



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Estudio genético de 30 polimorfismos  
Inserciones/Deleciones (InDel's) y su aplicación forense en  
identificación humana para población del Distrito Federal,  
México.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**KAREN FERNANDA REAL SALAZAR**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**M. en C. MAURO LÓPEZ ARMENTA**

**2016**



Cd.Mx.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno.

Real  
Salazar  
Karen  
Fernanda  
55 40 92 19 64  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
309313159

### 2. Datos del tutor.

M. en C. Gen.  
Mauro  
López  
Armenta

### 3. Datos del sinodal 1.

Dra.  
América  
Nítxin  
Castañeda  
Sortibrán

### 4. Datos del sinodal 2.

M. en C.  
José  
Alfonso  
Vilchis  
Peluyera

### 5. Datos del sinodal 3.

Dr.  
José  
Antonio  
Velázquez  
Aragón

### 6. Datos del sinodal 4.

Biól.  
María  
Eugenia  
Ambríz  
Franco Romero

### 7. Datos del trabajo escrito.

Estudio genético de 30  
polimorfismos  
Inserciones/Deleciones (InDels) y su  
aplicación forense en identificación  
humana para población del Distrito  
Federal, México.  
81 pág.  
2016

# *Agradecimientos*

*Gracias a mis padres **Bertha Salazar** y **Ricardo Real** quienes han sido, son y serán por siempre mi mejor apoyo para todas y cada una de las decisiones de mi vida. Sin ellos nada de esto sería ni tantito posible. Los quiero mucho.*

*Gracias a los mejores tutores, maestros, asesores y sobre todo, mis amigos **Ma. Eugenia Ambriz** (Maru) y **Mauro López** gracias por confiar en mí, por abrirme las puertas del laboratorio y por todos sus consejos, comentarios, críticas y correcciones. Gracias por su paciencia y tiempo que me dieron para aprender las técnicas del laboratorio, por compartirme de su conocimiento y de los años de experiencia que tienen en el área, espero algún día hacer y disfrutar mi trabajo con tanta pasión como ustedes lo hacen. Siempre admiraré su profesionalismo y la humanidad con la que trabajan. Gracias por ser mi familia del laboratorio ☺ y por siempre estar para darme apoyo cuando más nervios tengo. Los quiero.*

*Gracias a todo el equipo del laboratorio de Genética del INCIFO a la **M. en C. Mariana Ruiz** por siempre resolver mis dudas estadísticas y explicármelas con toda la paciencia del mundo. A la **Biól. Yadira López** y al **T.Q.I. Raúl Flores** por compartirme de sus conocimientos a través de su experiencia, siempre tienen una buena historia que contar para amenizar el trabajo. Gracias **Ale, David, Caro, Chris y Kayro** por ser grandes compañeros dentro de mi estancia en el laboratorio, el tiempo en el lab junto a ustedes se pasa muy rápido y muy divertido.*

*Gracias a la **Dra. América Castañeda** por ser mi amiga desde mis primeros semestres en esta gran experiencia dentro de la Biología, por abrirme las puertas del laboratorio de Genética y dejarme convencida de que la genética era y es lo que me llena dentro de la Biología.*

*Gracias al **Dr. José Velázquez** por llegar justo en el momento en que más necesitaba de un experto en estadística, gracias por sus correcciones, comentarios y consejos. Espero poder seguir aprendiendo mucho más de ti doc.*

*Gracias al **M. en C. Alfonso Vilchis**, uno de los mejores profesores que tuve en la carrera. Disfruté mucho sus clases y espero nunca pierda esa pasión con la que se presenta ante un grupo de jóvenes para enseñarnos y compartirnos parte del mucho conocimiento que tiene. Gracias profe ☺*

*Gracias a todos mis amigos de la facultad **Axel**, mi gordo favorito desde tiempos preparatorianos, la bioestadística y las plantas no me hubieran gustado si no fuera por ti y por **Alin** ☺. **David, Caro, Gerry, Eugin** y **Andrés**, las clases y la carrera las disfruté más en su compañía.*

*Gracias a la **Facultad de Ciencias** y a la máxima casa de estudios (**UNAM**) por todo lo que me brinda al dejarme ser parte de su comunidad, espero algún día regresarte algo de lo mucho que me has dado.*

**-Por mi raza hablará el espíritu-**

# *Dedicatorias*

A **Bertha Salazar** (mi apoyo)

A **Ricardo Real** (mi fortaleza)

A **Josué Real** y **Dante Real** (con los que siempre podré reír, jugar y pelear 😊)

A mi abuelo **Ricardo Real Colín** † (algún día iremos por árboles de navidad otra vez....)

*Porque ustedes son los pilares de mi vida y me han enseñado a ser valiente, me han dado las herramientas para estar hoy aquí y para los retos que vienen. Agradezco su infinito amor hacia mí, su confianza, agradezco su vida y bienestar. Soy muy afortunada de tenerlos en mi vida. Los amo.*

A toda mi familia, mis primos, primas, tíos y tías (Real, Salazar y Rodríguez)

A **Hortencia Tapia** (Tita),

A **Mario Real** (Popis)

A mi tía **Estela Salazar** y mama **Estela Escobedo**

*Mi vida se ha visto impactada por ustedes, me dan fortaleza y confianza para seguir adelante, los admiro y sé que de ustedes siempre tendré consejos llenos de amor. Ustedes saben la manera en la que cada uno me ha ayudado a crecer como persona y en mi vida espiritual. Para mí, es un orgullo y una gran responsabilidad portar estos dos apellidos.*

*A mis amigos: **Ana Karen**, mi mejor amiga desde hace más de 10 años, te quiero amiga por escucharme siempre que te necesito. **Axel**, las miles de fotos no me dejarán mentir de lo bien que la pasamos juntos gordo. **Rubén, Pepe, Cong, Alin, Eugin, Vale** y **Ale** espero que con los años nuestra amistad siga creciendo cada día más y vivir muchos más momentos gratos con ustedes.*

*Finalmente, a **Erick Contreras** quien ha formado parte importante de mi vida y de quien he aprendido muchísimo, mi asesor en diseño, mi favorito en Química y en corales. Agradezco tu vida, tu compañía y la paciencia que tienes conmigo. Gracias a toda tu familia por ser buenos conmigo. Te quiero muchísimo 😊*

A mi **OHIM**, gracias.

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.*

*Marie Curie*

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 Genética Forense.....	3
2.1.1 Aplicaciones de la genética forense .....	3
3. MARCO TEÓRICO .....	4
3.1 ADN.....	4
3.1.1 Estructura y función del ADN .....	4
3.1.2 Herencia de información .....	6
3.1.3 Polimorfismos en el ADN .....	7
3.2 Tipos de muestras en Genética Forense.....	8
3.2.1 Muestras de Referencia .....	8
3.2.2 Muestras problema y ADN degradado.....	9
3.3 Problemas Recurrentes en Genética Forense.....	11
3.3.1 Contaminación .....	11
3.3.2 Muestras mínimas críticas .....	12
3.3.3 Aspectos metodológicos .....	13
3.4 Marcadores Genéticos .....	14
3.4.1. Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR's).....	14
3.4.2 Repeticiones Cortas en Tándem (STR's).....	15
3.4.3 Polimorfismos de un Sólo Nucleótido (SNP's).....	15
3.4.4 Polimorfismos de Inserción/Delección (InDel's) .....	16
3.4.5 Marcadores Autosomales .....	19
3.4.6 Marcadores de Linaje.....	19
3.5 Técnicas de Análisis de Polimorfismos.....	22
3.5.1 Extracción y Purificación de ADN .....	22
3.5.2 Cuantificación de ADN .....	24
3.5.3 Amplificación de ADN .....	26
3.5.4 Detección y Análisis de ADN .....	28
3.6 Genética de Poblaciones .....	29
3.6.1 Frecuencias Alélicas .....	30
3.6.2 Frecuencias Genotípicas .....	31
3.6.3 Ley de Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	31
3.6.4 Heterocigocidad Observada y Esperada .....	32

3.6.5 Poder de Discriminación .....	32
3.6.6 Poder de Exclusión .....	33
3.6.7 Poder de Coincidencia .....	34
3.7 Población de la Ciudad de México .....	34
4. OBJETIVOS .....	36
5. JUSTIFICACIÓN .....	37
6. MATERIAL Y MÉTODO .....	38
6.1 Muestras de Referencia .....	38
6.1.1 Muestra Poblacional .....	38
6.1.2 Muestras Biológicas .....	38
6.1.3 Extracción y Purificación de ADN .....	38
6.1.4 Amplificación y Genotipificación de ADN .....	39
6.1.5 Análisis de Datos .....	39
6.2 Muestras Problema .....	40
6.2.1 Bloques de tejido parafinado embebidos en formol .....	40
6.2.2 Restos óseos .....	41
7. RESULTADOS .....	42
7.1 Muestras de Referencia .....	42
7.2 Muestras Problema .....	53
8. DISCUSIÓN .....	58
9. CONCLUSIONES .....	64
10. PERSPECTIVAS .....	65
11. LITERATURA CITADA .....	66
12. ANEXOS .....	71
Anexo 1. Hoja de información al participante y formato de consentimiento informado ...	71
Anexo 2. Extracción de ADN en muestras de saliva .....	72
Anexo 3. Protocolo de amplificación Investigator® DIPplex (QIAGEN) .....	72
Anexo 4. Protocolo de corrimiento electroforético con el kit Investigator® DIPplex (QIAGEN) .....	73



## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>C</b>	Citosina
<b>CNV</b>	Variación en el Número de Copias
<b>dNTP's</b>	Dinucleótidos trifosfatados
<b>EC</b>	Electroforesis Capilar
<b>E H-W</b>	Equilibrio de Hardy-Weinberg
<b>G</b>	Guanina
<b>H-ADN</b>	ADN de origen humano
<b>Ho</b>	Heterocigocidad Observada
<b>He</b>	Heterocigocidad Esperada
<b>HV-I</b>	Región Hipervariable 1
<b>HV-II</b>	Región Hipervariable 2
<b>InDel</b>	Polimorfismo de Inserción-Delección
<b>ITP</b>	Índice Típico de Paternidad
<b>mtADN</b>	ADN mitocondrial
<b>NH-ADN</b>	ADN de origen no humano
<b>NR1</b>	Región no recombinante del cromosoma Y
<b>PC</b>	Poder de Coincidencia
<b>PCC</b>	Poder Combinado de Coincidencia
<b>PCD</b>	Poder Combinado de Discriminación
<b>PCE</b>	Poder Combinado de Exclusión
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PD</b>	Poder de Discriminación
<b>PE</b>	Poder de Exclusión
<b>SNP</b>	Polimorfismos de Nucleótido Simple
<b>STR</b>	Repeticiones Cortas en Tándem
<b>T</b>	Timina
<b>VNTR</b>	Número Variable de Repeticiones en Tándem
<b>X-STR</b>	Marcadores de tipo STR en cromosoma X
<b>Y-STR</b>	Marcadores de tipo STR en cromosoma Y
<b>-Del</b>	Delección
<b>+Ins</b>	Inserción

## 1. RESUMEN

La identificación humana es un área extensa en donde la Genética Forense juega un papel importante mediante el uso de ADN y marcadores genéticos. Para ello, a nivel mundial laboratorios de ADN forense utilizan marcadores genéticos consistentes en repeticiones cortas en tándem (STR's). Sin embargo, una limitante que presentan es su baja eficiencia para muestras de ADN degradado, razón por la cual el presente trabajo propone el uso de polimorfismos de inserción/delección (InDel's) como una forma innovadora de tipificación, caracterizados por su amplia distribución en el genoma, bajo rango de mutación, ausencia de variantes alélicas, los cuales amplifican fragmentos pequeños de ADN, haciéndolos ideales para dicha tarea. Este trabajo tuvo como objetivo generar frecuencias alélicas de 30 InDel's en población del Distrito Federal, México y probar la eficiencia de dichos marcadores en muestras problema consideradas críticas. Se tomaron muestras biológicas (sangre o saliva) de 150 individuos no relacionados biológicamente, nacidos en el Distrito Federal, que fueron procesadas para la extracción, purificación, amplificación y corrimiento electroforético del ADN. Los datos generados fueron analizados para diferentes parámetros estadísticos. Se observó que los 30 InDel's se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg con una  $p > 0.05$ , un poder combinado de exclusión = 0.992076, un poder combinado de discriminación = 0.999999999997562 y un poder combinado de coincidencia =  $2.43797E-12$ . De las muestras problema, se obtuvieron perfiles parciales con marcadores de tipo STR's y perfiles completos de InDel's para algunas de las muestras. Se concluye que este trabajo provee una reciente estrategia para la identificación humana generando frecuencias alélicas y valores de parámetros estadísticos forenses eficientes que resultan relevantes para su aplicación en casos forenses de identificación humana ya sea con muestras de referencia o muestras mínimas críticas.

## 2. INTRODUCCIÓN

La unidad básica de la vida es la célula, la cual posee información necesaria para dictar las características que la hacen única y que generan la energía necesaria para mantenerla. El ser humano es un organismo pluricelular, es decir, compuesto de millones de células, pero que todas y cada una de ellas provienen de la recombinación de dos de ellas. El tipo de células que nos componen presentan un organelo conformacional llamado núcleo, dentro del cual se encuentra la biomolécula conocida como Ácido Desoxirribonucleico o ADN, que es referido a menudo como ADN nuclear; éste contiene la información que posteriormente será heredada a las siguientes generaciones. Sin embargo, adicional al ADN nuclear, existe el ADN mitocondrial, genoma circular encontrado en los organelos ubicados en el citoplasma de la célula conocidas como mitocondrias. Las dos diferencias principales entre el ADN nuclear y mitocondrial son (1) la manera en la que la información que contienen es heredada y (2) la cantidad en la que se encuentran en el ser humano. La ciencia que se encarga de estudiarlo es la Genética que engloba el estudio de las células, los individuos y las poblaciones, así como la transmisión de características o rasgos de generación en generación, la naturaleza de los genes y el producto de estos, cómo es que se expresan y cómo son regulados así como la dinámica de las frecuencias de los genes en las poblaciones (Lodish *et al.*, 2008; Krebs *et al.*, 2014).

Debido a que la información genética de un individuo es única y que la Genética como disciplina científica explica y predice las formas de herencia biológica, su uso se ha extendido a otras disciplinas, teniendo un impacto significativo en las Ciencias Forenses. En los últimos años, la tecnología para el análisis de ADN en el área forense ha hecho posible realizar pruebas de identificación humana, pruebas que son deseables en un gran número de situaciones como la determinación de la participación de individuos en un crimen, la resolución de casos de paternidad o la identificación de restos de personas desaparecidas y/o víctimas de desastres masivos. Incidentes en los cuales las disciplinas forenses encargadas de la identificación humana como la dactiloscopia y la odontología se ven superadas; casos donde se cuenta con restos en estado avanzado de putrefacción, escasos restos humanos, restos calcinados o piezas dentales incompletas son ejemplos en los cuales la genética forense toma importancia por tener la capacidad y ventaja de poder trabajar con cualquier resto biológico de un individuo (Butler, 2015).

A través de la historia, son varios los casos resueltos por tipificación de ADN que han generado impacto en la población. Por mencionar algunos, la identificación de restos de víctimas del colapso de las torres gemelas World Trade Center en la ciudad de Nueva York; Estados Unidos ocurrida en Septiembre de 2001, la identificación de los restos del “ángel de la muerte” Josef Mengele, médico del campo de concentración Nazi de Auschwitz durante la Segunda Guerra Mundial, así como la presunta paternidad de Thomas Jefferson de un niño concebido con una de sus esclavas. Para el caso particular de México, casos como el incendio del centro nocturno “Lobohmbo” en el año 2000 dejó alrededor de 20 muertos, de los cuales 18 fueron identificados por ADN.

## 2.1 Genética Forense

La Genética Forense es la ciencia que realiza identificación humana a través del análisis del material hereditario (ADN) en un contexto legal. Se enfoca en el uso de la variación del ADN con la finalidad de dar solución a problemas de investigación criminal por medio del uso de marcadores genéticos polimórficos. Su objetivo es emplear el material hereditario para generar perfiles genéticos y al hacer comparaciones entre éstos y realizar el cálculo de ciertos parámetros estadísticos poder sustentar los resultados que se emitan (Martínez, 1999; Butler, 2009; Maroñas *et al.*, 2015).

Fue desde 1985 que el Dr. Alec Jeffreys de origen inglés, reportó en *Nature* que ciertas regiones de ADN llamadas minisatélites presentes en el genoma humano eran repetitivas y que el número de estas regiones de repetidos diferían entre un individuo y otro. El Dr. Jeffreys observó que los patrones de bandeo generados en la electroforesis por los minisatélites de cada persona eran únicos, de forma similar como ocurre con una huella dactilar. Esto es a lo que él llamó *DNA fingerprinting* o *Huella genética*. Es así como generó información útil en el campo de las pruebas de paternidad y los análisis forenses (Butler, 2009). Derivado de lo anterior homologaron el término para la caracterización de moléculas de ADN, que es único y específico de cada individuo. Sin embargo, actualmente se conoce como tipificación de ADN (Krawczak y Schmidtke, 1998). La tipificación de ADN como técnica de identificación tomó mayor importancia cuando se comenzaron a notar las grandes ventajas al compararla con técnicas tradicionales como el análisis de proteínas. Ventajas como trabajar con muestras degradadas, ya que el ADN es por mucho, más resistente que la mayoría de las proteínas, obtener un mismo resultado en una tipificación genética a partir de cualquier célula tomada de un individuo en comparación de proteínas, que únicamente se restringen a tejidos donde éstas se encuentran expresadas. Finalmente, con el avance de la tecnología, los tiempos de análisis de ADN se han ido reduciendo cada vez más (Carracedo 2005).

### 2.1.1 Aplicaciones de la genética forense

De manera esencial, la genética forense se encarga de determinar la identidad de un humano. La identificación humana e individual es deseable en un sin número de situaciones así que el campo de acción de la genética forense es extenso e incluye situaciones como la determinación de la perpetración en un crimen violento tal como un asesinato o una violación mediante el análisis de evidencias biológicas tales como sangre, saliva, semen o pelo, la resolución de pruebas de parentesco biológico tales como paternidades, relaciones de parentesco complejas (relación abuelo-nieto, medias hermandades, tío-sobrino, entre otras) y la identificación de restos de personas extraviadas (Krawczak y Schmidtke, 1998; Butler, 2009; Butler, 2011).

