez. La clave en la utilización de esta tecnología es colocar un fluorocromo sobre el extremo 5'-(no-reactivo) de cada primer o el conjunto de primers.[111] Estas moléculas tienen un número de características interesantes. Todas son excitadas por un solo láser de argón templado a 488 nm, todo despiden luz fluorescente en diversas regiones de espectro. Un analizador de múltiples longitudes de onda, cargado y ajustado a un dispositivo con una cámara de detección, se utiliza para determinar qué molécula fluorescente está presente, basado en la emisión de fluorescencia cada fragmento cuando pasa la ventana del detector. Esta técnica permite el análisis de los fragmentos de ADN que se asemejan en cuanto a su tamaño ya que se marcan con diferentes moléculas que despiden luz fluorescente en diversas longitudes de onda. La figura 10 ilustra los espectros de emisión de fluorescencia de los diversos fluorocromos usados para marcar ADN y la posición de varios filtros virtuales comunes usados en los analizadores genéticos. Es necesario seleccionar el filtro correcto para que corresponda con las combinaciones fluorescentes de las diferentes moléculas en uso para maximizar la sensibilidad en la detección. No obstante a pesar de la diferencia en la emisión de longitudes de onda de las diferentes moléculas se sigue observando un cierto traslapo entre dichas emisiones. Para eliminar este traslapo espectral, un algoritmo del ordenador conocido como cálculo de la matriz se utiliza para la separación de las de fluorescencias de las distintas moléculas que se llegan a traslapar. Cuando se utiliza esta tecnología se debe tener cuidado de preparar y de evaluar correctamente la matriz para calibrar los instrumentos y prevenir así la interferencia en el corrimiento entre los diversos canales espectrales. Este problema se reconoce fácilmente porque da lugar a la producción de picos pequeños de un diverso color que se generan exactamente el mismo lugar que un pico de fluorescencia real de alguno de los fluorocromos. Otras alteraciones que pueden ocurrir en los picos de algunos electroferogramas pueden ser ocasionadas por residuos espectrales de las moléculas fluorescentes. [112]

Interpretación de los resultados

La mayoría de los laboratorios forenses utilizan actualmente secuenciadores automáticos de ADN para la lectura de STRs, ya que estos sistemas electroforéticos facilitan en gran medida la estandarización de los resultados.

La electroforesis se realiza en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (evitando así diferencias de movilidad debidas o distintas conformaciones de la molécula de ADN originadas por variaciones en la secuencia). Los patrones obtenidos se representan por picos una vez que es captada la señal fluorescente por el ordenador en tiempo real. Los resultados se obtienen al finalizar el recorrido electroforético.

El software

Existen tres programas usados para procesar datos de los analizadores genéticos y para producir los genotipos de los STR; estos programas son: GeneScan, Genotyper y Data Collection. Estos programas fueron escritos originalmente para los ordenadores de Macintosh pero se han adaptado más recientemente al funcionamiento en el sistema operativo de Microsoft Windows. Applied Biosystems también han desarrollado otro programa llamado GeneMapper™ que combina las funciones de GeneScan y de Genotyper. (Genescan Reference Guide). El software Data collection del Genetic Analyzer 3130 realiza tres funciones primarias: el control de las condiciones de funcionamiento de la electroforesis, el control de las longitudes de onda las cuales serán examinadas en la cámara de detección con el uso de "filtros virtuales", y permite también especificar en las hojas de la muestra y las listas de la inyección el nombre de la muestra y el orden del proceso de inyección. El operador introduce el nombre de cada muestra y que colores de fluorescencia están presentes en una muestra. La lista de la inyección controla el orden en la cual cada muestra se inyecta sobre los tubos capilares, el tiempo y el voltaje electrocinético de la inyección y de electroforesis, así como la temperatura del funcionamiento. El filtro virtual también se señala en la lista de la inyección dependiendo de las moléculas fluorescentes presentes en la muestra que es analizada. (Figura 39)