### 3. MARCO TEÓRICO

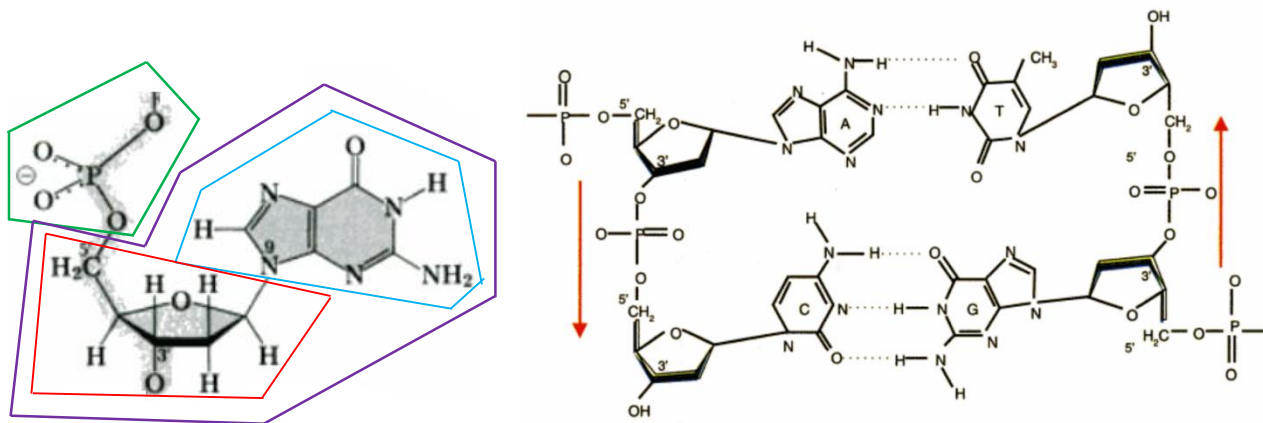
#### 3.1 ADN

ADN es el acrónimo para Ácido Desoxirribonucleico que hasta el año de 1944 era desconocido como la base de la herencia donde se ubica el genoma de todo organismo vivo, contiene la información hereditaria de cada organismo y por tanto, se vuelve esencial entender su estructura, funcionamiento y mecanismos de regulación (Krawczak y Schmidtke, 1998; Krebs *et al.*, 2014).

##### 3.1.1 Estructura y función del ADN

El ADN es un polinucleótido de doble cadena encargado de conservar la información genética. La base de composición es el nucleótido, es decir: una base nitrogenada, un azúcar de tipo desoxirribosa y un grupo fosfato (Krebs *et al.*, 2014).

Una base nitrogenada es un compuesto orgánico cíclico que puede ser purina (adenina (A) y guanina (G)) o pirimidina (timina (T) y citosina (C)) y que se une al carbón 1' (C1') de una pentosa (azúcar) por medio de un enlace glucosídico que va al N<sub>1</sub> (en pirimidinas) o al N<sub>9</sub> (en purinas) y provee de estabilidad a la molécula. La pentosa o desoxirribosa unida a la base nitrogenada se conoce como: nucleósido. Como se puede observar en la figura 1, cuando este nucleósido se une a un grupo fosfato por medio del C5' o C3' de su azúcar se convierte en un nucleótido. De modo que un polinucleótido es una larga cadena de nucleótidos (Krawczak y Schmidtke, 1998; Clark y Russell, 2005).

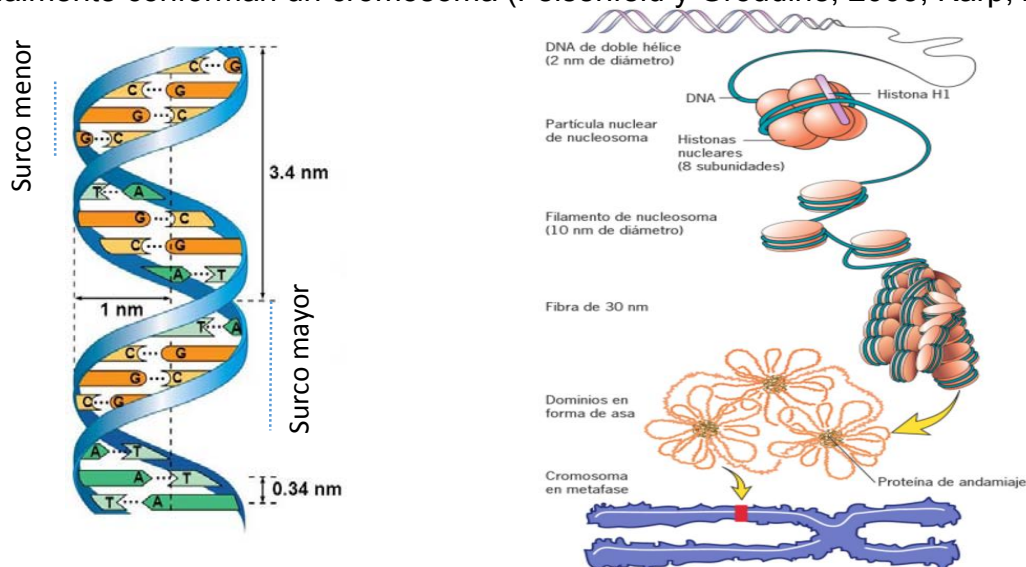


**Fig. 1.** Diagrama de la formación de un nucleótido por la unión de un nucleósido (*morado*) (desoxirribosa (*rojo*) y base nitrogenada (*azul*)) y grupo fosfato (*verde*), (*izq.*) (Tomada y modificada de McGilvery, 1977). Esquema plano de un segmento de ADN que muestra el apareamiento entre bases nitrogenadas; entre A-T dos puentes de hidrogeno (*arriba*) y entre C-G tres puentes (*abajo*), la polaridad de las cadenas está dada por la posición de las pentosas y señaladas por flechas (*der.*) (Tomada de Solari, 2004).

El ADN es una molécula hidrofílica debido a la presencia de grupos polares en la pentosa, presenta una carga negativa y un carácter ácido por los grupos fosfato. Las dos cadenas que constituyen el ADN resultan de las interacciones entre las bases nitrogenadas de uno y otro filamento, uniéndose en pares de bases específicos, de modo que la Adenina siempre estará unida a una Timina y una Guanina a una Citosina por medio de puentes de hidrogeno (H), siendo entonces que como se observa en la figura 1, entre A-T existen dos puentes de H y entre G-C tres puentes de H (Martínez, 1999; Garrido y Tejió, 2006).

En el año de 1953 James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick con la ayuda del análisis cristalográfico por difracción de rayos X realizado por Rosalind Elsie Franklin dedujeron la estructura del ADN concluyendo que (1) son dos cadenas largas polinucleotídicas enrolladas alrededor de un eje central formando una doble hélice girada hacia la derecha (dextrógira), (2) las cadenas son antiparalelas, es decir con direcciones opuestas, (3) las bases de las cadenas forman estructuras planas y perpendiculares al eje estando apiladas una sobre otra separadas por 3.4 Å (0.34nm) al interior de la estructura, (4) cada vuelta de la hélice tiene una longitud de 34 Å (3.5nm) de modo que cada vuelta contiene 10 pares de bases nitrogenadas, (5) a lo largo de la molécula existen surcos mayores y menores que se alternan a lo largo del eje y (6) la doble hélice mide 20 Å (2nm) de diámetro (Watson y Crick, 1953; Nelson y Cox, 2013). Características que de manera más gráfica, pueden observarse en la fig. 2.

Así mismo, el ADN presenta diferentes grados de empaquetamiento o condensación, como observamos en la figura 2, partimos de la secuencia de nucleótidos o ADN desnudo enrollado alrededor de proteínas histonas formando nucleosomas, nivel más bajo de organización, estos se organizan en fibras de 30nm, que a su vez forman dominios de asas y finalmente conforman un cromosoma (Felsenfeld y Groudine, 2003; Karp, 2010).



**Fig. 2.** Estructura de la doble hélice (*izq.*). Niveles de compactación del ADN, ADN desnudo, nucleosoma, fibra de 30nm, dominios en forma de asa y cromosoma (*der.*) (tomado y modificado de Karp, 2010).

Físicamente, el genoma está dividido en cromosomas y de manera funcional en genes. Un gen es una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido o algún otro ácido nucleico (ARN, tARN, entre otros) como producto génico final. Existen dos grupos grandes de ADN, codificante y no codificante, el primero posee poca variabilidad entre las personas exceptuando ciertas regiones; mientras que el segundo equivale al 85-90% de todo el genoma, este ADN no es transcrito y no codifica a ningún gen en particular razón por la cual, por mucho tiempo fue denominado en forma errónea como “ADN basura”. Sin embargo, hoy en día se sabe que está involucrado en la regulación de los genes. El ADN no codificante se caracteriza por ser muy polimórfico y variable entre los individuos, lo que lo hace apto para su aplicación en el área médico-legal. Se estima que aproximadamente la mitad del ADN no codificante es ADN repetitivo que como veremos más adelante, es el usado para fines forenses (Martínez, 1999; Krebs *et al.*, 2014).

Así que, funcionalmente, el ADN tiene dos propósitos fundamentales, (1) hacer copias de sí mismo cuando las células se dividen acarreando exactamente la misma información y (2) contener la información y llevar instrucciones para generar proteínas y así las células puedan construir la maquinaria de la vida (Butler, 2009).

### 3.1.2 Herencia de información

La capacidad de las células de preservar su material genético y duplicarlo para la siguiente generación se llama *herencia* y resulta de la complementariedad estructural entre las dos cadenas de la molécula del ADN. En organismo sexuados, el espermatozoide y el óvulo acarrean información hereditaria acumulada de millones de años de evolución y la transmiten a manera de ADN que junto con otras interacciones codifican un mensaje genético (Nelson y Cox, 2013).

Históricamente, Gregor Mendel en el área de la Genética es recordado por haber demostrado la herencia de información de genes de progenitores a la descendencia dejando así, los siguientes dos principios: (1) 1ra Ley de Mendel o Principio de Segregación.- En un organismo los dos alelos que controlan un rasgo permanecen unidos durante toda la vida pero se separan, o segregan, durante la formación de las células reproductivas y (2) 2da Ley de Mendel o Ley de Independencia de los caracteres.- La separación o segregación de dos alelos correspondientes a un rasgo no tienen efecto sobre la segregación de los alelos de otro rasgo en la formación de células reproductivas. A pesar de que él lo demostró con plantas, estos principios aplican a gran cantidad de organismos incluyendo a los humanos y son leyes que actualmente siguen vigentes (Cumings, 2000; Hartl y Jones, 2009).

El sexo de un humano está determinado por un par de sus cromosomas y se establece en el momento en que un óvulo es fecundado por un espermatozoide. Cada célula diploide (2N) tiene 46 cromosomas (23 pares) de los cuales, 22 pares son autosomas (no sexuales) y 1 par es el sexual; siendo XX los cromosomas sexuales para la mujer

resultado de un óvulo haploide (23:X) fertilizado por un espermatozoide haploide (23:X) y XY los cromosomas sexuales para un hombre, resultado de la fertilización de un óvulo haploide (23:X) y un espermatozoide haploide (23:Y). Cada uno de los gametos (óvulo y espermatozoide) posee información genética del individuo de quien proviene y es durante la fertilización que ocurre la fusión de los núcleos para dar origen a un nuevo individuo. Dado que cada gameto es haploide (N), la fertilización genera la ploidía 2N (diploide) del humano. Una vez que se da la fecundación, el óvulo acepta el ADN del espermatozoide que se descondensa una vez que entra al óvulo y se promueve la singamia (mezcla de los dos genomas haploides) o recombinación genética heredando cada progenitor de manera azarosa 50% de su información al cigoto (2N), posterior a esto comienzan las divisiones mitóticas generando así, que todas las células hijas contengan la misma información genética (Jones y López, 2014).

Los patrones de herencia de una determinada característica pueden ser analizados mediante un método genético hereditario siguiendo dicha característica por varias generaciones en una familia y determinar cómo es que esta ha sido heredada, dicho método se conoce como árbol genealógico o *Pedigree* (Krebs *et al.*, 2014).

### 3.1.3 Polimorfismos en el ADN

La presencia de múltiples alelos en un locus es llamado polimorfismo y se define así si es que dos o más alelos presentes en el locus tienen una frecuencia mayor al 1% en la población. En ocasiones, estos polimorfismos pueden tener repercusiones en el fenotipo del individuo. Dos formas de variación primaria son posibles a nivel de ADN (1) polimorfismos de secuencia y (2) polimorfismos de longitud (Butler, 2009; Krebs *et al.*, 2014).

a) Polimorfismo de secuencia

----- AGACTAGACATT -----  
 ----- AGATTAGGCATT -----

b) Polimorfismo de longitud

----- (AATG)(AATG)(AATG) -----  
                   3 repetidos  
 ----- (AATG)(AATG) -----  
                   2 repetidos

**Fig.3.** Formas primarias de variación existentes en el ADN. **a)** polimorfismo de secuencia; **b)** polimorfismo de longitud (tomado y modificado de Butler, 2009).



Algunos ejemplos de polimorfismos de secuencia son los Polimorfismo de un Sólo Nucleótido o SNP's (por sus siglas en Inglés Single Nucleotide Polymorphism) y los Polimorfismos de Inserción y Deleción también llamados InDel's o DIP's. Ejemplos de polimorfismos de longitud son las Repeticiones Cortas en Tándem o STR's y los VNTR's o Número Variable de Repeticiones en Tándem (Butler, 2009; Hartl y Jones, 2009; Krebs *et al.*, 2014).

### 3.2 Tipos de muestras en Genética Forense

El ADN está presente en todas las células nucleadas y el cuerpo humano contiene millones de estas, sólo los glóbulos rojos, que por el nivel de especialización con el que cuentan para su función de transporte de oxígeno, carecen de núcleo. Por tanto, son muchos y variados los tipos de muestras que se pueden trabajar para fines forenses. La sangre es el tipo de muestra más común, sin embargo, se puede obtener ADN a partir de objetos con los cuales un individuo tuvo contacto directo y en los cuales hay presencia de células, las cuales pueden ser de diferente tipo y provenir de diferente fuente según sea el caso.

Debido a que el perfil genético que se obtiene de una muestra forense tiene por objetivo la identificación, es importante que en la confronta con otro perfil, éste último tenga como particularidad estar perfectamente caracterizado, es decir, se sepa con certeza cuál es su origen. Las muestras de las que se sabe su origen son llamadas muestras de referencia, en tanto que las muestras obtenidas de un escenario de delito son llamadas muestras forenses o muestras problema. Es por ello que para fines prácticos, podemos dividir los tipos de muestras en estos dos grandes grupos (Butler, 2011; Goodwin *et al.* 2011).

#### 3.2.1 Muestras de Referencia

Las muestras de referencia regularmente son obtenidas de personas vivas y utilizadas para pruebas de paternidad, búsquedas de familiares desaparecidos, sospechosos y en ocasiones pruebas de abuso sexual donde se obtiene la muestra directamente de la víctima. Este tipo de muestras se caracterizan por (1) conocer exactamente la fuente biológica de donación de la muestra, (2) brindar cantidades de ADN suficientes y en buen estado y (3) ser de fácil acceso. Las muestras de referencia empleadas a nivel mundial son casi siempre la sangre y la saliva; en raras ocasiones y bajo ciertas circunstancias, mechones de cabello pueden ser la opción aunque su uso no es común. A continuación, se detallan un poco más algunas muestras de referencia (Goodwin *et al.*, 2011; Butler, 2011).

**Sangre.-** La sangre está compuesta por líquido plasmático que contiene proteínas solubles, lípidos, glucosa, hormonas, metabolitos y sales; de igual manera, la sangre contiene diferentes tipos celulares, células rojas (eritrocitos) y células blancas (leucocitos). Es de los leucocitos que por tener núcleo son la fuente para extraer el material genético (Butler, 2011; Goodwin *et al.* 2011).

Tradicionalmente la sangre ha sido tomada como muestra de referencia, sin embargo, la toma de este tipo de muestra es considerada *invasiva*, ya que puede representar cierto riesgo hacia la salud del individuo si es que la muestra no fue tomada adecuadamente, por lo que se ha buscado que otro tipo de muestras como la saliva replacen su uso (Krawczak y Schmidtke, 1998).

**Saliva.-** Es el fluido producido por la boca para comenzar de manera normal el proceso de digestión, está compuesta por secreciones de las glándulas salivales así como fluido crevicular, secreciones bronquiolares, células de tipo sanguíneo como los leucocitos y células epiteliales de descamación. Es de estas dos últimas de las cuales el material genético es obtenido (Echeverri, 1995).

Características importantes de este tipo de muestra son (1) su colecta únicamente involucra un arrastre de células de mucosa bucal con un hisopo en la parte interna de las mejillas de la boca del individuo y por tanto (2) no es invasiva y (3) es de muy fácil acceso, razones por las cuales puede ser considerada la muestra de referencia ideal (Butler, 2011).

### 3.2.2 Muestras problema y ADN degradado

Se denomina *muestras problema* o *muestras forenses* a todas aquellas que no sean de referencia, es decir, donde no se tiene certeza de la fuente biológica de donación de la muestra, no se conoce el estado de conservación ni la manipulación o exposición a condiciones a las que esta ha sido sometida (Butler, 2009).

Cuando un individuo muere la sangre deja de circular, disminuye la cantidad de O<sub>2</sub> y se da un alto en la producción de ATP; esto afecta el funcionamiento de las células, las cuales comienzan vías de muerte celular (apoptosis o necrosis), paulatinamente se rompen las membranas celulares y posteriormente las nucleares, por tanto, el material genético queda expuesto a sufrir fragmentación y modificaciones químicas o estructurales, esto es a lo que se le llama *ADN degradado*. Desde el instante en que un organismo muere, su ADN comienza el proceso de degradación, sin embargo, hay factores externos (agua, ambientes de extremo calor, exposición a microorganismos) e internos (producción de enzimas nucleasas) que aceleran este proceso. Trabajar con ADN degradado, en muchas ocasiones, trae como consecuencia el fracaso de la PCR y la pérdida de lectura de algunos o todos los marcadores genéticos. (Alaeddini *et al.*, 2010; Butler, 2011). Algunos ejemplos de muestras problema son los siguientes:

**Tejido.-** En ocasiones, el tipo de muestra con la que se dispone para fines de identificación es tejido, sin embargo no todos los tejidos rinden cantidades iguales de ADN; tejidos fibrosos como el corazón o grasos como el cerebro, rinden cantidades mucho mayores que tejidos como el bazo, que por la alta cantidad de nucleasas que en él se encuentran, su rendimiento es mucho menor. Se estima que muestras de tejido fresco, de tipo blando suelen tener rendimientos de ADN de entre 50ng a 500ng mg<sup>-1</sup>, cantidades que en Genética Forense son ideales puesto que la mayoría de los sistemas de identificación actuales utilizan entre 1ng – 2ng de ADN. Sin embargo, cuando el cuerpo ha estado expuesto a condiciones ambientales desfavorables, la descomposición de los tejidos se da de manera inmediata causando la degradación del ADN (Caputo *et al.*, 2013; Sorensen *et al.*, 2015).

**Restos óseos.-** Existen casos donde la única fuente de ADN son restos óseos, algunos casos que pueden relacionarse con la desaparición de individuos o víctimas de desastres masivos. Los restos esqueléticos son considerados muestras biológicas complejas ya que este tipo de muestras son tomadas cuando fluidos o tejido no fueron la opción por el estado de descomposición del cadáver, en otros casos los restos óseos son la única fuente de la que se puede disponer. Factores como la temperatura, humedad, pH y propiedades geoquímicas del suelo así como la presencia de microorganismos afectan la preservación del ADN en los huesos. Daños oxidativos e hidrolíticos son de los más comunes en este tipo de muestras, por tanto hay rendimientos de ADN bajos si se compara con cantidades que se pueden recuperar de tejidos (Marshall *et al.*, 2014; Zupanič *et al.*, 2015).

**Restos Calcinados.-** En muchos casos la desaparición de personas por parte del crimen organizado, crímenes de terrorismo o accidentes como choques aéreos suelen involucrar eventos en donde una persona fallecida o sus restos son expuestos al fuego, este se degrada por el efecto de las altas temperaturas presentes. Como resultado, el ADN disponible es térmicamente degradado y presente en pocas copias (Maciejewska *et al.*, 2015).

Es entonces, que por las diferentes condiciones a las que un cadáver pudo haber sido expuesto y el posible estado de degradación en el que se encuentre su ADN, que existen protocolos donde se dan recomendaciones del tipo de muestra que puede ser el óptimo de acuerdo al estado de conservación del cadáver. De modo que, cuando éste se encuentra en buen estado de conservación, se recomienda tomar sangre de cavidades internas; si está en temprano estado de putrefacción se recomiendan muestras de músculo esquelético; en estados avanzados de putrefacción se recomiendan huesos y/o cartílago; cuando se cuenta con restos carbonizados se recomienda la toma de muestra de hueso cercano a médula y/o de piezas dentales. En algunos casos se recomiendan restos biológicos existentes en hospitales (biopsias o preparaciones histológicas) y artículos de higiene personal de los que se sospecha existen remanentes biológicos vinculados con la persona desaparecida (peines, cepillos, toallas, etc.) (Albarellos, 2009; Butler, 2009).

### 3.3 Problemas Recurrentes en Genética Forense

Dadas todas las posibles condiciones por las cuales una muestra pudo haber pasado antes de llegar a un laboratorio de ADN forense, es que existen problemas recurrentes en esta área, problemas como contaminación o contar con muestras únicas y en cantidades muy pequeñas, obstáculos que regularmente son imposibles de evitar. Sin embargo, existen problemas humanos totalmente evitables, como los metodológicos, pero que también pueden ser recurrentes en el área. A continuación se especifican con más detalle.

#### 3.3.1 Contaminación

Se considera contaminación cuando en una muestra existe ADN proveniente de más de una fuente, ya sea de una misma o de diferentes especies biológicas. Este problema puede ocurrir durante o después de un evento o mientras se llevan a cabo los procesos de recolección, embalaje, envío y resguardo de las muestras. Los agentes contaminantes pueden estar presentes incluso antes de ocurrir un hecho determinado, es por ello que se toman todas las medidas necesarias para eliminarlos o reducirlos (Lincoln y Thomson, 1998; Albarellos, 2009). A continuación se detallan un poco más los tipos de contaminación posibles en esta área.

**Contaminación biológica de origen humano.-** De acuerdo al "Principio de intercambio de Locard", es de esperar que exista transferencia de elementos entre víctima, agresor y escenario del delito, de este último algunos de ellos provenientes de indicios biológicos humanos que no tienen relación alguna con los hechos que se están investigando y que en algunos casos son totalmente inevitables (ej. toallas de cocina con restos de células epiteliales de individuos ajenos al crimen, una mujer víctima de agresión sexual que con anterioridad mantuvo relaciones sexuales consentidas con otro individuo). Cuando la contaminación ocurre posterior al delito, ésta pudo ser evitable pues suele ser producida por personas ajenas a los hechos como familiares, testigos y/o personal de investigación no capacitado, es decir, por aspectos metodológicos mal ejecutados que más adelante se explican (Albarellos, 2009).

**Contaminación biológica de origen no humano.-** Ésta es generada regularmente cuando los cadáveres entran en estado de putrefacción. Lo que ocurre es que se promueve el desarrollo de microorganismos que degradan los indicios biológicos. Se ve favorecida cuando se encuentran en condiciones de humedad y altas temperaturas. En este caso, la contaminación es generada por organismos de diferentes especies, entre humano y algún o algunos otros tipos de microorganismos. Es importante mencionar que junto con la degradación del cadáver, se da la degradación del material genético. De igual manera, la putrefacción puede ser inherente a la propia muestra o provocada por aspectos metodológicos mal ejecutados (Carracedo, 2005; Albarellos, 2009).

### 3.3.2 Muestras mínimas críticas

En los laboratorios de genética forense, los métodos de extracción son destructivos, es decir, la muestra biológica que llega al laboratorio y es procesada, al final del tratamiento está confinada al análisis de ADN, la estructura tisular de donde proviene se pierde y si la muestra es pequeña es posible que se agote con un sólo ensayo, razón por la cual, cuando son tomadas muestras ya sean de referencia o problema, se procura tomar la cantidad necesaria para al menos realizar dos ensayos de modo que la muestra no se agote en un sólo ensayo. Esto con la finalidad de (1) repetir futuros ensayos si es necesario y corroborar los resultados iniciales si es que existen suspicacias o (2) realizar diferentes métodos de extracción para obtener mayores rendimientos de ADN. Sin embargo, existen casos donde únicamente es recuperado un pelo, un tejido embebido en parafina, una mancha única de sangre, una goma de mascar, un diente o en el caso de mujeres, un labial por mencionar algunos ejemplos, en los cuales prácticamente es necesario usar el total del material disponible para así tener probabilidad alguna de recuperar ADN en cantidad necesaria para el ensayo que se requiere, a este tipo de muestras se les conoce como muestras únicas y mínimas críticas por la degradación que existe en el material genético (Tanaka *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2001). A continuación se detallan algunas de éstas.

**Tejido Embebido en Parafina Fijado con Formalina (FFPET).** En ocasiones, muestras de tejido parafinado con fines inicialmente médico-patológicos, son la única fuente de ADN disponible para un análisis de genética forense. Sin embargo, la calidad del ADN extraído de este tipo de muestras complica el análisis ya que el proceso por el cual pasa el tejido para ser parafinado involucra ser sometido a largos periodos de tiempo en formaldehído ( $H_2CO$ ), principal componente de la formalina, el cual desnaturaliza el ADN y favorece el “cross-link” con proteínas. Esto se traduce en la degradación del ADN provocando un parcial o total fracaso de la PCR y generando perfiles genéticos parciales o nulos (Ananian *et al.*, 2011).

**Dientes.-** En casos como explosiones o accidentes aéreos, los restos humanos suelen fragmentarse, mezclarse y estar expuestos a altas temperaturas. Los dientes han sido reconocidos como una posible fuente de ADN dado que el esmalte dental los protege. Sin embargo, no toda la estructura del diente rinde la misma cantidad de ADN y es un tipo de muestra que para fines de identificación en odontología forense pueden implicar la destrucción del órgano dental (Gaytmenn y Sweet, 2003).

**Contenido gástrico de dípteros.-** Existen casos donde el estado avanzado de putrefacción del cadáver no permite tomar muestras biológicas del individuo, sin embargo, la fauna encontrada en él como larvas de mosca con hábitos necrófagos son la opción para recuperar ADN del cadáver del cual la larva se ha alimentado. Dicho ADN humano (H-ADN) es obtenido del contenido gástrico de las larvas posterior a su ingesta de restos del cadáver. Es importante que la extracción de ADN se haga durante las primeras 24-26hrs posteriores a la ingesta, ya que después de este periodo de tiempo,

el ADN disponible es desechado. Empero, estas extracciones resultan en la recuperación de cantidades muy pequeñas y con degradación del ADN por el proceso de predigestión por el que han pasado (Campobasso *et al.*, 2005; Wells y Stevens, 2008).

**Colillas de cigarros.-** Estudios de muestras colectadas para análisis de ADN en escenas de crimen señalan que alrededor del 63% del total de las muestras colectadas corresponden a muestras de saliva y/o colillas de cigarro (Bond y Hammond, 2008). Las colillas de cigarro son útiles en casos forenses ya que el ADN puede ser aislado de las células epiteliales que quedan remanentes en la colilla posterior a su contacto con la boca. Sin embargo, está reportado que en este tipo de muestras se suelen producir problemas durante la PCR sin éxito en la amplificación de los fragmentos de interés ya que el ADN presente en ella queda expuesta al medio ambiente y la cantidad de ADN es limitada (Watanabe *et al.*, 2003).

**Goma de mascar.-** Al igual que las colillas de cigarro, las gomas de mascar son un tipo de muestra que se colecta de manera regular en escenas de crimen, aunque no con tanta frecuencia como las colillas. El ADN de este tipo de muestras es aislado a partir de las células epiteliales que quedan remanentes en la goma de mascar posterior a su contacto con la saliva, dentro de la boca de un individuo. Sin embargo, está reportado que este tipo de muestras suelen tener cantidades de ADN muy limitadas (Bond y Hammond, 2008)

Teléfonos celulares, manchas pequeñas de sangre, latas de refresco, residuos de secreciones (como serumen o mocos), residuos de heces fecales u orina, pestañas de sobres y laminillas histológicas, son también ejemplos de muestras críticas con cantidades reducidas de ADN disponible, y que en muchos casos incluso son muestras únicas. Regularmente muestras como los teléfonos celulares o latas de refresco suelen generar perfiles con mezclas de ADN pues más de una persona ha tenido contacto con el o los objetos recuperados (Bond y Hammond, 2008).

### 3.3.3 Aspectos metodológicos

Acciones por aspectos metodológicos y de personal no capacitado resultan en un problema para el trabajo en laboratorios de ADN forense. Problemas como la contaminación de origen humano posterior a un delito, puede darse por no asegurar adecuadamente una escena de crimen y por un aseguramiento incorrecto de las muestras, por lo que una mezcla de fluidos puede ocurrir debido a un mal embalaje (ej. empaquetar muestras del sospechoso y la víctima juntas) y provocar contaminación cruzada. Asimismo, la contaminación de origen no humano puede darse por un mal empaquetamiento y/o conservación de las muestras, por ejemplo, la putrefacción se promueve cuando muestras con indicios como tejidos, ropa, telas con manchas de fluidos biológicos e hisopos con saliva o sangre son empaquetadas aún estando húmedos o cuando no son aislados para su secado correcto. Dentro de un laboratorio, es importante

tener un ambiente controlado (sin corrientes de aire), portar vestimenta adecuada y tener requerimientos mínimos necesarios como guantes y cubre bocas para evitar primeramente accidentes y posteriormente contaminaciones cruzadas del personal presente en el laboratorio (Carracedo, 2005; Albarelos, 2009; Gill, 2014).

Por otro lado, en los aspectos metodológicos también podemos incluir la capacitación y actualización de los especialistas para interpretar los resultados, es importante que conforme la tecnología avanza y se crean equipos automatizados y cada vez más sensibles, con ellos avanza la capacidad de los especialistas en tipificación de ADN para interpretar adecuadamente y consistentemente los resultados y evidencias que éstos generan (Butler, 2015).

Finalmente, debemos recalcar que todos estos aspectos pueden ser prevenidos en su totalidad si se cuenta con personal adecuadamente capacitado para dichas actividades.

### 3.4 Marcadores Genéticos

Un marcador genético o marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen o alguna sección del ADN sin función conocida. Un marcador genético es una marca en particular presente en el genoma. Cuando los marcadores genéticos sirven como medio de identificación humana para fines legales, se les llama marcadores genéticos forenses (Cummings; 2000; Butler, 2009).

#### 3.4.1. Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR's)

También conocidos como minisatélite. Son repeticiones de aproximadamente entre 8pb a 100pb de longitud y son loci cuyos alelos difieren por tener números variables de repeticiones en tándem; llegando a tener secuencias finales de hasta 1000pb. Para los años 1980's se analizaban alrededor de 4-6 loci de VNTR's para fines de identificación por ser muy polimórficos. La detección de VNTR's se hace por medio de hibridación del ADN o por PCR y los fragmentos son detectados por electroforesis. Desventajas que presentan es que son fragmentos que para muestras de ADN degradado resultan extremadamente grandes, razón por la cual, a finales de 1995 salieron del mercado y fueron sustituidos por VNTR's minisatélite o también llamados STR's (Butler, 2009; Goodwin *et al.*, 2011).

### 3.4.2 Repeticiones Cortas en Tándem (STR's)

También llamados secuencias de repetidos simples (SSR) o secuencias microsatélite. Son regiones con unidades de repetidos de entre 2pb a 7pb y son nombrados de acuerdo a la longitud del repetido, es decir, un trinucleótido son tres nucleótidos por unidad de repetición. Son los tetranucleótidos los usados para fines forenses ya que los penta y hexanucleótidos son muy escasos en el genoma y resultan fragmentos muy grandes para ser amplificados en muestras de ADN degradado. Los di y trinucleótidos son fragmentos tan cortos que promueven la amplificación de stutters (amplicones de uno o más unidades de repetición con una talla menor que un alelo real generado durante la PCR). Se sabe que el número de secuencias microsatélite en el humano es de 3% de todo el genoma, miles de polimorfismos microsatélite han sido caracterizados en humanos para fines médicos y forenses. A pesar de que el número de repetidos en cada STR puede ser altamente variable entre individuos, no todos los loci de STRs varían entre individuos. A comparación de los VNTR's, estos marcadores tienen la ventaja de tener un tamaño mucho menor (100-500pb) que hasta hace unos años los hacían aptos para trabajar muestras degradadas. Sin embargo, hoy en día son muchos los tipos de muestras donde el daño del ADN es tan grande que aun los STR's resultan fragmentos muy grandes de amplificar y generan perfiles parciales (Butler y Hill, 2012).

Estos marcadores han sido usados desde los 1990's y hasta la actualidad siguen siendo la herramienta básica de laboratorios de ADN forense a nivel mundial por la serie de ventajas que presentan; entre ellas, que un STR puede tener más de 10 alelos diferentes lo que los hace marcadores muy polimórficos e informativos para fines de identificación pues estadísticamente presentan un alto poder de discriminación. La manera en la que éstos son analizados es por medio de PCR-multiplex y electroforesis capilar. Sin embargo, la presencia de stutters es una gran desventaja cuando se tratan muestras contaminadas o con poca cantidad de ADN pues complica la determinación de alelos reales. Hoy en día existen kits comerciales con baterías de hasta 24 marcadores que se pueden llevar a cabo en una sola PCR-multiplex (Goodwin *et al.*, 2011).

### 3.4.3 Polimorfismos de un Sólo Nucleótido (SNP's)

También llamados polimorfismos de nucleótido simple. Son variaciones en la secuencia génica de una sola base y en un sitio específico del genoma; por ejemplo, cambio de una A por una T o una G por una C. Están presentes de manera abundante en el genoma lo que crea la posibilidad de poder diferenciar entre individuos, la mayoría son bialélicos y poco informativos si se comparan con los STR's ya que únicamente existen 6 posibles genotipos (A/G, C/T, A/T, C/G, T/G, A/C). El ser polimorfismos con cambios únicamente de un nucleótido, los hace aptos para el trabajo con ADN degradado. Sin embargo, muestras mezcladas son un reto para lograr ser interpretados (ej. diferenciar



acertadamente entre un heterocigoto verdadero y no la mezcla de dos homocigotos cada uno para un alelo diferente). Técnicas principales para análisis de SNP's son secuenciación, espectrofotometría de masas, pirosecuenciación, minisequenciación (SNaPshot), arreglos lineales y microarreglos o microchips. Dado que los marcadores usados a nivel mundial son los STR's, el análisis de SNP's implicaría adecuar equipo de laboratorio, personal y uso de reactivos para técnicas como secuenciación e hibridación de microchips. Finalmente, el mayor problema del uso de SNP's en el área forense es no poder amplificar simultáneamente la cantidad de SNP's estadísticamente necesarios cuando se cuenta con cantidades limitadas de ADN (Butler, 2009; Butler, 2015).

#### 3.4.4 Polimorfismos de Inserción/Delección (InDel's)

Son polimorfismos bialélicos o dialélicos donde existe la inserción o la delección de segmentos de ADN ya sea de uno o más nucleótidos. Los dos alelos posibles son referidos como *corto* para la delección y *largo* para la inserción. Son polimorfismos que han recibido menor atención que los SNP's, pero que actualmente están siendo de mucho interés por las características y ventajas que éstos presentan, entre ellas, su abundancia a lo largo del genoma ya que su densidad promedio es de 1 InDel por cada 7.2kb de ADN, representando así, entre el 16% y 25% de todos los polimorfismos humanos, es decir existen entre 1.6 y 2.5 millones de InDel's humanos de los cuales, 47% son inserciones y 53% delecciones. Sin embargo, hasta el momento solamente hay caracterizados alrededor de 500 000 InDel's, de los cuales únicamente el 40% resultan útiles para fines forenses ya que son fragmentos de entre 4pb y 100pb (Weber *et al.*, 2002; Mills *et al.*, 2006). El ser marcadores bialélicos hace que se requieran baterías grandes de marcadores para tener valores estadísticos representativos, ya que 30 InDel's, estadísticamente, equivaldrían a 15 STR's (Butler, 2011). Otras ventajas son su bajo rango de mutación comparado con los STR's; esto los hace apropiados para estudios de parentesco, los fragmentos de interés son muy pequeños puesto que pueden ser incluso de un sólo nucleótido; esto los hace aptos para el análisis de muestras de ADN degradado. A pesar de presentar algunos artefactos producto de adenilaciones incompletas, las cuales no generan conflictos en la interpretación de resultados, no presentan stutters o microvariantes, lo que los hace oportunos para el estudio de muestras mezcladas. Finalmente, los InDel's son analizados de la misma manera que los STR's por PCR-multiplex y electroforesis capilar; lo cual les da una ventaja sobre los SNP's puesto que no implica la adecuación de laboratorios actuales de ADN forense (Butler, 2009; Martín *et al.*, 2013). Todas estas características han hecho que las casas comerciales comiencen a invertir en el diseño de kits con baterías de este tipo de marcadores para fines forenses, el primero en salir a la venta fue Investigator DIPlex Kit (Qiagen, Hilden, Germany) y hasta ahora el único, kit que se pone a prueba en el presente estudio.