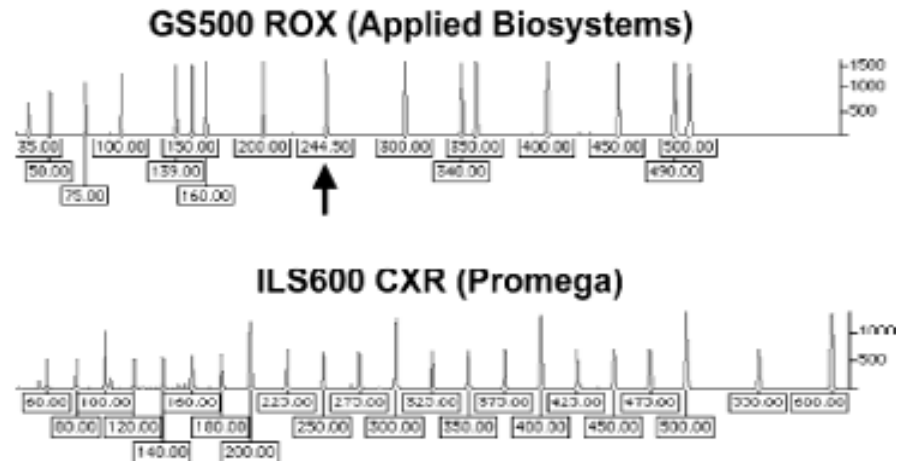


Figura 39 Dos diversos estándares internos de tamaño de 245 pb usados comúnmente con los kits STR. Modificado de Butler JM. [67]

Los datos obtenidos del programa Data Collection es la "información en crudo" que viene en la forma de unidades relativas de fluorescencia en el eje de las "y" y el número de los puntos de referencias recogidos en el eje de las "x". En los programas de GeneScan y de Genotyper es necesario convertir las informaciones en crudo en el pico apropiadamente coloreado y generar la información del genotipo del STR. El software de GeneScan también realiza tres funciones primarias. Nombra los picos basados en los valores de umbral especificados por el usuario; separa los picos por color; y clasifica los picos de los alelos de los STR basados en un estándar interno de tamaño (GenScan GS 500 liz, que va de 75 a 500 pb), marcado con un color de fluorescencia distinto al utilizado al amplificar las muestras de ADN por PCR, dicho estándar interno se corre junto con cada muestra. [113] Generalmente, el estándar interno se marca con de color naranja Gen Scan GS liz mientras que los alelos STR se marcan con los colores: azul, verde, amarillo y rojo para la amelogenina (véase la tabla 38).

Diversos estándares internos de tamaño pueden ser utilizados. (Figura 39) Es importante ser constante en el uso de un estándar interno porque todos los picos de los alelos de STR se miden concerniente a este estándar. Un algoritmo calibra el defecto en el corrimiento electroforético con respecto al estándar interno esto es el llamado "método local del sur" del inglés "The local Southern method". [105, 114] Este método mide el tamaño de un pico desconocido con respecto a su posición a partir de dos picos del estándar interno que sean más grandes que el pico desconocido y dos que son más pequeños que el pico desconocido. El software de GeneScan contiene seis diversas funciones que se puedan utilizar como parte de análisis y de la evaluación de datos estas funciones son:

- 1.-El procesador de datos procesados (separador por color),
- 2.-La clasificación con respecto a la curva estándar.
- 3.-La información y condiciones de la electroforesis,
- 4.- La información de la muestra,

- 5.-La informaciones en crudo (ninguna separación de colores),
- 6.-El un fichero de del análisis diario.

El programa Genotyper toma los datos del GeneScan y convierte los picos clasificados en el genotipo. El genotipado es realizado por la comparación de los tamaños de los alelos en la muestra con un líder alelico. [115]

Evaluar la resolución de los electroferogramas de ADN

Determinar la resolución de un electroferograma permite evaluar el funcionamiento del sistema de EC. [96] Estas medidas de resolución pueden ser útiles al evaluar datos de estudios anteriores, o evaluar las modificaciones del sistema que pueden alterar las condiciones electroforeticas. En la revisión de estudio anteriores, o en la valoración de las variaciones hechas sobre el sistema, las medidas de la resolución se pueden aplicar como parte del proceso de la evaluación conjuntamente con otros parámetros para juzgar el funcionamiento del sistema. Un simple examen visual de la resolución de un electroferograma, como lo es verificar la anchura y la separación máxima de los picos obtenidos, basta para detectar alguna variación en el sistema. La separación excesivamente amplia de los picos que se forman, o la carencia en la resolución de la línea basal indica que el sistema esta deteriorado. Por ejemplo, la figura 40 compara una buena y una mala resolución en la separación de ADN con la misma muestra de STRs. Tales exámenes visuales ofrecen una excelente guía cualitativa del sistema.