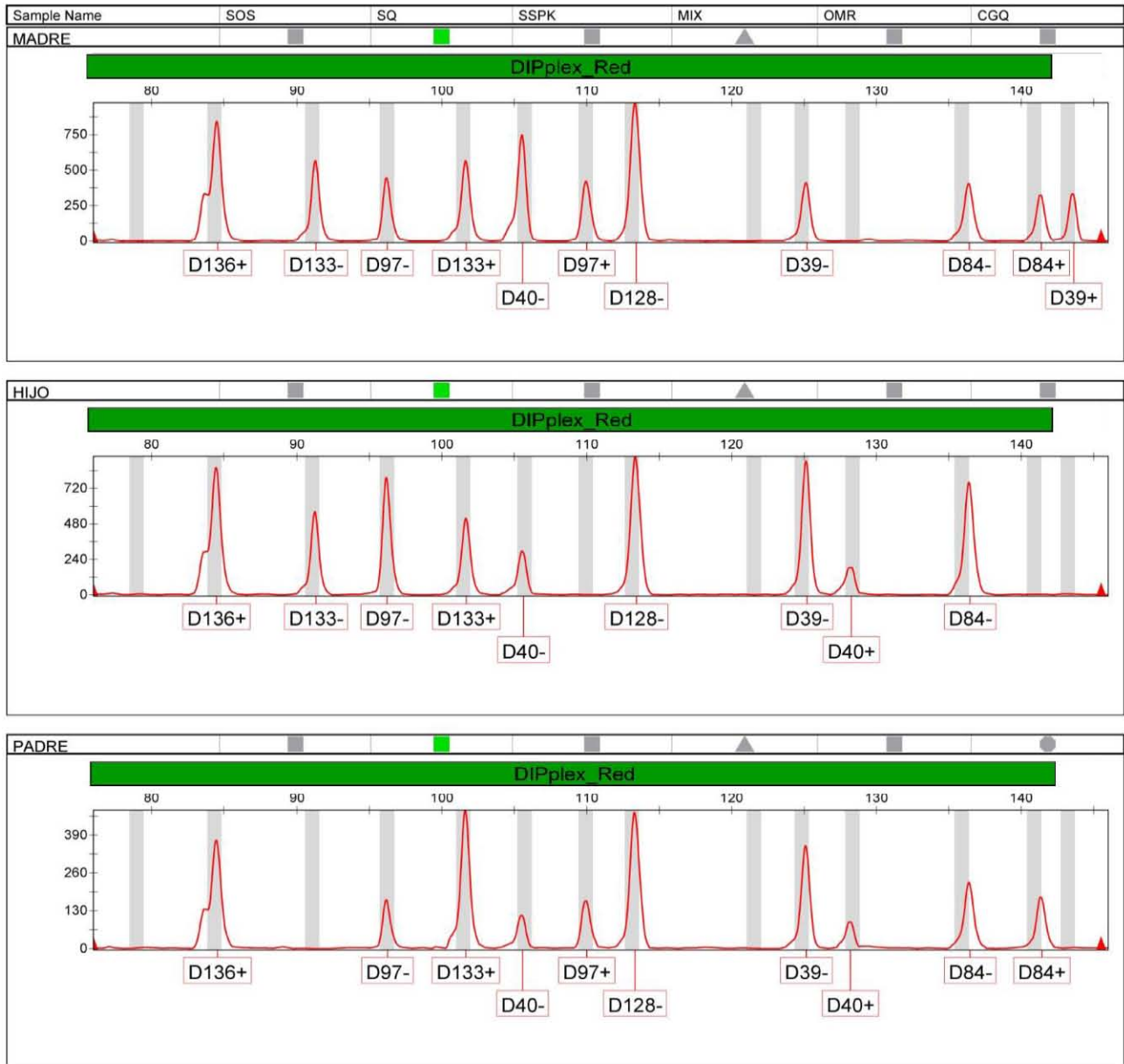
## Investigator® DIPplex Kit

Investigator® DIPplex Kit (Qiagen, Hilden, Germany) es un reciente kit comercial para el análisis de InDel's, se caracteriza por tener requerimientos de ADN mínimos que van de 0.2–0.5ng, permite la amplificación simultánea de 30 marcadores de tipo InDel con tamaños de entre 70pb - 160pb de longitud. Estos marcadores se encuentran distribuidos en 19 autosomas e incluye un marcador de amelogenina para la determinación de sexo. De manera más detallada, las características de estos 30 marcadores son mostradas en la tabla 1.

DIP locus	Localización en el cromosoma	Acceso en GenBank/ SNP ID	Motivo (+DIP)	Alelo de referencia
<b>DIPplex Amarillo</b>				
HLD83	8p22	rs2308072	AAGG	-DIP
HLD114	17p13.3	rs2307581	TCCTATTCTACT CTGAAT	-DIP
HLD48	2q11.2	rs28369942	GACTT	-DIP
HLD124	22q12.3	rs6481	GTGGA	-DIP
HLD122	21q22.11	rs8178524	GAAGTCTGAGG	-DIP
HLD125	22q11.23	rs16388	ATTGCC	-DIP
HLD64	5q12.3	rs397832668	GACAAA	+DIP
HLD81	7q21.3	rs17879936	GTAAGCATTGT	-DIP
<b>DIPplex Rojo</b>				
HLD136	22q13.1	rs16363	TGTTT	-DIP
HLD133	3p22.1	rs2067235	CAACCTGGATT	
HLD97	13q12.3	rs17238892	AGAGAAAGCTG AAG	-DIP
HLD40	1p32.3	rs146044344	GGGACAGGTGG CCACTAGGAGA	+DIP
HLD128	1q31.3	rs2307924	ATTAAATA	-DIP
HLD39	1p22.1	rs17878444	CCTAAACAAAA TGGGAT	-DIP
HLD84	8q24.12	rs3081400	CTTTC	-DIP
<b>DIPplex Azul</b>				
Amelogenin X	Xp22.1-22.3	M55418		X
Amelogenin Y	Yp11.2	M55419		Y
HLD77	7q31.1	rs1611048	TAAG	+DIP
HLD45	2q31.1	rs2307959	CACG	-DIP
HLD131	7q36.2	rs1611001	TGGGCTTATT	+DIP
HLD70	6q16.1	rs2307652	AGCA	-DIP
HLD6	16q13	rs1610905	GCAGGACTGG GCACC	-DIP
HLD111	17p11.2	rs1305047	CACA	-DIP
HLD58	5q14.1	rs1610937	AGGA	+DIP
HLD56	4q25	rs2308292	TAAGT	+DIP
<b>DIPplex Verde</b>				
HLD118	20p11.1	rs16438	CCCCA	-DIP
HLD92	11q22.2	rs201771066	GTTT	-DIP
HLD93	12q22	rs150042219	ACTTT	-DIP
HLD99	14q23.1	rs2308163	TGAT	-DIP
HLD88	9q22.32	rs8190570	CCACAAAGA	+DIP
HLD101	15q26.1	rs2307433	GTAG	-DIP
HLD67	5q33.2	rs1305056	CTACTGAC	-DIP

**Tabla 1.** Información básica de los 30 marcadores contenidos en Investigator DIPplex Kit donde **HLD:** Locus Humano del DIP, **DIP:** Polimorfismo de Inserción/Delección, **- DIP:** Delección, **+ DIP:** Inserción.

De manera gráfica, se muestra a continuación en la figura 4 cómo es que son interpretados los electroferogramas obtenidos del corrimiento electroforético y su análisis con el Software GeneMapper ID-X (Applied Biosystems) para relaciones de parentesco biológica entre madre-padre-hijo con el sistema de identificación de Investigator® DIPplex (QIAGEN).



**Fig. 4.** Alelos obtenidos para 7 marcadores de tipo InDel contenidos en el kit Investigator® DIPplex (QIAGEN) específicamente para el set de color rojo de tres individuos relacionados biológicamente, una madre biológica (*arriba*), padre biológico (*abajo*) e hijo (*medio*).

Para el marcador HLD136, se tiene para la madre y el padre el alelo de la inserción representado como D136+, para el cual ambos son homocigotos, por tanto, es un alelo obligado de herencia a su hijo en el cual de igual manera presenta homocigocidad para el alelo D136+. Dicha homocigocidad es interpretada por la presencia única del etiquetado D136+ y la ausencia del D136- así como por el tamaño del pico, al ser éste homocigoto se observa un único pico de gran tamaño.

Para el caso del HLD133 se observa a la madre heterocigota (D133+,D133-), al padre homocigoto para la inserción (D133+,D133+) y al hijo heterocigoto, resultado de la herencia del alelo de la delección (D133-) por parte de la madre y la herencia obligada del alelo de la inserción (D133+) por parte del padre. La heterocigocidad es explicada por la presencia de ambos etiquetados D133+ y D133- así como por el tamaño equivalente en los picos tanto para la delección como para la inserción.

Es así que, del perfil genético del hijo, el 50% de los alelos observados deben estar presentes en el perfil genético de la madre biológica y el 50% restante, deben estar presentes en el perfil genético del padre biológico.

#### 3.4.5 Marcadores Autosómicos

Los marcadores genéticos autosómicos, ya sean de tipo VNTR, STR, SNP o InDel, son aquellos que se encuentran en los pares cromosómicos que van del par 1 al par 22 en humanos, es decir excluyendo al cromosoma X e Y. Genotipos obtenidos a partir de marcadores en cromosomas autosómicos presentan la ventaja de ser más informativos que genotipos obtenidos de marcadores de linaje para diferenciar entre dos individuos ya que los primeros segregan independientemente generación tras generación.(Butler, 2011).

#### 3.4.6 Marcadores de Linaje

Los marcadores de linaje, ya sean de tipo VNTR, STR, SNP o InDel, son polimorfismos con herencia únicamente materna o únicamente paterna, son útiles en estudios de genealogía y linaje, que aplicado al área forense pueden ayudar a la resolución de casos con mezclas de ADN (ej. Mezclas de ADN femenino-masculino, femenino-femenino o masculino-masculino) o a la resolución de relaciones de parentesco complejas donde se carece de familiares de 1er grado (madre, padre e hijo(s)), es decir, relaciones como tío-sobrino, abuela-nieta o medias hermandades por mencionar algunos. Es entonces, que son marcadores únicos de cromosomas sexuales (X e Y). El ADN mitocondrial, como veremos más adelante, por las características que presenta es de igual manera utilizado con fines de determinación de linajes (Fung y Hu, 2008; Goodwin *et al.*, 2011).

**Cromosoma Y.-** El cromosoma Y tiene 60Mb de longitud aproximadamente y contiene únicamente 78 genes. La expresión del gen SRY (Sex-determining Region of Y chromosome, por sus siglas en inglés) localizado en este cromosoma, es el encargado de determinar el sexo masculino pues genera la diferenciación de las gónadas primitivas a testículos. Exceptuando las dos regiones *PAR1* y *PAR2* (PAR: Región Pseudoautosomal) localizadas en la región telomérica del cromosoma (fig. 5), no existe la recombinación durante la meiosis, esto quiere decir que aproximadamente un 95% del cromosoma Y es no-recombinante, específico de hombres (♂) y únicamente heredado de padres a hijos varones sin cambio alguno, exceptuando las mutaciones (Goodwin *et al.*, 2011).

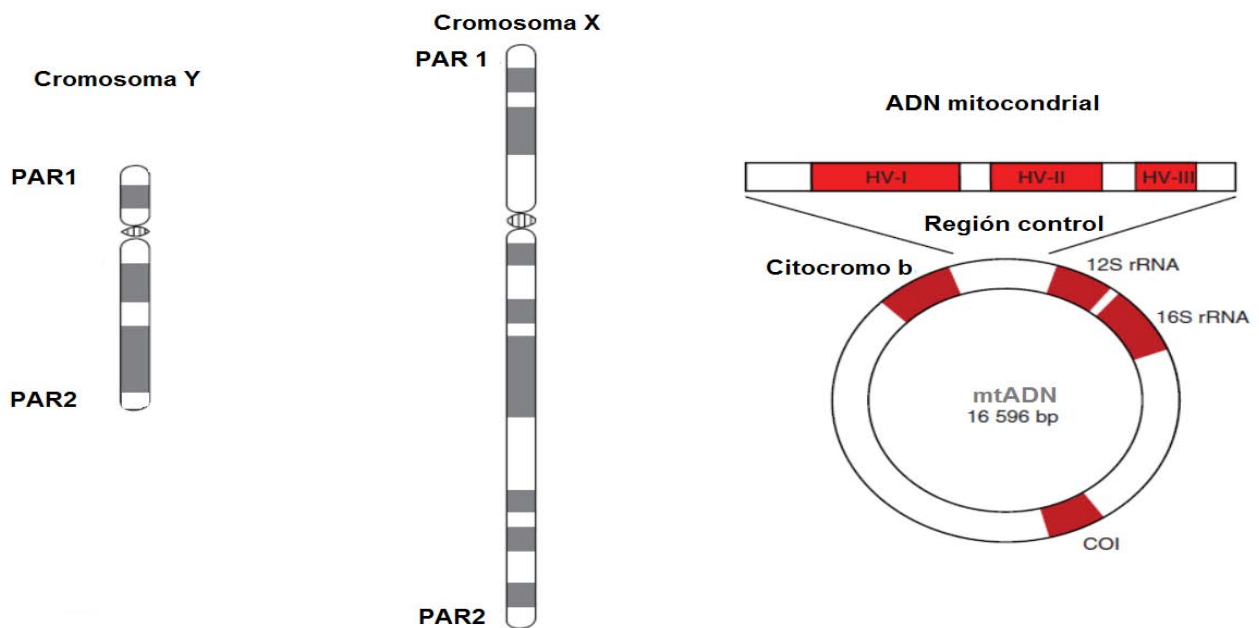
Por sus propiedades de transmisión y especificidad, marcadores localizados en la región no-recombinante del cromosoma Y (*NR*) han sido descritos, marcadores VNTR's, SNP's y de manera más abundante, STR's. Marcadores como *DYS19*, *DYS385*, *DYS389I*, *DYS389II*, *DYS390*, *DYS391*, *DYS392*, *DYS393* y *YCAII* son los más comúnmente usados. La aplicación de estos marcadores es relevante en casos donde hay mezclas de ADN masculino y femenino, casos como violaciones y donde una extracción de ADN diferencial no es posible. Sin embargo, en casos de paternidad basados únicamente en Y-STR's no logra excluir como padre a ningún masculino perteneciente a la misma línea paterna (tíos, primos, hermanos o abuelos) ya que todos presentarán el mismo haplotipo. Asimismo, es de considerarse que dependiendo de la frecuencia del haplotipo en cuestión, dentro de la población, puede ser cuestionable dicha herencia (Carracedo, 2005; Butler, 2009; Goodwin *et al.*, 2011).

**Cromosoma X.-** El cromosoma X tiene 150Mb de longitud e incluye alrededor de 1 100 genes, representa el 5% del total de material genético en mujeres (X,X) y el 2.5% en hombres (X,Y). Durante el desarrollo embrionario femenino uno de sus dos cromosomas X es silenciado ya sea el materno o el paterno, el cromosoma X silenciado es referido como *Cuerpo de Barr*, sin embargo, para fines de tipificación genética la información del X activo y el inactivo son tomados en cuenta. Se sabe que la probabilidad de transmisión de información genética de cromosoma X es del 100% de madre a hijo varón, de 50% de madre a hija y de 100% de padre a hija. Por sus propiedades de transmisión, han sido descritos marcadores VNTR's, SNP's y de manera más abundante, STR's específicos del cromosoma X. La aplicación de estos marcadores es notable en casos complejos de parentesco donde al menos se cuenta con una mujer o relaciones de medias-hermanas vía paterna por mencionar algunos (Butler, 2011).

**ADN mitocondrial.-** Las mitocondrias son organelos presentes en el citoplasma de células eucariontas y las encargadas de producir el 90% de la energía requerida por la célula. La mitocondria contiene su propio ADN (mtADN), una molécula circular de 16, 569pb que es heredado vía materna. Un óvulo contiene mil veces más mitocondrias que las presentes en un espermatozoide quien contiene entre 50-75 mitocondrias. Durante la fecundación el espermatozoide deposita su mtADN en el óvulo, pero éste lo remueve de manera activa quedando únicamente el mtADN materno (Goodwin *et al.*, 2011).

A diferencia del ADN nuclear, el mtADN tiene múltiples copias; una célula contiene muchas mitocondrias y una mitocondria contiene varias copias del genoma mitocondrial, mientras que el nuclear únicamente contiene 2 copias del ADN. Como se observa en la figura 5, en esta molécula circular, existe una región con bloques altamente conservados llamada “*región control*” y bloques con altos niveles de variación conocidos como “*región hipervariable I*” (HV-I) y “*región hipervariable II*” (HV-II). Por tanto, al ser únicamente material heredado vía materna, madres e hijos (varones y mujeres) tendrán el mismo mtADN. Este es analizado por medio de PCR seguido de una secuenciación de Sanger a diferencia de marcadores como STR’s o InDel’s que son analizados por electroforesis capilar (Carracedo, 2005).

El mtADN es de gran utilidad en casos donde la cantidad de muestra a disposición es muy poca y el ADN nuclear no resulta suficiente. De igual manera, es útil para identificación humana por línea materna cuando se carece de familiares directos. Casos históricos que ilustran su poder como medio de identificación, es el caso de la familia real Romanov la cual fue identificada por esta vía (Goodwin *et al.*, 2011; Butler, 2011).



**Fig. 5.** Estructuras de los cromosomas Y y X que muestran las regiones recombinantes PAR 1 y PAR 2 (tomada y modificada de Butler, 2009). Estructura circular del mtADN que muestra la región control que contiene a la región HV-I y la región HV-II (tomada y modificada de Goodwin *et al.*, 2011).

### 3.5 Técnicas de Análisis de Polimorfismos

El proceso de tipificación y análisis de polimorfismos en muestras ya sea de referencia o problema en genética forense, conlleva una serie de pasos en un orden determinado siendo el (1) la extracción y purificación; aquí el ADN es extraído de la muestra biológica, (2) cuantificación; se mide la cantidad de ADN que se logró extraer y purificar, (3) amplificación; se marcan y se replican regiones específicas del ADN y (4) detección y análisis; los fragmentos de ADN marcados son separados por tamaño y los alelos generados son interpretados. Es importante señalar que hoy en día la tecnología ha hecho posible procedimientos que pueden hacer omisión de los pasos (1) y (2), sin embargo, los pasos (3) y (4) son obligados (Butler, 2011).

#### 3.5.1 Extracción y Purificación de ADN

Toda muestra biológica ya sea sangre, saliva, semen, tejido, hueso o cualquier otra, presenta componentes adicionales al ADN, componentes como proteínas que en algunos casos llegan a impedir el análisis del ADN, razón por la cual, se han desarrollado métodos de extracción para eliminar estas proteínas y otros componentes celulares que interfieren con el correcto análisis del ADN. De modo que, el proceso de extracción y purificación se basa en (1) romper la membrana celular (lisis celular) para obtener el material genético y (2) desnaturalizar las proteínas y separar las moléculas de ADN del resto de material celular para entonces, poder maximizar el rendimiento de ADN (Butler, 2011; Goodwin *et al.*, 2011).

Existen diferentes métodos de extracción y el método elegido va a depender del tipo de muestra (si trata de sangre, saliva, hueso, etc.), la cantidad de muestra con la que se cuenta (si es única y mínima o es abundante), el estado de la muestra (de referencia o con grado de degradación) y en ocasiones, el costo del procedimiento (Goodwin *et al.*, 2011). A continuación se mencionan algunas de las técnicas más comúnmente empleadas.

**Extracción Orgánica o Fenol-Cloroformo (F-C).**- Fue la técnica más usada por mucho tiempo hasta los años 90's. Esta técnica involucra una serie de reactivos como Dodecilsulfato sódico (SDS), y proteinasa K los cuales son parte de los componentes de una solución amortiguadora de lisis, que en conjunto están encargados de romper las membranas celulares y desnaturalizar proteínas, la mezcla de fenol-cloroformo es agregada para separar proteínas hidrofóbicas y lípidos. El lisado es centrifugado a velocidad alta provocando que se generen dos fases, una fase orgánica y una fase acuosa, en la fase orgánica se encuentran restos de proteínas hidrofóbicas y lípidos, mientras que en la fase acuosa se encuentran restos de proteínas hidrofílicas y el ADN. El ADN de la fase acuosa es precipitado con un alcohol, generalmente etanol, el cual se elimina y el ADN que se ha precipitado se eluye en una solución amortiguadora de elusión o simplemente en agua. Esta técnica es eficiente para muestras ricas en lípidos.

Sin embargo, ocupa bastante tiempo, hace uso de químicos peligrosos para la salud y requiere que la muestra sea transferida a diferentes tubos varias veces lo que implica mayor riesgo de contaminación y bajo rendimiento de ADN (Stray y Shewale, 2010; Shewale y Liu, 2014).

**Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).**- Este método lleva a cabo la ruptura celular por disociación de lípidos, desnaturalización de proteínas y enzimas mediante el incremento de temperatura con agua en ebullición y en presencia de una resina quelante (de intercambio iónico) llamada Chelex 100. Chelex100 secuestra iones metálicos que funcionan como cofactores para las DNAsas protegiendo así, la degradación del ADN causada por DNAsas. Esta técnica reduce tiempos de trabajo (1hr aprox.), reduce costos, disminuye el riesgo para la salud, minimiza probabilidades de contaminación (no requiere cambiar la muestra por varios tubos) y es de fácil manejo. Es recomendada para análisis de muestras de sangre, tejido, cabello y huesos que se encuentran en pequeñas cantidades. Sin embargo, esta técnica no libra al ADN de contaminantes o inhibidores (Stray *et al.*, 2010).

**Extracción a base de Sílice.**- Inicialmente, este método requiere incubación de las células con buffer de lisis y proteinasa K para poder desestabilizar la membrana celular y romperla, la adición de sales caotrópicas como tiocianato de guanidina, durante o después de la lisis para desestabilizar puentes de hidrogeno, por lo que las proteínas se desnaturalizan y se favorece la unión del ADN a la sílica cuando está presente en el medio. Los remanentes celulares pueden ser removidos por centrifugación o vacío. Cuando se retiran los restos celulares, la unión ADN-sílica puede ser revertida en presencia de agua y así obtener un ADN purificado. Ventajas de este método es que no involucra agentes tóxicos y es de bajos costos. Sin embargo, requiere de cambiar la muestra varias veces de tubo lo que implica mayores riesgos de contaminación y bajo rendimiento de ADN (Stray y Shewale, 2010; Goodwin *et al.*, 2011).

**Papel FTA.**- El papel FTA (Flinders Technology Associates) fue desarrollado en los años 80's como un método de preservación del ADN. Es un papel absorbente a base de celulosa que contiene sustancias químicas encargadas de proteger el ADN de la degradación por nucleasas y del crecimiento microbiano de modo que, el ADN en el FTA es estable a temperatura ambiente y puede ser preservado por grandes periodos de tiempo. Colocar la muestra en el papel únicamente involucra la adición de una gota de sangre/saliva en el papel y dejala secar. Las células son lisadas al entrar en contacto con el papel y el ADN proveniente de leucocitos es inmovilizado en la matriz del papel. Se extrae un círculo de 2mm de diámetro aproximadamente que se coloca en un tubo para ser lavado y posteriormente purificar el ADN. Es un metodo de bajo costo y dado que actualmente se cuenta con sistemas de identificación tolerantes a inhibidores, trae como consecuencia que sea posible el procesamiento de muestras en FTA sin necesidad de ser purificadas. Esta técnica es recomendada para muestras de sangre y saliva (Stray *et al.*, 2010).



Son muchos los métodos de extracción existentes adicionales a los aquí presentados y hoy en día existe gran variedad de kits comerciales específicos para ciertos tipos de muestras. Para fines del trabajo, sólo se mencionaron los más comunes, pero podemos decir que la extracción de ADN puede darse por métodos totalmente manuales, semiautomatizados o totalmente automatizados, todo dependerá de los recursos del laboratorio y del tipo de muestra de la que se trate.

### 3.5.2 Cuantificación de ADN

Posterior a la extracción del material genético, es necesario saber la cantidad y la calidad del ADN recuperado, estos dos aspectos dependerán del tipo y estado de la muestra pues debemos recordar que pudo haber estado expuesta a diferentes ambientes y que, durante la extracción, pudo haberse recuperado ADN no humano (NH-ADN) ya sea bacteriano, fúngico o de alguna especie animal. Por tanto, es necesario realizar procesos de cuantificación, específicamente de ADN humano (H-ADN). Así que, el principal objetivo de la cuantificación es determinar la cantidad apropiada de ADN requerida para el proceso de amplificación ya que, cantidades muy grandes o muy bajas de ADN, resultan en electroferogramas con dificultades de interpretación o en algunos casos, imposibles de interpretar. La mayoría de los sistemas de identificación comerciales ocupan cantidades de entre 0.5 – 1.0 ng/ $\mu$ L de ADN (Butler, 2011; Goodwin *et al.*, 2011). Algunos procesos de cuantificación son mencionados a continuación.

**Geles de agarosa.-** Este método permite analizar cantidad y, en términos de degradación, la calidad del ADN. Una pequeña cantidad de ADN extraído es cargado en el pozo de un gel de agarosa, el cual es sumergido en un buffer de corrida, al buffer de corrida se le aplica corriente eléctrica y el ADN (carga -) migra hacia el ánodo (carga +). El gel forma una matriz porosa que genera resistencia al paso del ADN por lo que las moléculas más pequeñas avanzan más rápido que las grandes. Finalmente, el gel es teñido con bromuro de etidio el cual fluorescerá si se ha intercalado en la doble cadena de ADN y es excitado con luz ultravioleta. El ADN de buena calidad es observado como un barrido con tendencia a una banda definida de alto peso molecular, mientras que barridos no definidos con tendencia a bajos pesos moleculares indican algún grado de degradación de la muestra. La intensidad de fluorescencia en una banda es comparada con un marcador de peso molecular con bandas de tamaño y peso conocido, y es así como se estima la cantidad de ADN presente en la muestra. Sin embargo, aunque es de bajos costos, esta técnica no detecta inhibidores ni es específico de H-ADN (Lee *et al.*, 2014; Goodwin *et al.*, 2011).

**Espectofotometría Ultravioleta.-** El fundamento de esta técnica es que cualquier solución que contenga moléculas suspendidas, permite el paso de un haz de luz a través de ella en proporción inversa a la cantidad de moléculas que contenga. Tanto el ADN

como el ARN presentan la absorbancia máxima a una longitud de onda de 260nm (luz ultravioleta (UV)). La muestra es colocada en una celda de cuarzo que se introduce a un espectrofotómetro, ahí un haz de luz atraviesa la solución de ácidos nucleicos y, cuando ha pasado por la muestra, un fotodetector mide la intensidad de luz absorbida. Mientras más luz absorba la muestra, mayor será la concentración de ácidos nucleicos. La OD (densidad óptica) es la unidad de absorbancia y tiene valores específicos para cada molécula. En el caso del ADN, una OD de 1 a 260nm equivale a 50µg/ml (Salazar *et al.*, 2013). Extractos de ADN puro presentan un rango de absorbancia entre 260nm y 280nm, rangos de longitud entre 220nm y 300nm son presentados por carbohidratos (absorbancia máxima de 230nm) y proteínas (absorbancia máxima de 280nm) que se pueden co-purificar en la muestra del extracto. Inconvenientes que presenta esta técnica es que es poco sensible con cantidades pequeñas de ADN, no específica para H-ADN, no capaz de diferenciar entre ADN y ARN ni detectar degradación en el ADN; esta técnica puede llegar a tener interferencias en la absorción de la luz, generada por biomoléculas o residuos de fenol (provenientes de las soluciones de extracción, por ejemplo) que se pueden co-purifican con el ADN, razones por las cuales a pesar de ser la técnica más usada en laboratorios de biología molecular, no lo es para la comunidad forense (Goodwin *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014).

**PCR-tiempo real.**- El monitoreo de la generación de productos de PCR en el momento en el que estos se van generando, es decir, en tiempo real, es posible con esta técnica. Este proceso se basa en una PCR donde se amplifica y simultáneamente se detecta y cuantifican moléculas de ADN marcadas. Durante este proceso, sondas fluorescentes se unen a regiones específicas del ADN y florecen durante la polimerización desde el primer ciclo hasta el último, siendo su fluorescencia acumulativa. De primera instancia, este método se desarrolló usando bromuro de etidio de modo que, mientras más productos de PCR se formaban en cada ciclo, más bromuro de etidio se intercalaba en la doble cadena del ADN y se visualizaba mayor fluorescencia. Casas comerciales han desarrollado sondas con mayor eficiencia como la SYBR<sup>R</sup> Green que es económica pero no específica y sondas TaqMan, oligonucleótidos con una parte que se ancla en la terminación 5' y un *quencher* unido en la parte 3', durante la amplificación, estas sondas hibridan con regiones específicas del ADN y durante la replicación, las uniones con sonda TaqMan aumentan y con ellos, la fluorescencia que éstas emiten así que, la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de producto de PCR. Este método es altamente sensible, con especificidad para H-ADN, eficiente en la cuantificación del ADN, capaz de detectar la degradación del ADN, inhibidores, mtADN y ADN específico de masculinos. Razones por las cuales, es la técnica de cuantificación mayormente usada en el área de genética forense (Butler, 2011; Goodwin *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014).

A pesar de que existen muchos métodos más de cuantificación del ADN, aquí fueron mencionados únicamente los más comunes del área forense. Cabe resaltar que en casos de muestras de referencia, en muchas ocasiones no es necesaria la cuantificación de

éstas dado que son métodos estandarizados donde las cantidades de ADN suelen ser similares y por tanto pueden ser estimadas con cierta confianza (Lee *et al.*, 2014).

### 3.5.3 Amplificación de ADN

Como se ha venido mencionando, la mayoría de las muestras en el área forense presentan una cantidad y calidad de ADN limitada que no resulta, por si sola, suficiente para poder ser detectada y analizada, problema que suele solucionarse haciendo millones de réplicas de ese material genético. Una técnica que lleva a cabo este proceso y usada a nivel mundial en el área de la biología molecular, es la PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa encargada de hacer millones de copias de una secuencia de ADN específica en periodos de tiempo cortos (Butler, 2011).

Esta técnica fue descrita en 1985 por Kary Mullis, es un proceso enzimático fundamentado en la forma natural de replicación del ADN donde en cada ciclo celular, el ADN de una célula es duplicado. Para llevar a cabo una PCR, es necesario preparar una mezcla de componentes en cantidades y concentraciones específicas que posteriormente son colocadas en equipos conocidos como termocicladores encargados de alcanzar temperaturas de calentamiento y enfriamiento en tiempos específicos y programados (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

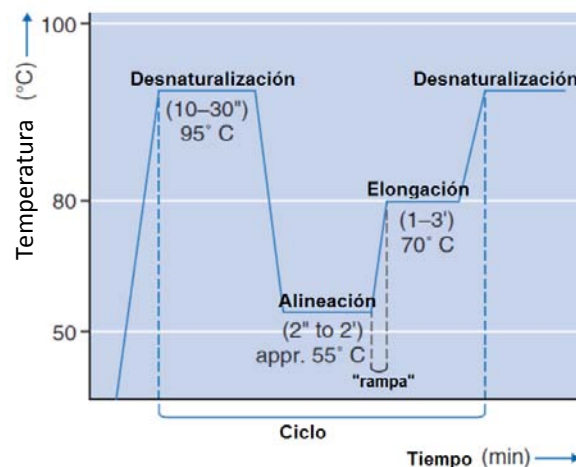
Componentes fundamentales para llevar a cabo una PCR son (1) ADN molde; es el ADN de interés purificado y cuantificado que será copiado una y otra vez, (2) dNTP's o dinucleótidos trifosfatados; proveerán los 4 nucleótidos correspondientes, (3) polimerasa; será quien irá uniendo los dNTPs en el orden correcto de acuerdo a la secuencia del ADN molde, (4) primers; son regiones cortas de ADN que flanquean y marcan la región de ADN que será copiada, éstos regularmente vienen acompañados de marcas fluorescentes que facilitan posteriormente el análisis de los productos de PCR y (5)  $Mg^{2+}$ , agua libre de nucleasas y buffer de PCR, que ayudarán a alcanzar el volumen final para la reacción y promoverán que esta se lleve a cabo exitosamente (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

La reacción comienza con la desnaturalización, la muestra es llevada a una temperatura de 94°C - 96°C (dependiendo de la polimerasa que se esté usando) para desnaturalizar la cadena de ADN (separarla en cadenas simples) y activar la polimerasa termoestable. Luego, viene la etapa de alineación, se baja la temperatura a 50°C - 65°C y los primers se alinean a su secuencia complementaria. Entonces, se lleva la temperatura a 72°C para que la polimerasa reconozca los primers y comience a sintetizar la nueva cadena de ADN, esta etapa es conocida como elongación. Estos 3 pasos anteriores en conjunto y ejemplificados en la figura 6, constituyen un ciclo. La mayoría de los protocolos forenses utilizan entre 28 y 30 ciclos generando entre 268, 435, 456 copias y 1, 073, 741, 824 copias de ADN respectivamente, pues es un proceso con crecimiento de tipo exponencial. Posterior a la amplificación, los productos de PCR son referidos como *amplicones* (Butler, 2009; Goodwin *et al.*, 2011).

Hoy en día la PCR permite amplificar más de una región del ADN al mismo tiempo, esto es mediante una variante a la técnica llamada PCR-multiplex. Para esto, es importante que los juegos de primers de cada región compartan ciertas características como temperaturas de alineación, pero al mismo tiempo, sean específicas con las regiones en que habrán de hibridar con secuencias completamente diferentes entre cada uno de ellos. Por eso es importante saber elegirlos, para evitar la formación de dímeros de primers (uniones primer-primer en vez de primer-ADN) para que la PCR-multiplex sea exitoso (Butler, 2009).

Existen compuestos contaminantes capaces de inhibir la PCR interactuando directamente ya sea con el ADN, los primers o con la polimerasa, incluso afectando el pH. Durante la extracción es probable que compuestos o moléculas no deseables copurifiquen con el ADN, muchos agentes suelen ser inocuos, pero algunos otros, capaces de inhibir reacciones enzimáticas. La presencia de inhibidores resulta en bajos rendimientos de productos de PCR y en ocasiones, nulos. Este problema muchas veces puede solucionarse haciendo diluciones del extracto de ADN, incrementando cantidades de polimerasa o agregando a las reacciones coadyuvantes que favorezcan la amplificación (ej. albumina de suero bovino) (Bessetti, 2007; Butler, 2011).

Ventajas que esta técnica presenta son: (1) cantidades mínimas de ADN, aunque en muestras forenses, ocasionalmente cantidades como 1ng de ADN no logran ser recuperadas, (2) replicar varias secuencias de interés al mismo tiempo con un PCR-multiplex y (4) amplificar únicamente H-ADN discriminando NH-ADN por la especificidad de los primers. Sin embargo, también presenta limitaciones que son ajenas a la técnica como (1) puede ser impedida por la presencia de inhibidores en la reacción y (2) en caso de haber presencia de dos fuentes diferentes de H-ADN, la PCR no discrimina entre una y otra y ambas son amplificadas (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008; Butler, 2009; Goodwin *et al.*, 2011).



**Fig. 6.** Perfil de temperaturas y tiempos típicos en los tres pasos de un ciclo en una PCR. Desnaturalización, alineación y elongación (tomada y modificada de Pelt-Verkuil, Belkum, and Hays, 2008).