Es muy importante saber reconocer los picos anómalos (que representan bandas electroforeticas) que no corresponden a alelos y que pueden originarse por distintos fenómenos. Como lo son:

Bandas tartamudas (stutter bands), que son mas frecuentes en los STR dinucleotidicos, debidas al slippage de la Taq polimerasa durante el proceso de PCR.

Pull ups, picos de pequeña intensidad que aparecen adyacentes a un pico grande, exactamente en la misma posición, que habitualmente se deben a una muestra sobreamplificada.

Artefactos inespecíficos que suelen dar una señal de baja intensidad, producidos en general por hibridaciones de los cebadores.

Tabla 38. Kits de STRs comúnmente utilizados para el análisis en el Genetic Analyzer ABIPrism 3130.

Nombre del kit STR	Distribuidor	Color del tinte	Marcadores STR amplificados en el kit (mostrados en el orden en que se aumenta el tamaño del producto de PCR)
AmpFISTR® Profiler Plus®	Applied Biosystems	B G Y	D3S1358, VWA, FGA Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 D5S818, D13S317, D7S820
AmpFISTR COfiler®	Applied Biosystems	B G Y	D3S1358, D16S539 Amelogenin, TH01, TPOX, CSF1PO D7S820
AmpFISTR SGM Plus®	Applied Biosystems	B G Y	D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338 Amelogenin, D8S1179, D21S11, D18S51 D19S433, TH01, FGA
AmpFISTR Identifier® (5-dyes)	Applied Biosystems	B G Y R	D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338 D19S433, VWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, FGA
AmpFISTR SEfiler® (5-dyes)	Applied Biosystems	B G Y R	D3S1358, VWA, D16S539, D2S1338 Amelogenin, D8S1179, SE33 D19S433, TH01, FGA D21S11, D18S51
PowerPlex®1.2	Promega	B Y	D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 VWA, TH01, Amelogenin, TPOX, CSF1PO
PowerPlex 16	Promega	B G Y	D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D Amelogenin, VWA, D8S1179, TPOX, FGA
PowerPlex ES	Promega	B G Y	D3S1358, TH01, D21S11, D18S51 SE33 (ACTBP2) Amelogenin, VWA, D8S1179, FGA
PowerPlex Y	Promega	B G Y	DYS391, DYS389I, DYS439, DYS389II DYS438, DYS437, DYS19, DYS392 DYS393, DYS390, DYS385 a/b
Y-PLEX®6	ReliaGene Technologies	B Y	DYS393, DYS19, DYS389II DYS390, DYS391, DYS385 a/b
Y-PLEX 5	ReliaGene Technologies	B G Y	DYS389I, DYS389II DYS439 DYS438, DYS392
Y-PLEX 12	ReliaGene Technologies	B G Y	DYS392, DYS390, DYS385 a/b DYS393, DYS389I, DYS391, DYS389II Amelogenin, DYS19, DYS439, DYS438

Datos de 15 Loci STR en una muestra de la Población del Valle de México

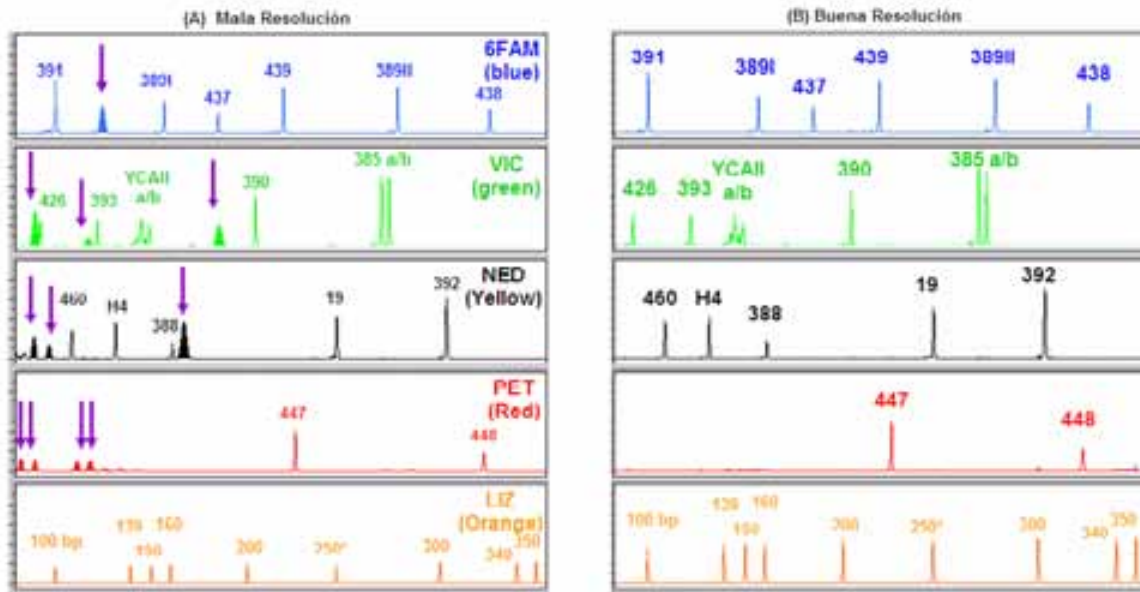


Figura 40. Comparación de la misma muestra con (a) mala resolución debido a un mal tubo capilar y (b) buena resolución. El kit STR usado es el AmpFISTR® Identifier™. Modificado de Butler JM. [67]

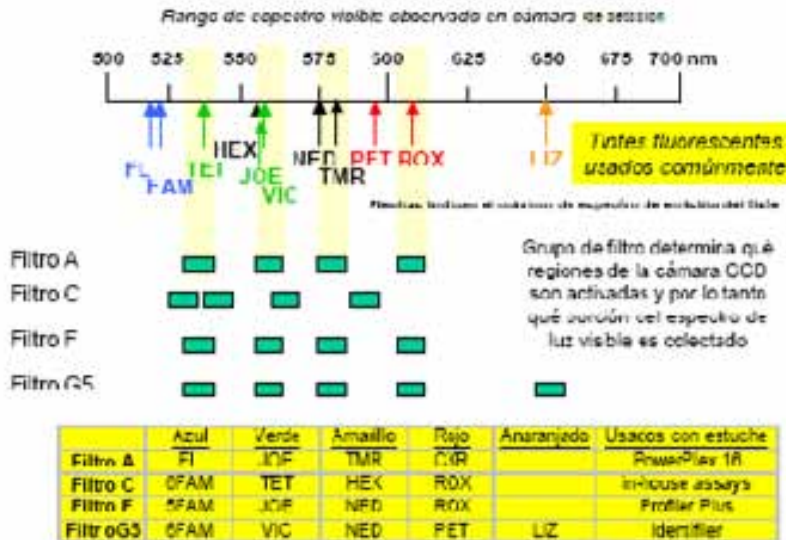


Figura 41. Diagrama esquemático de la máxima emisión de fluorescencia del fluorocromo y de los filtros virtuales usados en ABI 3130 con varios kits de STR. Modificado de Butler JM. [67]

VIII. - REFERENCIAS.

1. - Watson J.D. and Crick F.H.C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*.1953;171: 737-738.
2. - Voet, D. and J. Voet, Biochemistry, 2nd Ed. John Wiley and Sons, Inc. NY, EUA.1995.
3. - Vogt P. Potencial genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on highly conserved cromatin foldin code. *Hum Genet* 1990;84:301-336.
4. - Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.
5. Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, Whitw R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 1987;235:1616-1622.
6. - Armour JAL, Wong Z, Wilson V, Royle NJ, Jeffreys AJ. Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeat elements. *Nucleid Acids Res* 1989;17: 4925-4935.
7. -Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*.1991; 49: 746-756.
8. -Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in Short Tandem Repeat sequences-a survey of the twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med* 1994;107:13-20.
9. -Brinkman B. The STR approach In: *Advances in Forensic Haemogenetics* 6. Ed by A Carracedo, B Brinkman, W Bär. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1996;41-51.
10. -Singer, MF. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 1982;76: 67-112.
- 11.- Korenberg JR, Rykowsky MC. Human genome organization: Alu, Lines, and molecular estructure of metaphase chromosome bands. *Cell* 1988;53: 391-400.
- 12.- Slagel V, Flemington E, Traina-Dorge V, Bradshaw H, Deininger P. Clustering and subfamily relationships of the Alu family in the human genome. *Mol Bio Evol* 1987; 4:19-29.