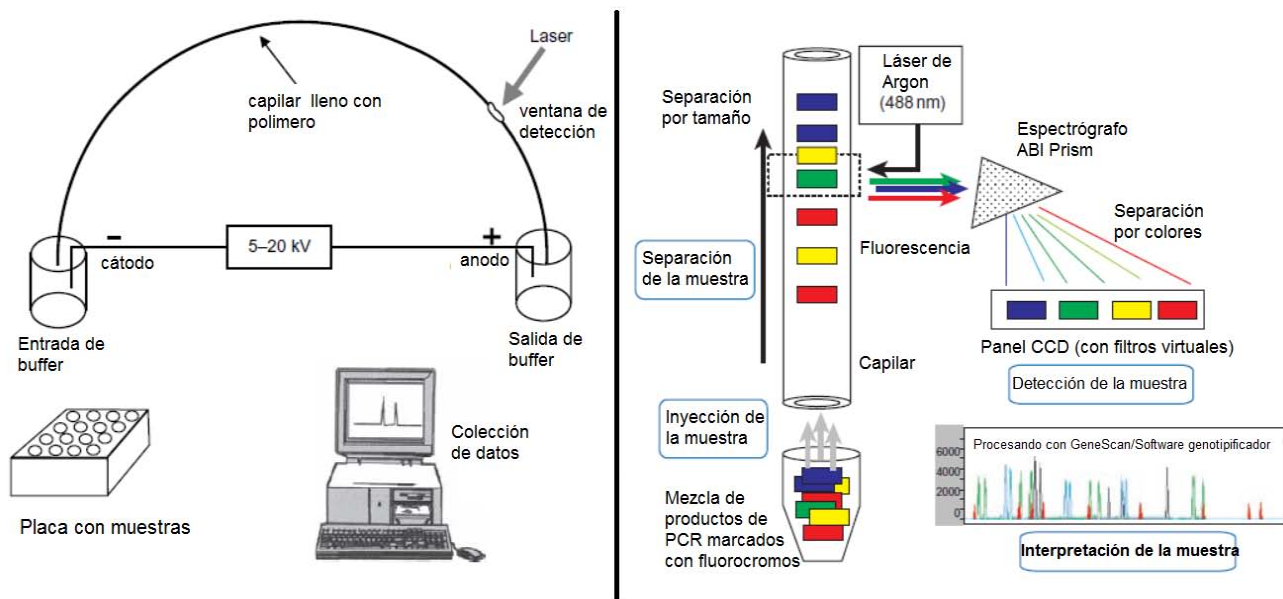
### 3.5.4 Detección y Análisis de ADN

Posterior a la amplificación de los polimorfismos por medio de la PCR, la longitud de los productos debe ser detectada y medida de manera precisa. A continuación se mencionan los métodos más comunes para este fin.

**Secuenciación.-** Para llevar a cabo la secuenciación de un fragmento de ADN determinado se necesita de (1) ADN molde que es aquel que se quiere secuenciar, (2) el *primer* complementario a la cadena de ADN molde, (3) enzima polimerasa, (4) deoxinucleotidos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) y (5) dideoxinucleotidos (ddATP, ddGTP, ddTTP y ddCTP) los cuales funcionan como terminadores ya que carecen del grupo 3'-OH presente en los dNTP's, éstos están marcados con fluoróforos y son reconocidos por el secuenciador de ADN. La reacción comienza calentando la mezcla (~96°C) y desnaturalizando la cadena de ADN molde, la temperatura disminuye (~50°C) y el *primer* se une a su secuencia complementaria del ADN molde, nuevamente la temperatura aumenta (~60°C) y la polimerasa reconoce y se une a la secuencia de ADN para comenzar a sintetizar la nueva cadena de ADN. Dado que la enzima polimerasa no logra distinguir entre dNTP's y ddNTP's va incorporando dNTP's a la nueva cadena que se va creando pero, en el momento en el que une un ddNTP la síntesis se detiene. Ya que en el tubo de mezcla hay billones de moléculas de ADN presentes, las cadenas sintetizadas pueden terminar en cualquier posición generando así, colecciones de cadenas de ADN de diferentes longitudes todas terminadas con un ddNTP fluorescente. La mezcla se monta en un equipo de electroforesis capilar donde las cadenas marcadas son corridas a través del capilar y diferenciadas por su tamaño, las cadenas más pequeñas son las primeras en pasar y ser detectadas por la emisión del color del ddNTP con el que han sido marcadas. Un software específico interpreta los datos generados en un electroferograma; picos de colores que representan un nucleótido por medio de una letra (G, C, A o T) en la secuencia y es así como finalmente se obtiene la secuencia completa, nucleótido por nucleótido, del fragmento de ADN de interés (De Necochea y Canul, 2004). Limitaciones que este método presenta son las grandes cantidades de ADN requeridas, los altos costos del procedimiento y lo laborioso que éste resulta para la interpretación de los resultados por lo que no es muy usado en el área forense (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

**Electroforesis Capilar (EC).-** A nivel mundial, la electroforesis capilar es el método más usado en laboratorios de ADN forense para la detección de polimorfismos (principalmente de STR's). Para llevarla a cabo es necesario poseer un analizador genético el cual contará con los siguientes elementos básicos: capilares de vidrio, viales de buffer, electrodos conectados a una fuente de energía de alto voltaje, un láser, un detector de fluorescencia, una placa que contenga las muestras y una computadora que controle la inyección y detección de las muestras (figura 7, izq.). A diferencia de la electroforesis en geles de agarosa donde se usa una matriz de gel, la EC usa un polímero que genera resistencia al paso del ADN. Las moléculas de ADN cargadas (-) pasan con dirección al ánodo (+) de modo que, cadenas de ADN largas se mueven más lentamente

a través del capilar que cadenas de ADN pequeñas y es así, como las moléculas son separadas de acuerdo a su tamaño (número en pares de bases). La detección de la muestra se da automáticamente por el equipo midiendo el lapso de tiempo en el que es inyectada y detectada la fluorescencia de las moléculas con el láser. Como se ilustra en la figura 7 (der.), la luz del láser incide en una ventana sobre el revestimiento del capilar, a esta ventana llegan primero las moléculas de ADN pequeñas seguidas de las más grandes. Los fluorocromos presentes en el ADN son excitados generando una señal fluorescente que es detectada por una celda fotosensible. Los datos de la separación son mostrados como una función de intensidad relativa de fluorescencia observada, emitida por los colores que pasan por el detector, lo cual se traduce en una señal que es expresada gráficamente y que es llamada electroferograma (Butler, 2011).



**Fig. 7.** Muestra un esquema de los instrumentos necesarios en electroforesis capilar usados para el análisis de ADN (*izq.*). Ilustración que esquematiza la separación y detección de polimorfismos en un solo capilar (*der.*). (tomadas y modificadas de Butler, 2011).

### 3.6 Genética de Poblaciones

La genética de poblaciones tiene por objetivo analizar la distribución y frecuencia de las variantes alélicas de una población para explicar fenómenos evolutivos como el efecto de las mutaciones, la selección natural, la migración y la deriva génica es decir, ve los cambios que se van dando generacionalmente a nivel poblacional. Todos estos cambios son estudiados en periodos de tiempo cortos (pocas generaciones) y su objeto de estudio es la variación genética (aquellas diferencias encontradas entre individuos dentro de un grupo o población y entre grupos o poblaciones); siendo entonces que, la genética de poblaciones brinda la base matemática para las teorías evolutivas (Martínez, 1999; Relethford, 2012).

Hoy en día existe conflicto en dar una definición única de *población* pues muchas de éstas resultan incompletas y/o ambiguas pues pueden tener diversas interpretaciones. La definición de *población* que se presenta a continuación es concreta e involucra los puntos importantes para fines del presente trabajo, fue dada por Hedrick en 2005 y define una población como “*Un grupo de individuos que están juntos en un mismo tiempo y espacio y que procrean entre ellos*” (Hedrick, 2005).

En genética de poblaciones humanas, a diferencia de otras especies, los fenómenos antropológicos juegan un papel muy importante pues ocurren eventos como la endogamia (emparejarse con parientes cercanos biológicamente) y el emparejamiento selectivo (los individuos seleccionan a sus parejas con características específicas, no es azaroso) que afectan de manera importante el comportamiento de las poblaciones (Relethford, 2012).

La importancia del estudio de la genética de las poblaciones es porque la unidad evolutiva no es el individuo, sino la población, ya que el genotipo de un individuo no cambia a lo largo de la vida. En cambio, la constitución genética de una población puede cambiar y evolucionar de generación en generación (Martínez, 1999).

Existen muchos modelos de genética poblacional usados para interpretar un perfil de ADN. Basados en estos modelos, es que se puede ver qué tan discriminativo puede ser un perfil genético o la probabilidad que éste tiene de aparecer más de una vez en la población. Sin embargo, al igual que otros modelos estadísticos, los modelos genéticos trabajan con ciertas restricciones, de modo tal, que los datos colectados en una escena de crimen o en un laboratorio, tendrán significancia hasta que sean analizados estadísticamente. Existen ciertos parámetros estadísticos forenses básicos para soportar matemáticamente los resultados (Fung y Hu, 2008). A continuación se presentan dichos parámetros.

### 3.6.1 Frecuencias Alélicas

La frecuencia alélica refiere a la cantidad de veces o a la frecuencia con la que aparece un alelo determinado en una población. De modo que, si para un locus determinado se cuenta con dos alelos **p** y **q**, la frecuencia de **p** está determinada por la siguiente ecuación: (Buckleton *et al.*, 2005; Relethford, 2012).

$$\text{frec. alélica de } \mathbf{p} = \frac{\text{Número de veces que aparece el alelo } \mathbf{p} \text{ en la población}}{\text{Número total de alelos en la población}}$$

Lo mismo ocurre para el cálculo de la frecuencia del alelo **q**. Obteniendo finalmente que:

$$\mathbf{p} + \mathbf{q} = 1$$

### 3.6.2 Frecuencias Genotípicas

La frecuencia genotípica refiere a la cantidad de veces o la frecuencia con la que aparece un genotipo determinado en una población, de modo que, si para un locus determinado hay dos alelos posibles **p** y **q** los genotipos posibles son **(p,p)**, **(q,p)**, **(p,q)** y **(q,q)**. Calculando entonces la frecuencia de cada genotipo con la siguiente ecuación: (Buckleton *et al.*, 2005; Relethford, 2012).

$$\text{Frec. del genotipo } (p, p) = \frac{\text{Número de individuos en la población con el genotipo } (p, p)}{\text{Número total de individuos en la población}}$$

Lo mismo ocurre para los genotipos **(p,q)**, **(q,p)** y **(q,q)**.

### 3.6.3 Ley de Equilibrio de Hardy-Weinberg

Esta ley es una expresión matemática que describe las frecuencias genotípicas esperadas para una generación nueva, asume poblaciones sin fuerzas evolutivas, finitas y emparejamientos al azar. Extendiendo así, la idea del cuadro de Punnet a poblaciones y no únicamente a individuos. Es así que, refiere la relación entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas en un locus determinado y en esencia, establece la independencia entre alelos para un locus. Esta ley está determinada por una ecuación que parte de un locus con dos alelos **a** y **b** con frecuencias **p** y **q** respectivamente. La ecuación de Hardy y Weinber predicen las frecuencias genotípicas para estos alelos **a** y **b** en la siguiente generación como: frecuencia esperada para el genotipo **aa** = **p<sup>2</sup>**, para el genotipo **ab** = **2pq** y para el genotipo **bb**= **q<sup>2</sup>**. Estas frecuencias están determinados por la ecuación: (Brenner, 1990; Relethford, 2012).

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

Teniendo finalmente que en una población bajo equilibrio de H-W, las frecuencias genotípicas y alélicas permanecerán constantes de una generación a otra a partir de las frecuencias observadas. Genéticamente, nos dice que los dos alelos, de un genotipo en un locus determinado, son estadísticamente independientes uno del otro, permitiendo el cálculo de otros parámetros estadísticos. En el área forense, permite el cálculo de



parámetros como Probabilidad de Coincidencia, Poder de Exclusión y de Discriminación (Brenner, 1990; Fung y Hu, 2008; Relethford, 2012).

#### 3.6.4 Heterocigocidad Observada y Esperada

La heterocigocidad refiere a la proporción existente de genotipos heterocigotos que, contemplando un locus determinado con dos alelos  $p$  y  $q$ , los genotipos heterocigotos posibles son  $(p,q)$  y  $(q,p)$ . La heterocigocidad observada ( $H_o$ ) es la frecuencia con la que aparecen genotipos heterocigotos en la población y es obtenida con la siguiente ecuación: (Fung y Hu, 2008; Relethford, 2012).

$$H_o = \frac{\text{Número de individuos con genotipos heterocigotos en la población}}{\text{Número total de individuos en la población}}$$

La heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) es una estimación de proporción de individuos heterocigotos esperados cuando la población está bajo equilibrio de H-W y es obtenida con la siguiente ecuación: (Fung y Hu, 2008; Relethford, 2012).

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Donde:

$p_i$  : es la frecuencia de cada alelo posible para ese marcador

#### 3.6.5 Poder de Discriminación

El Poder de Discriminación (PD) refiere la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar en una población, puedan diferenciarse genéticamente mediante el análisis de un marcador o un conjunto de marcadores y está determinado por la fórmula: (Brenner, 1990; Fung y Hu, 2008).

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

Donde:

$G_i$ : Es la fracción de muestras con el genotipo "i"

Cuando se considera un total de  $K$  loci, se debe calcular la probabilidad de discriminación total o también llamado Poder Combinado de Discriminación (PCD) dado por la siguiente fórmula: (Fung y Hu, 2008)

$$PCD = 1 - \prod_{l=1}^k (1 - PD_l)$$

Donde:

$PD_l$ : Probabilidad de discriminación del locus  $l$ .

### 3.6.6 Poder de Exclusión

El Poder de Exclusión (PE) calcula la probabilidad de poder excluir a alguien de un determinado hecho. Por tanto, se define como la probabilidad de que una persona tomada al azar de una población, sea excluida como la donadora de una determinada muestra de ADN. Por ejemplo, excluirse de la paternidad de un niño o excluirse de ser contribuyente en un crimen. Este parámetro estadístico es calculado con la siguiente fórmula: (Brenner, 1990; Buckleton *et al.*, 2005).

$$PE = h^2(1 - (2 * h) * H^2)$$

Donde:

$h$ : Heterocigotos

$H$ : Homocigotos

Cuando se considera un total de  $K$  loci, se debe calcular la probabilidad de exclusión total o también llamado Poder Combinado de Exclusión (PCE) dado por la siguiente fórmula: (Fung and Hu, 2008)

$$PCE = 1 - \prod_{l=1}^k (1 - EP_l)$$

Donde:

$EP_i$ : Probabilidad de exclusión del locus  $l$ .

Por tanto, será la probabilidad de que un sistema genético específico proporcione evidencias para excluir a un probable responsable.

### 3.6.7 Poder de Coincidencia

El Poder de Coincidencia (PC) determina la probabilidad de que dos personas tomadas al azar de la población compartan un mismo genotipo para un locus determinado y se calcula a partir de la siguiente ecuación:(Fung and Hu, 2008).

$$PC = \sum_{i=1}^k P_i^2$$

Donde:

$P_i$ : fracción de muestras con el genotipo  $i$

Cuando se considera un total de  $K$  loci, se debe calcular la probabilidad de coincidencia total o Poder Combinado de Coincidencia (PCC) dado por la siguiente fórmula:

$$PCC = \prod_{l=1}^n$$

Este valor será interpretado como la probabilidad de que el perfil genético  $X$  aparezca en la población o la probabilidad de que dos personas tomadas al azar compartan el mismo perfil genético  $X$ .

### 3.7 Población de la Ciudad de México

La Ciudad de México o Distrito Federal (DF), capital de los Estados Unidos Mexicanos, consta de 16 delegaciones y representa el 0.1% del territorio nacional. El último registro reportado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) corresponde al año 2010 y reporta una cantidad de 8, 851, 080, mientras que la Encuesta Intercensal 2015 del Distrito Federal indica que la población total en la Ciudad de México es de 8, 918, 653 habitantes, equivalente al 7.5 % de la población total de México. El DF es la segunda

entidad federativa con mayor número de habitantes sólo después del Estado de México. (Sitio electrónico INEGI, 2015).

La migración (cambio de residencia de una o varias personas ya sea de manera temporal o definitiva) regularmente ocurre con la intención de mejorar la situación económica y desarrollo personal y familiar de quienes migran. Este aspecto hace del Distrito Federal y, en general de México, una población muy heterogénea genéticamente hablando, pues promueve el flujo génico ya sea entre estados dentro del mismo país o entre países. En los datos de migración de la encuesta intercensal 2015, el DF ocupa el 5to lugar en migración interna, es decir, habitantes que salieron del DF para radicar en otra entidad dentro del mismo país, siendo el estado de Nuevo León el número uno. Sin embargo, también es una de las principales entidades con mayor cantidad de inmigrantes, pues para el 2010 llegaron 239,125 personas procedentes primeramente del Estado de México, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Guerrero en orden descendente. En cuanto a la migración internacional, 66 de cada 100 migrantes que salen del DF tienen como destino los Estados Unidos de América. De igual manera, hay reportado que hasta el año 2015, 1, 007, 063 individuos fueron nacidos en otro país pero se encuentran residiendo en México y es el DF el 4to lugar con casi 20, 000 individuos extranjeros residentes en él (Sitio electrónico INEGI, 2015).

La población mexicana se considera un mosaico multicultural y genético conformado por 56 grupos étnicos denominados nativos americanos o amerindios, indígenas americanos que descienden de grupos de recolectores y cazadores de origen siberiano que migraron a América por el estrecho de Bering durante la glaciación Würm, alcanzando niveles culturales tan altos en Mesoamérica como los mixtecas, toltecas o mayas y actualmente son Guatemala y Bolivia los países que menos mezclas raciales han sufrido. Fue a partir de 1492 con la llegada de Cristóbal Colón a América (colonización europea de América) que ocurrieron los grandes movimientos migratorios que tuvieron impacto en la población mexicana, reconocida desde entonces como un país con habitantes mestizos, es decir individuos producto de un proceso de mezcla racial entre españoles e indígenas. Es importante mencionar que los procesos de mestizaje han ocurrido desde mucho antes de la llegada de los europeos, y se han sucedido en todo el territorio americano, desde los actuales territorios de Alaska hasta la Patagonia, sin embargo estos procesos de mestizaje ocurridos durante la llegada de los españoles fueron tan abundantes que tuvieron impacto evolutivo, es así que, a pesar de que los procesos migratorios y de mestizaje ocurren en todo momento no son de manera masiva y por tanto, no tienen impacto evolutivo alguno (Henderson y Olasiji, 1994).

## 4. OBJETIVOS

### **General.**

Caracterizar la diversidad genética de la población del Distrito Federal, México para 30 marcadores InDel's contenidos en el kit comercial Investigator® DIPplex, Qiagen así como su aplicación para fines forenses.