- 13.- Singer, MF. SINEs and LINEs: highly repeated short| and long interspersed sequences mammalian genomes. *Cell* 1982; 28: 433-434.
- 14.- Ford EB. Polymorphism and taxonomy. In: *New systematic*. Ed by JS Huxley. Clarendon Press, Oxford. 1940:493.
- 15.- Armour JAL. Tandemly repeated minisatellites: generating human genetic diversity via recombinational mechanisms. In: *Human Genome Evolution*. Ed. By M Jackson, T Stracham, G Dover. Bios Scientific publishers 1996;172-190.
- 16.- Jeffreys AJ, Neumann R. Somatic mutation processes at a human minisatellite. *Hum Mol Genet* 1997;1:129-136.
- 17.- Ugozzoli L, Wallace RB. Applications of and allele-specific polymerase chain reaction to the direct determination of ABO blood group genotypes. *Genomic* 1992;12:670.
- 18.- Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature* 1988;322: 543-546
- 19.- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis, KB Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324: 163.
- 20.- Erlich HA, Sheldon EI, Horn G. HLA typing using DNA probes. *Bio Technol.* 1986; 4: 975-981.
- 21.- Erlich HA, Bugawan TL. HLA class II gene polymorphism: DNA typing, evolution, and relationship to disease susceptibility. In: *PCR Technology: Principles and applications for DNA Amplification*. Ed. by. HA Erlich. Stockton Press, New York, USA 1989:193-208.
- 22.- Wong Z, Wilson V, Patel I, Povey S, Jeffreys AJ. Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann Hum Genet* 1987; 51: 269-288.
- 23.- Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:10953-10971.
- 24.- Kasai K, Nakamura Y, White R. Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J. Forensic* 1990; 5:1196-1200.

- 25.- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Einsenberg J, Allen RC. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1990;38: 137-144
- 26.- Wolf RK, Nakamura Y, White R. Molecular characterization of a spontaneously generated new allele at a VNTR locus: no exchange of flanking DNA sequence. *Genomics*.1988; 3:247-351.
- 27.- Horn GT, Richards B, Klinger KW. Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*1989; 17: 2140.
- 28.- Wu S, Seino S, Bell GI. Human collagen, type II, alpha 21, (Co12A1) gene: VNTR polymorphism detected by gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 3102.
- 29.- Rand S, Puers C, Skowachs K, Wiegand P, Budowle B, Brinkman B. Populations genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLPs. *Int J Legal Med.*1992; 104: 329-333.
- 30.- Boerwinkle E, Xiong W, Fourest E, Chan L. Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B 3' hypervariable region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 212-216.
- 31.- Jeffreys AJ, MacLeod A, Tamaki, Neil DL, Monckton DG. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature*. 1991;354: 204-209.
- 32.- Tamaki K, Monckton DG, MacLeod A, Neil DL, Allen M, Jeffreys AJ. Minisatellite variant repeat (MVR) mapping: analysis of "null" repeat units at DIS8. *Hum Mol Genet* 1992;1:401-406.
- 33.- Rodríguez-Calvo MS, Bellas S, Soto JL, Barros F, Carracedo A. A comparison of different electrophoretic methods for PCR-MVR typing *Electrophoresis* 1996;17: 1294-129.
- 34.- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J. Hum Genet* 1989;44:388-396.
- 35.- Beckman JS, Weber JL. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 1992;12: 627-631
- 36.- Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum Genet* 1989; 44:397-401.

- 37.- Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human myelin basic protein gene (MBP). *Hum Mol Genet* 1992;1: 658.
- 38.- Tautz D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repeated DNA sequences In: *DNA fingerprinting: state of the science*. Ed. by SDJ. Pena, R Chakraborty, JT Eppelen, AJ Jeffrys. Birkhauser Verlag, Basel 1993: 21-28.
- 39.-Fowler JSC, Borgoyne LA, Scott AC, Harding HWJ. Repetitive deoxyribonucleic acid (DNA) an human genome variation. A concise review relevant to forensic biology. *J. Forensic Sci* 1988; 33:1111-1126
- 40.-Polymeropoulos MH, Rath Ds, Xiao H, Merrill CR. Tetranucleotide repeats polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi2 (ACTBP2). *Nucleid Acid Res.* 1992; 20: 1432.
- 41.- Brinkman B, Möller A, Wiegand P. Structure of new mutations in 2 STR systems. *Int J Legal Med* 1995;107: 201-203.
- 42.- Kimpton CP, Walton A, Gill P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet* 1992;1: 287.
- 43.- Moos M, Gallwitz D. Structure of two human beta-actin-related processed genes one of which is located next to a simple repetitive sequence. *EMBO J.* 1983; 2: 757-761.
- 44.- Sharma V, Litt M. Tetranucleotide repeat polymorphism at the D2S11 locus. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 67.
- 45.- Mills KA, Even D, Murray JC. Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum Mol Genet* 1992; 1:779.
- 46.- Lareu MV, Pestoni C, Barros F, Salas A, Caracedo A. Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D12S391 locus. *Gene* 1996;182:151-153.
- 47.- Lareu MV, Pestoni C, Barral S, Salas A, Caracedo A. Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D1S1656 locus. *Int J Leg Med* 1998;111: 244-247.
- 48.- Kimpton CP, Walton A, Gill P, Urquhart A, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods and Applic* 1993; 3:13-22.
- 49.- Ziegler JS, Su Y, Corcoran KP, Nie L, Mayrand PE, Hoff LB, McBride LJ, Kronick MN, Diehl SR. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 1992; 14: 1026-1031.

- 50.- Hagelberg E, Gray IC, Jefrys AJ. Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 1991;352:427-429.
- 51.- Gill P, Woodroffe S, Bar W, Brinkman B, Carracedo A, Eriksen B, Jones S, Kloosterman AD, Ludes B, Mevag B, Pascali VL, Rudler M, Scmitter H, Schneider PM, Thomson JA. A report of an international collaborative experiment to demonstrate the uniformity obtainable using DNA profiling techniques. *Forensic Sci. Int* 1992;47:515-523.
- 52.- Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A. Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. *Forensic Sci Int* 1992;56:65-75.
- 53.- Hallick R, Herráez A. University of Arizona Revised: October 27, 2000 Traducido: Marzo 2004 <http://www.biologia.arizona.edu> All contents copyright © 1996 - 2004. All rights reserved.
- 54.- Butler, J. M., *Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers*, Academic Press, San Diego, CA 2001.
- 55.- Butler, J.M. *Forensic DNA Typing, 2nd Edition*, Figure 13.8, © Elsevier Science/Academic Press. (2005)
- 56.- Sullivan KM, Piercy R, Benson N, Ivanov P, Mannucci AK, Gill P. Solid phase sequencing of mitochondrial DNA: towards a fully automated forensic DNA test In: *Advances in Biomagnetic Separation*. Ed. by M Uhlen, E Homes, O Olsvic. Eaton Publg. Natick MA, USA. 1994: 135-148
- 57.- Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 1994;6:130-135.
- 58.- Wyman AR, White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1980;77: 6754-6758.
- 59.- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "fingerprints" of human DNA *Nature* 1985;316:76-79.
- 60.- Botstein D, White RL, Skolnic M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet.*1980; 32: 314-331.
- 61.- Jeffreys AJ, Brokfield JFY, Semeonoff R. Positive Identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 1985;317:818-819.