### **Particulares.**

- a) Estandarización de la técnica para muestras de referencia con fines forenses haciendo uso del kit comercial Investigator® DIPplex (QIAGEN).
- b) Obtener frecuencias alélicas de los 30 marcadores InDel's contenidos en el kit Investigator® DIPplex (QIAGEN) para población del Distrito Federal, México y comparar con los datos generados por Martínez-Cortés et al., 2015(b) para determinar si existen diferencias significativas.
- c) Determinar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.
- d) Calcular parámetros estadísticos de interés forense como: Heterocigosidad observada y esperada, Poder de discriminación, Poder de exclusión y Poder de coincidencia por marcador y de la prueba total.
- e) Complementar la base de datos con la que cuenta actualmente el Laboratorio de Genética del INCIFO, de modo que, los datos generados, puedan aplicarse para investigación en tema de genética de poblaciones y futuras confrontas de perfiles genéticos para identificación humana y pruebas de parentesco.
- f) Utilizar los 30 marcadores InDel's para el análisis de muestras críticas como bloques de tejido parafinado y restos óseos y obtener valores estadísticos que permitan aumentar la información disponible para procedimientos de identificación de individuos y análisis de evidencias.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Con los avances recientes en el área de genética forense se han desarrollado paneles de genotipificación con marcadores aptos para muestras de ADN degradado, situación común en cuerpos y restos humanos con estado avanzado de putrefacción, restos calcinados, restos óseos y bloques parafinados por mencionar algunos. Muestras con las cuales marcadores como los STR's (los más utilizados a nivel mundial en laboratorios forenses) presentan dificultades. Los InDel's son marcadores genéticos que se cree son buenos candidatos para su uso en muestras degradadas por las características que éstos presentan. Es desde el año 2002 que se ha prestado atención a estos marcadores (con fines médicos) con los trabajos descriptivos de Weber *et al.*, 2002 y Mills *et al.*, 2006 su importancia en el área forense se ha reflejado a nivel mundial con estudios poblacionales reportados por Neuvonen *et al.*, 2012 para población Soamali, Li *et al.*, 2011, para población china, Martín *et al.*, 2013 para población española y dos únicos y recientes trabajos para población mexicana; el primero de Martínez-Cortés *et al.*, 2015 donde los 30 InDel's propuestos en el presente trabajo, no están incluidos en su set de marcadores y donde su número muestral consiste en  $n=61$  para población del Distrito Federal, lo cual no es estadísticamente representativo de dicha población, adicional a esto, no se pone a prueba esta batería de marcadores con muestras problema. El segundo trabajo es igualmente de Martínez-Cortés *et al.*, 2015b, en éste se estudia la batería de marcadores aquí propuesta para la población de México, sin embargo, la  $n$  muestral para población del Distrito Federal es de 67 individuos y es hasta que se realizan correcciones estadísticas, que logran tener los 30 marcadores bajo equilibrio de Hardy-Weiberg por tanto, las frecuencias allí reportadas para población del Distrito Federal podrían no ser las más indicadas para los estudios estadísticos requeridos y de igual manera no ponen a prueba estos marcadores con muestras problema; siendo entonces, todo lo anterior mencionado, las razones que justifican el llevar a cabo el presente trabajo.

## 6. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1 Muestras de Referencia

#### 6.1.1 Muestra Poblacional

Se seleccionaron 150 individuos no relacionados biológicamente, todos nacidos en el Distrito Federal, México. Cada participante recibió una hoja de información y firmó un formato de consentimiento informado de acuerdo a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (Anexo 1) con el que autorizó se le hiciera la toma de muestra con la única finalidad de utilizarla para el desarrollo de la presente investigación.

#### 6.1.2 Muestras Biológicas

A cada uno de los individuos participantes, se le tomó una muestra de sangre o saliva de acuerdo a lo permitido por el participante en el formato de consentimiento.

En el caso de la sangre, se obtuvieron entre 5 y 6 gotas por medio de una punción en el dedo anular de la mano izquierda del individuo haciendo uso de lancetas estériles y desechables. Una vez hecha la punción, las gotas de sangre fueron colocadas en tarjeta FTA (Whatman®) la cual previamente fue etiquetada con el nombre del donante, la fecha de la toma de muestra y le fue asignado un código de identificación a la muestra para control interno (*número consecutivo (1,2,3...)* / *s (saliva)* o *fta (sangre)* / *15 (año 2015)*). La tarjeta con la muestra se aisló para dejarla secar a temperatura ambiente.

Para el caso de la saliva, se realizó un arrastre de células de mucosa bucal con ayuda de un citocepillo (Whatman®), que al igual que la tarjeta FTA, fue debidamente etiquetada con los datos antes mencionados. Una vez tomada la muestra, el citocepillo se dejó secar a temperatura ambiente para poder ser trabajada posteriormente.

#### 6.1.3 Extracción y Purificación de ADN

**Sangre.-** La extracción del ADN se obtuvo a partir de un círculo con diámetro de 1.2 mm extraído a partir de las manchas montadas en la tarjeta FTA. El círculo se procesó con el kit comercial para FTA (Whatman®) siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (Sitio electrónico FTA technology, 2015).

**Saliva.-** La extracción de ADN se realizó a partir de la mitad del citocepillo, con la finalidad de no agotar la muestra en caso de tener que repetirla. Ese 50% de muestra se procesó con el protocolo mostrado en el Anexo 2.

Como control positivo, se trabajó el *ADN control* incluido en el kit Investigator® DIPplex (QIAGEN). Los controles negativos fueron (1) un círculo obtenido de una tarjeta FTA sin sangre (2) medio citocepillo sin arrastre de células bucales.

#### 6.1.4 Amplificación y Genotipificación de ADN

Ambos tipos de muestras, tanto saliva como sangre no fueron cuantificadas dado que son muestras de referencia y la cantidad de ADN contenida en éstas ya se encuentra estandarizada dentro del laboratorio ( $\pm 6$ ng de ADN / un círculo FTA® de 1.2mm de diámetro y  $\pm 18$ ng de ADN / un citocepillo)

**Amplificación.**- Se realizó por medio de una PCR multiplex de punto final en un equipo de termociclado 9700 (Applied Biosystems) con el kit Investigator® DIPplex (QIAGEN). Las cantidades de los reactivos que se utilizaron son mostradas en el Anexo 3 y las condiciones de termociclado fueron las siguientes:

Temperatura	Tiempo	
94°C	4 min	
94°C	30 seg	
61°C	120 seg	
72°C	75 seg	30 ciclos
68°C	60 min	
10°C	$\infty$	

Los tubos control se trabajaron bajo las mismas condiciones que el resto de las muestras.

**Genotipificación.**- Los productos de PCR (150 muestras de individuos y los controles positivos y negativos) se corrieron por electroforesis capilar en un equipo 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), con el kit Investigator® DIPplex (QIAGEN). Las cantidades de los reactivos utilizados se especifican en el Anexo 4. El análisis de resultados partió de la obtención de electroferogramas con el software GeneMapper ID-X (Applied Biosystems).

#### 6.1.5 Análisis de Datos

Los resultados de los genotipos fueron vaciados a una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Office) y analizados para obtener los siguientes parámetros estadísticos forenses: frecuencias alélicas y genotípicas, heterocigosidad observada y esperada, poder de discriminación, poder de exclusión y poder de coincidencia con ayuda del Software PowerStats V1.2. El equilibrio de Hardy-Weinberg fue determinado con ayuda del programa Finetti del Instituto de Genética Humana del Helmholtz Center Munich (Sitio electrónico Strom y Wienker, 2015).



## 6.2 Muestras Problema

### 6.2.1 Bloques de tejido parafinado embebidos en formol

Se dispuso de tres bloques de tejido parafinado que se etiquetaron de acuerdo al siguiente código: *número de muestra (número consecutivo) / año en que fue sometida a formol y parafinada (10: 2010 y 14:2014)*. En la siguiente tabla se refiere el tipo de tejido de cada muestra.

Muestra	Tejido
1/10	Corazón
2/10	Hígado
3/14	Músculo

Para aislar el tejido de la parafina se siguieron las instrucciones contenidas en el kit QIAamp® DNA FFPE Tissue (Sitio electrónico QIAGEN, 2010).

**Extracción y purificación de ADN.-** Las muestras fueron procesadas mediante el kit de extracción PrepFiler Express BTA™ según las indicaciones del proveedor, mediante el equipo AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems) (Sitio electrónico Applied Biosystems, 2010a)

**Cuantificación.-** El ADN purificado se cuantificó con la técnica de PCR tiempo real en un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) con el kit Quantifiler® Duo DNA Quantification (Applied Biosystems) siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante (Sitio electrónico Applied Biosystems, 2010b)

**Amplificación.-** Se realizó con el mismo método ya antes descrito para muestras de referencia. Sin embargo, de acuerdo a la cantidad de ADN obtenida en la cuantificación, los ciclos de PCR para cada muestra fueron:

Muestra	Tejido	Número de ciclos
1/10	Corazón	30
2/10	Hígado	31
3/14	Músculo	30

**Genotipificación.-** Se realizó con el mismo método ya antes descrito para muestras de referencia.

**Análisis de datos.-** Con ayuda de una hoja de cálculo de Excel se calculó la frecuencia del genotipo de cada muestra así como el índice poblacional expresado como 1 en ... (número de habitantes).

### 6.2.2 Restos óseos

Se dispuso de dos muestras de restos óseos que se etiquetaron de acuerdo al siguiente código: *tipo de muestra (H: hueso) / número de muestra (número consecutivo)*. En la siguiente tabla se refieren las muestras trabajadas y características que estas presentaban.

Muestra	Resto Óseo	Características de la muestra
H/1	Costilla	Estado avanzado de putrefacción
H/2	Costilla	Exposición al fuego

Ambas muestras fueron lavadas con detergente comercial y agua corriente, esto con la finalidad de retirar restos de tejido que pudieran estar adheridos al hueso. Una vez limpios, se dejaron secar.

**Extracción y purificación de ADN.-** Las muestras fueron procesadas mediante el kit de extracción PrepFiler Express BTA™ según las indicaciones del proveedor, mediante equipo AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (Applied Biosystems)

**Cuantificación.-** Se realizó con el mismo método ya antes mencionado para muestras problema de bloques de tejido parafinado embebidos en formol.

**Amplificación.-** Se realizó con el mismo método ya antes descrito para muestras de referencia. Sin embargo, de acuerdo a la cantidad de ADN obtenida en la cuantificación, los ciclos de PCR fueron:

Muestra	Número de ciclos
H/1	31
H/2	31

**Genotipificación.-** Se realizó con el mismo método ya antes descrito para muestras de referencia.

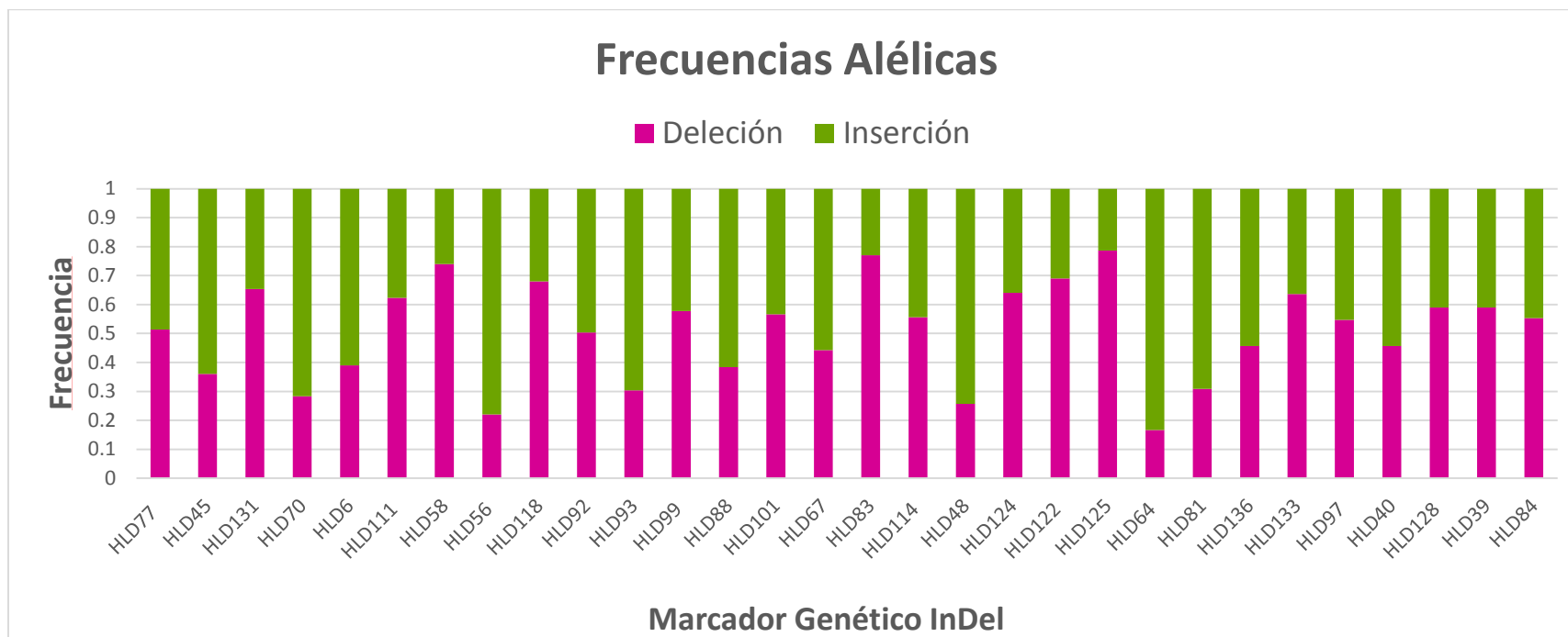
**Análisis de datos.-** Con ayuda de una hoja de cálculo de Excel se calculó la frecuencia del genotipo de cada muestra así como el índice poblacional expresado como 1 en ... (número de habitantes).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Muestras de Referencia

**Tabla de Resultados 1.** Frecuencias alélicas obtenidas para los 30 marcadores tipo InDel contenidos en el kit Investigator DIPplex (QIAGEN). **InDel:** marcador genético, **- Del:** Alelo de la delección, **+ Ins:** Alelo de la inserción.

<b>InDel</b>	<b>- Del</b>	<b>+ Ins</b>
<i>HLD77</i>	0.517	0.482
<i>HLD45</i>	0.362	0.637
<i>HLD131</i>	0.658	0.342
<i>HLD70</i>	0.282	0.718
<i>HLD6</i>	0.391	0.609
<i>HLD111</i>	0.623	0.377
<i>HLD58</i>	0.732	0.268
<i>HLD56</i>	0.222	0.778
<i>HLD118</i>	0.683	0.317
<i>HLD92</i>	0.500	0.500
<i>HLD93</i>	0.306	0.694
<i>HLD99</i>	0.586	0.414
<i>HLD88</i>	0.387	0.613
<i>HLD101</i>	0.556	0.444
<i>HLD67</i>	0.435	0.565
<i>HLD83</i>	0.761	0.239
<i>HLD114</i>	0.556	0.444
<i>HLD48</i>	0.250	0.750
<i>HLD124</i>	0.644	0.356
<i>HLD122</i>	0.687	0.313
<i>HLD125</i>	0.789	<b>0.211</b>
<i>HLD64</i>	<b>0.173</b>	0.827
<i>HLD81</i>	0.293	0.707
<i>HLD136</i>	0.458	0.542
<i>HLD133</i>	0.630	0.370
<i>HLD97</i>	0.553	0.447
<i>HLD40</i>	0.454	0.546
<i>HLD128</i>	0.588	0.412
<i>HLD39</i>	0.592	0.408
<i>HLD84</i>	0.553	0.447



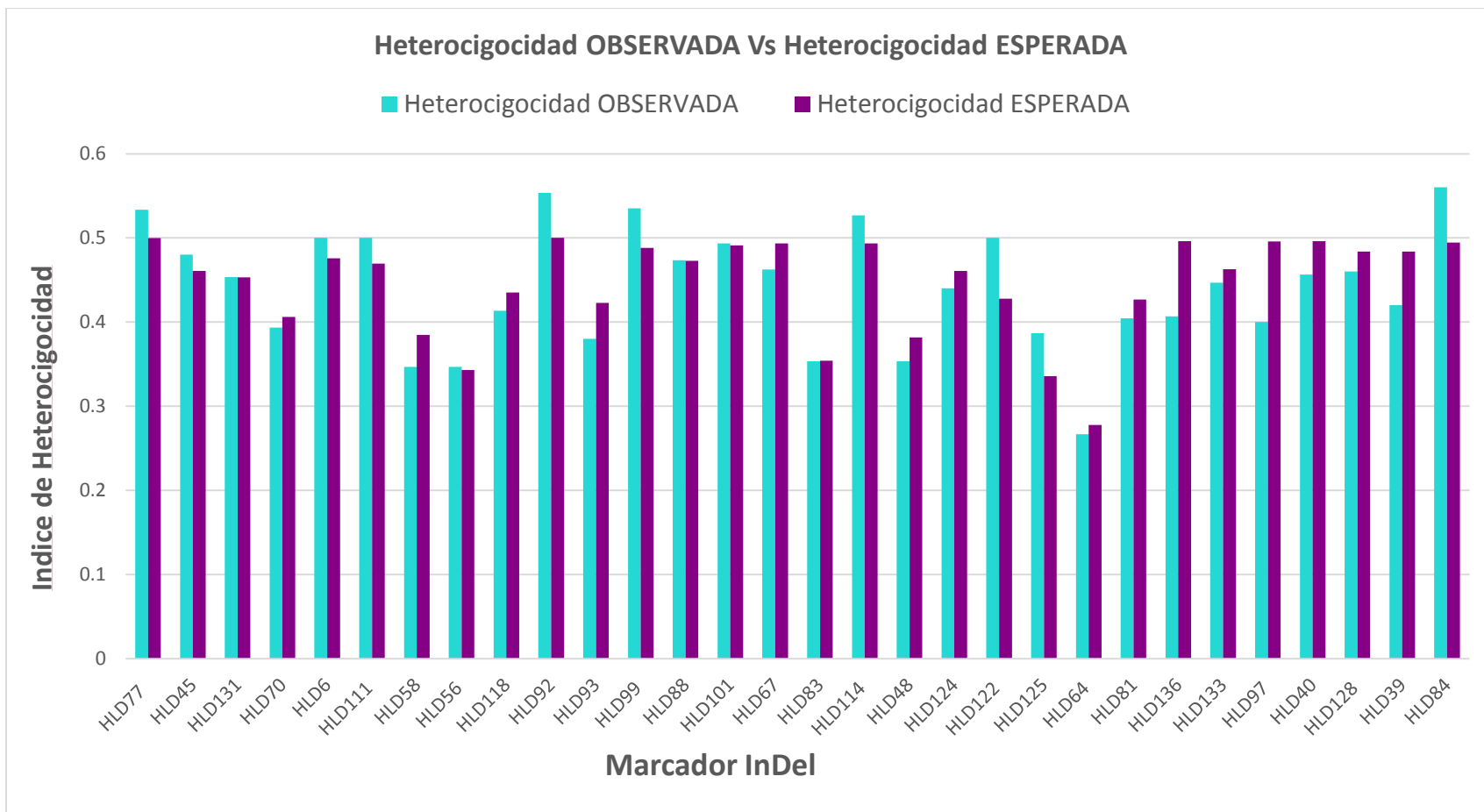
**Gráfica 1.** Proporciones de las frecuencias alélicas de los 30 marcadores InDel's contenidos en el kit Investigator DIPplex (QIAGEN). Marcadores bialélicos denotados como inserción (verde) y delección (rosa). Siendo HLD125 el marcador con el alelo "inserción" menos frecuente y el HLD64 el marcador con el alelo "delección" menos frecuente.