- 62.- Brinkman B, Butler R, Lincoln P, Mayr W, Rossi U. 1991 report concerning recommendations of the DNA commission of the international Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of DNA polymorphisms. *Forensic Sci Int* 1992;52: 125-130.
- 63.- Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed cahin reaction. *Meth Enzymol* 1987;155:335-350.
- 64.-Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT. Analysis of DNA with a thermoestable DNA polymerase. *Science*.1988;139: 487-491.
- 65.- El Rassi Z. Capillary electrophoresis of pesticides. *Electrophoresis*.1997. 18: 2465.
- 66.- Innis, M., D. Myambo, D. Gelfand, and M. Brow. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase Chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:9436-9440.
- 67.- Butler, J. M., *Forensic DNA Typing: Biology and Technology behind STR Markers*, Academic Press, San Diego, CA 2001.
- 68.- Smith, R. N. Accurate Size Comparison of Short Tandem Repeat Alleles Amplified by PCR. *BioTechniques* 1995;18: 122–128.
- 69.- Stern, C. "The Hardy–Weinberg law". *Science* 1943; 97:137–138.
- 70.- Emigh, T.H. A comparison of tests for Hardy-Weinberg equilibrium. *Biometrics* 1980;36:627– 642.
- 71.- Ohno Y, Sebetan IM, Akaishi S .A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominants alleles. *Forensic Sci Int*. 1982; 19: 93-98.
- 72.- Fisher RA. Standar calculations for evaluating a blood group system. *Heredity*.1951; 5: 95-102
- 73.- Jones DA. Blood samples: probability of discriminations. *J Forensic Sci Soc*. 1972; 12: 355-359.
- 74.-Luna V. A., Vilchis D.G, Aguilar R. M, Bautista R. A, Rojo N.A, Rangel V. H. Population data for 15 loci (Identifilerw Kit) in a sample from the Valley of Mexico. *Leg Med*. 2005;7:331-333.
- 75.-Hernandez G. S, Hernandez F. P, Martinez T.S, Ramos K. M, Rangel V. H. *Forensic Sci Int*. 2005; 151: 97-100.

- 76.- A. Tereba, Tools for analysis of population statistics. Profiles in DNA. Promega Corp, 1999.
- 77.- P.O. Lewis, D. Zaykin. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>, 2008.
- 78.- Schneider S, Roessli D, and Excoffer, L. (2001). Arlequin software for population genetics data analysis. Ver. 3.11. Genetics And Biometry Lab, Dep. of Anthropology, University of Geneva.
- 79.- Cariacedo A, Barros F. Problemas Bioestadísticos en Genética Forense. Universidad de Santiago de Compostela, 1996. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico Campus Universitario Sur. pp. 11-53.
- 80.- Raymond M.L. y Rousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution*. 1995; 49:1280-1283.
- 81.- Guido Barbujani. Geographic Patterns: How to Identify Them and Why. *Human Biology*. 200; 72: 133-153.
- 82.- Newton, C.R. y A. Graham. PCR, Parte 1: Basic principles and methods. EngBios Scientific Publishers, Oxford, U.K.1994.
- 83.- Erlich, H.A, N. Arnheim. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Ann. Rev. Genet* 1992; 26:479-506.
- 84.- Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298–1302.
- 85.- Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. E. M., High performance zone electrophoresis. *J. Chromatogr.* 1979, 169, 11–20.
- 86.- McCord, B. R., Jung, J. M., Holleran, E. A. High resolution capillary electrophoresis of forensic DNA using a non-gel sieving buffer. *J. Liq. Chromatogr* 1993;16: 1963–1981.
- 87.- Lazaruk, K., Walsh, P. S., Oaks, F., Gilbert, D., Rosenblum, B. B., Menchen, S., Scheibler, D., Wenz, H. M., Holt, C., Wallin, J. Genotyping of forensic short tandem repeat (STR) systems based on sizing precision in a capillary electrophoresis instrument., *Electrophoresis* 1998, 19, 86–93.
- 88.- Kimpton CP, Walton A, Gill P, Urquhart A, Millican ES, Adams M. Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods and Applic* 1993; 3:13-22.

- 89.- Sprecher, C. J., Puers, C., Lins, A. M., Schumm, J. W., General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *Bio- Techniques* 1996, 20, 266–276.
- 90.- Rose, D. J., Jorgenson, J. W. Characterization and automation of sample introduction methods for capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem* 1988;60: 642–648.
- 91.- Buel, E., Schwartz, M., La Fountain, M. J.. Capillary electrophoresis STR analysis: Comparison to gel-based systems. *J. Forensic Sci* 1998; 43:164–170.
- 92.- Biega, L. A., Duceman, B. W., Substitution of H₂O for formamide in the sample preparation protocol for STR analysis using the capillary electrophoresis system: The effects on precision, resolution, and capillary life. *J. Forensic Sci.* 1999, 44, 1029–1031.
- 93.- Butler, J. M., in: Heller, C. (Ed.), *Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis*, Viewig, Germany.1997; 125–134.
- 94.- Chien, R.-L., Burgi, D. S. Electrophoresis. *Anal. Chem.* 1992.64: 489–496.
- 95.- Crivellente, F., McCord, B. R. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis. *J. Capil. Electrophor* 2002;7:73–80.
- 96.- Buel, E., LaFountain, M., Schwartz, M.Evaluation of Capillary Electrophoresis Performance Through Resolution Measurements. *Journal of Forensic Sciences*, in Press. *J. Forensic Sci* 2003;48, 77–79.
- 97.- Cohen, A. S., Najarian, D. R., Paulus, A., Guttman, A., Smith, J. A., Karger, B. L. Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 9660–9663.
- 98.- Heller, C. Principles of DNA separation with capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001;22:629–643.
- 99.- Heiger, D. N., Cohen, A. S., Karger, B. L. Separation of DNA restriction fragments by high performance capillary electrophoresis with low and zero crosslinked polyacrylamide using continuous and pulsed electric fields. *J. Chromatogr* 1990;516:33–48.
- 100.- Grossman, P. D., Soane, D. S. Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solution. *J. Chromatogr.* 1991;559:257–266.

- 101.- Barron, A. E., Blanch, H. W., Soane, D. S. "A transient entanglement coupling mechanism for DNA separation by capillary electrophoresis in ultra-dilute polymer solutions, *Electrophoresis*. 1994;15: 597-615.
- 102.- Madabhushi, R. S. Separation of 4-Color DNA Sequencing Extension Products in Noncovalently Coated Capillaries Using Low Viscosity Polymer Solutions. *Electrophoresis* 1998;19:224-230.
- 103.- Rosenblum, B. B., Oaks, F., Menchen, S. Johnson, B. Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1997;25: 3925-3929.
- 104.- Singer, V. L., Johnson, I. D., Proceedings from the 8th International Symposium on Human Identification, Promega, Madison, WI 1997: 70-77.
- 105.- Klein, S. B., Wallin, J. M., Buoncristiani, M. R., *Forensic Sc. Commun.* 2003,5, <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/jan2003/klein.htm>.
- 106.- Liu, Y., Kuhr, W. G., Separation of double- and single-stranded DNA with polymer solution under alkaline conditions. *Anal. Chem.* 1999, 71, 1668-1673.
- 107.- Mala, Z., Kleparnik, K., Boc̣ ek, P. Highly alkaline electrolyte for single-stranded DNA separations by electrophoresis in bare silica capillaries, *J. Chromatogr. A.* 1999, 853, 371-379.
- 108.- Nock, T., Dove, J., McCord, B., Mao, D. Temperature and pH studies of STR systems using capillary. *Electrophoresis* 2001, 22, 755-762.
- 109.- Hjertén, S. High-Performance Electrophoresis Elimination of Electroendosmosis and Solute Adsorption, *J. Chromatogr.* 1985, 347, 191-198.
- 110.- Fung, E. N., Yeung, E. S. High-speed DNA sequencing by using mixed poly(ethylene oxide) solutions in uncoated capillary columns, *Anal. Chem.* 1995, 67, 1913-1919.
- 111.- Giusti, W. G., Adriano, T. Synthesis and characterization of 5'-fluorescent-dye- labeled oligonucleotides, *PCR Methods Appl.* 1993, 2, 223-227.
- 112.- Butler, J. M., Shen, Y., McCord, B. R. The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA, *J. Forensic Sci.* 2003, 48, 1054-1064.
- 113.- Genescan Reference Guide: Chemistry Reference for the ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, P/N 4303189, Foster City, CA 2008.

- 114.- Elder, J. K., Southern, E. M. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. I. Improved accuracy of mobility measurements using a digital microdensitometer and computer processing, *Anal. Biochem.* 1983, 128, 227–231.
- 115.- ABI PRISM Genotyper 3.1 Software User's Manual, P/N 904648, Foster City, CA 2001.