**Tabla de Resultados 2.** Comparación entre las frecuencias obtenidas en el presente trabajo y las reportadas por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b para población del Distrito Federal, México. (**Rojo:** difieren las frecuencias alélicas del presente trabajo y las reportadas por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b) (**Negro:** coinciden las frecuencias alélicas del presente trabajo y las reportadas por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b)

<i>InDel</i>	Acceso en GenBank / rs ID	<i>Frec. Presente trabajo</i>		<i>Frec. Martínez-Cortés et al., 2015b</i>	
		Delección	Inserción	Delección	Inserción
<i>HLD77</i>	rs1611048	0.517	0.482	0.6194	0.3806
<i>HLD45</i>	rs2307959	0.362	0.637	0.3657	0.6343
<i>HLD131</i>	rs1611001	0.658	0.342	0.6194	0.3806
<i>HLD70</i>	rs2307652	0.282	0.718	0.2463	0.7537
<i>HLD6</i>	rs1610905	0.391	0.609	0.5373	0.4627
<i>HLD111</i>	rs1305047	0.623	0.377	0.6493	0.3507
<i>HLD58</i>	rs1610937	0.732	0.268	0.7612	0.2388
<i>HLD56</i>	rs2308292	0.222	0.778	0.209	0.791
<i>HLD118</i>	rs16438	0.683	0.317	0.7463	0.2537
<i>HLD92</i>	rs201771066	0.500	0.500	0.5672	0.4328
<i>HLD93</i>	rs150042219	0.306	0.694	0.4776	0.5224
<i>HLD99</i>	rs2308163	0.586	0.414	0.5149	0.4851
<i>HLD88</i>	rs8190570	0.387	0.613	0.3358	0.6642
<i>HLD101</i>	rs2307433	0.556	0.444	0.4104	0.5896
<i>HLD67</i>	rs1305056	0.435	0.565	0.3806	0.6194
<i>HLD83</i>	rs2308072	0.761	0.239	0.8955	0.1045
<i>HLD114</i>	rs2307581	0.556	0.444	0.5522	0.4478
<i>HLD48</i>	rs28369942	0.250	0.750	0.2313	0.7687
<i>HLD124</i>	rs6481	0.644	0.356	0.4552	0.5448
<i>HLD122</i>	rs8178524	0.687	0.313	0.6642	0.3358
<i>HLD125</i>	rs16388	0.789	0.211	0.7836	0.2164
<i>HLD64</i>	rs397832668	0.173	0.827	0.3134	0.6866
<i>HLD81</i>	rs17879936	0.293	0.707	0.403	0.597
<i>HLD136</i>	rs16363	0.458	0.542	0.4552	0.5448
<i>HLD133</i>	rs2067235	0.630	0.370	0.6269	0.3731
<i>HLD97</i>	rs17238892	0.553	0.447	0.5224	0.4776
<i>HLD40</i>	rs146044344	0.454	0.546	0.4701	0.5299
<i>HLD128</i>	rs2307924	0.588	0.412	0.597	0.403
<i>HLD39</i>	rs17878444	0.592	0.408	0.6119	0.3881
<i>HLD84</i>	rs3081400	0.553	0.447	0.5	0.5

**Tabla de Resultados 3.** Heterocigocidad Observada (Ho), Heterocigocidad Esperada (He) y error estándar para los 30 marcadores tipo InDel contenidos en el kit Investigator DIPplex (QIAGEN). Todos los marcadores presentaron un error estándar < 0.03.

InDel	Ho	He	Error Estándar
<i>HLD77</i>	0.5333	0.4996	0.0289
<i>HLD45</i>	0.4800	0.4608	0.0288
<i>HLD131</i>	0.4533	0.4530	0.0287
<i>HLD70</i>	0.3933	0.4061	0.0284
<i>HLD6</i>	0.5000	0.4758	0.0288
<i>HLD111</i>	0.5000	0.4696	0.0288
<i>HLD58</i>	0.3467	0.3848	0.0281
<i>HLD56</i>	0.3467	0.3432	0.0274
<i>HLD118</i>	0.4133	0.4352	0.0286
<i>HLD92</i>	0.5533	0.5000	0.0289
<i>HLD93</i>	0.3800	0.4226	0.0285
<i>HLD99</i>	0.5352	0.4880	0.0297
<i>HLD88</i>	0.4733	0.4728	0.0288
<i>HLD101</i>	0.4933	0.4911	0.0289
<i>HLD67</i>	0.4626	0.4933	0.0292
<i>HLD83</i>	0.3533	0.3542	0.0276
<i>HLD114</i>	0.5267	0.4936	0.0289
<i>HLD48</i>	0.3533	0.3816	0.0280
<i>HLD124</i>	0.4400	0.4608	0.0288
<i>HLD122</i>	0.5000	0.4278	0.0286
<i>HLD125</i>	0.3867	0.3356	0.0273
<i>HLD64</i>	0.2667	0.2778	0.0259
<i>HLD81</i>	0.4043	0.4267	0.0295
<i>HLD136</i>	0.4067	0.4962	0.0289
<i>HLD133</i>	0.4467	0.4626	0.0288
<i>HLD97</i>	0.4000	0.4956	0.0289
<i>HLD40</i>	0.4564	0.4962	0.0290
<i>HLD128</i>	0.4600	0.4838	0.0289
<i>HLD39</i>	0.4200	0.4838	0.0289
<i>HLD84</i>	0.5600	0.4943	0.0289



**Gráfica 2.** Comparación entre la heterocigocidad observada (azul) y la heterocigocidad esperada (morado) para los 30 marcadores InDel's contenidos en el kit Investigator DIPplex (QIAGEN). Todos con un *error estándar* <0.03. Siendo el HLD92 el marcador con mayor índice de heterocigocidad y el HLD64 el marcador con menor índice de heterocigocidad.

**Tabla de Resultados 4.** Valores de  $p$  obtenidos en el presente trabajo ( $p > 0.05$ ) para la Prueba Exacta de Fisher que comprueban el Equilibrio de Hardy-Weinberg bajo el cual se encuentran los 30 marcadores contenidos en el Kit Investigator DIPplex (QIAGEN) para la población del Distrito Federal. En la columna derecha se muestran los valores de  $p$  ( $p > 0.0017$ ) reportados por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b.

*Equilibrio de Hardy-Weinberg  
valores de  $p$  en prueba exacta de Fisher*

<i>InDel</i>	<b>Presente trabajo</b> <i><math>p &gt; 0.05</math></i>	<b>Martínez-Cortés <i>et al.</i>, 2015b</b> <i><math>p &gt; 0.0017</math></i>
<i>HLD77</i>	0.5130	0.8017
<i>HLD45</i>	0.7234	0.6001
<i>HLD131</i>	1.000000	0.447
<i>HLD70</i>	0.689834	1
<i>HLD6</i>	0.608422	0.6269
<i>HLD111</i>	0.4894	0.2868
<i>HLD58</i>	0.2326	0.4997
<i>HLD56</i>	1.0000	0.719
<i>HLD118</i>	0.573773	1
<i>HLD92</i>	0.252499	0.1355
<i>HLD93</i>	0.245472	0.464
<i>HLD99</i>	0.2478	1
<i>HLD88</i>	1.000000	0.1838
<i>HLD101</i>	1.000000	0.6182
<i>HLD67</i>	0.503329	0.4486
<i>HLD83</i>	1.000000	0.5324
<i>HLD114</i>	0.508081	0.6169
<i>HLD48</i>	0.391733	1
<i>HLD124</i>	0.596352	0.6259
<i>HLD122</i>	0.055222	1
<i>HLD125</i>	0.086946	0.0629
<i>HLD64</i>	0.563115	0.0494
<i>HLD81</i>	0.554721	0.0412
<i>HLD136</i>	0.516299	0.8011
<i>HLD133</i>	0.724100	0.036
<i>HLD97</i>	0.417200	0.3323
<i>HLD40</i>	0.325401	0.8065
<i>HLD128</i>	0.612288	0.1294
<i>HLD39</i>	0.127884	0.6133
<i>HLD84</i>	0.136998	0.1459



**Tabla de Resultados 5.** Muestra el cálculo de los parámetros estadísticos forenses Poder de Discriminación (PD), Poder de Coincidencia (PC) y Poder de Exclusión (PE) para los 30 marcadores de tipo InDel contenidos en el kit Investigator DIPplex (QIAGEN).

<b>InDel</b>	<b>PD</b>	<b>PC</b>	<b>PE</b>
<i>HLD77</i>	0.6063	0.3937	0.2184
<i>HLD45</i>	0.5952	0.4048	0.1706
<i>HLD131</i>	0.5980	0.4020	0.1498
<i>HLD70</i>	0.5674	0.4326	0.1099
<i>HLD6</i>	0.6008	0.3992	0.1875
<i>HLD111</i>	0.5946	0.4054	0.1875
<i>HLD58</i>	0.5512	0.4488	0.0846
<i>HLD56</i>	0.5096	0.4904	0.0846
<i>HLD118</i>	0.5923	0.4077	0.1222
<i>HLD92</i>	0.5940	0.4060	0.2386
<i>HLD93</i>	0.5860	0.4140	0.1022
<i>HLD99</i>	0.5935	0.4065	0.2202
<i>HLD88</i>	0.6100	0.3900	0.1652
<i>HLD101</i>	0.6194	0.3806	0.1817
<i>HLD67</i>	0.6349	0.3651	0.1568
<i>HLD83</i>	0.5203	0.4797	0.0880
<i>HLD114</i>	0.6042	0.3958	0.2119
<i>HLD48</i>	0.5476	0.4524	0.0880
<i>HLD124</i>	0.6104	0.3896	0.1402
<i>HLD122</i>	0.5528	0.4472	0.1875
<i>HLD125</i>	0.4980	0.5020	0.1060
<i>HLD64</i>	0.4378	0.5622	0.0507
<i>HLD81</i>	0.5858	0.4142	0.1165
<i>HLD136</i>	0.6548	0.3452	0.1180
<i>HLD133</i>	0.6100	0.3900	0.1449
<i>HLD97</i>	0.6556	0.3444	0.1139
<i>HLD40</i>	0.6402	0.3598	0.1521
<i>HLD128</i>	0.6264	0.3736	0.1548
<i>HLD39</i>	0.6392	0.3608	0.1266
<i>HLD84</i>	0.5839	0.4161	0.2456

**Tabla de resultados 6.** Valores combinados de Poder de Exclusión, Poder de Discriminación y Poder de Coincidencia para el set de 30 InDel's de Investigator DIPplex Kit (QIAGEN).

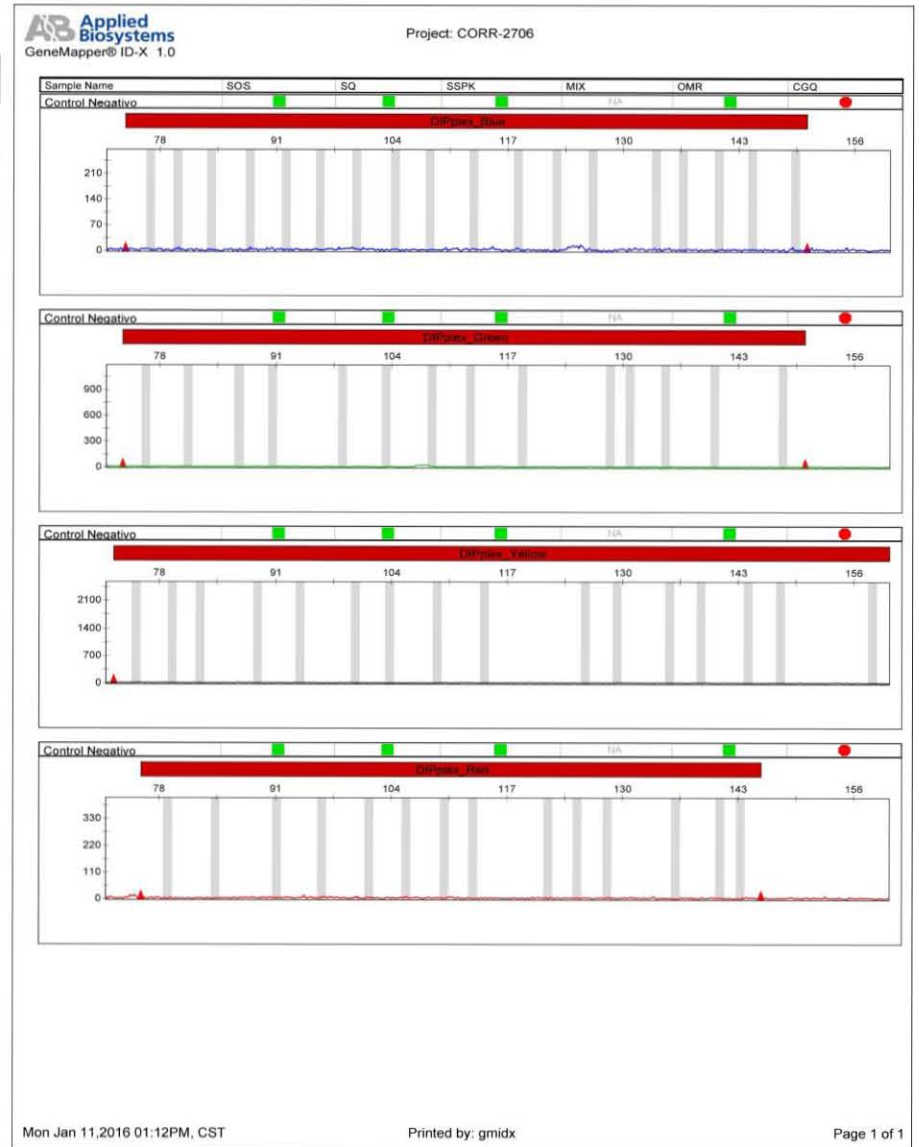
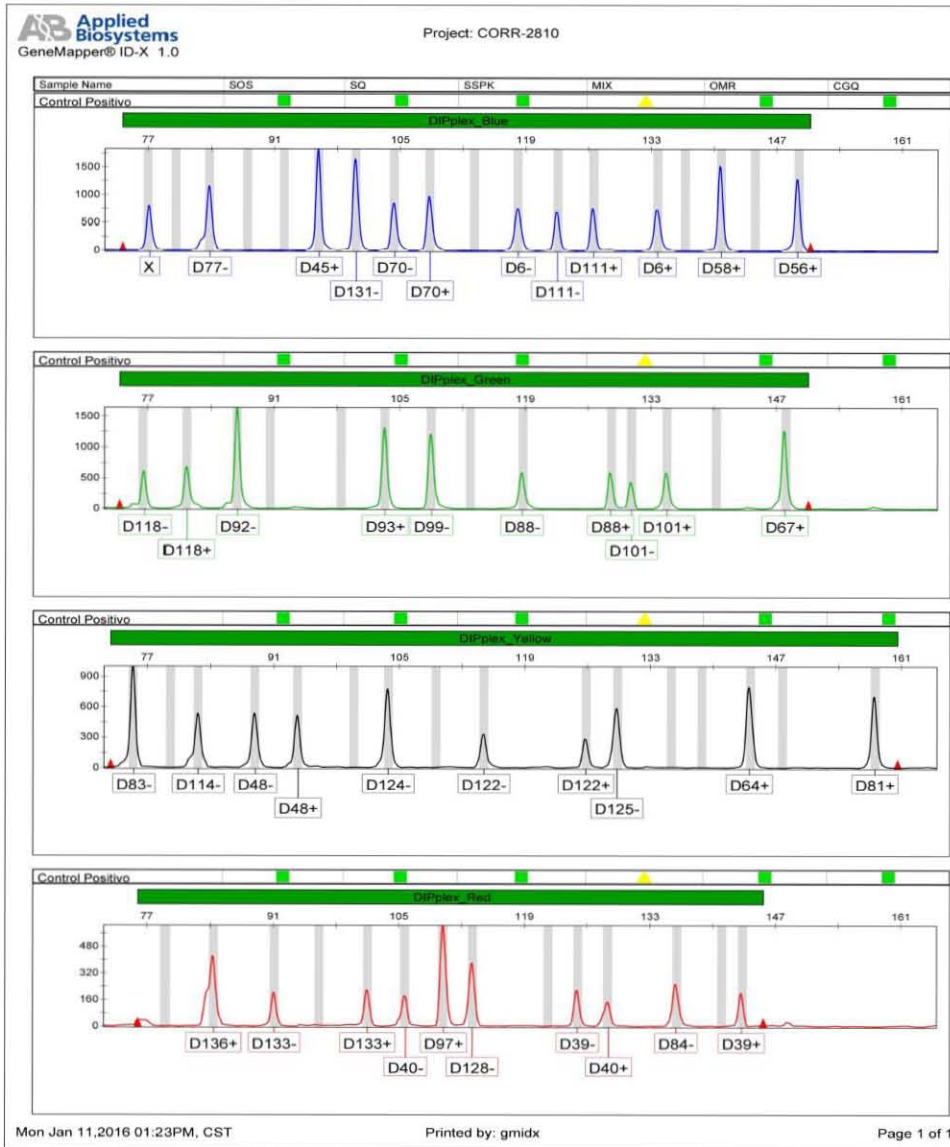
Valores combinados de Exclusión, Discriminación y Coincidencia para los 30 marcadores analizados.	
Poder combinado	Valor
Poder de Exclusión	0.992076
Poder de Discriminación	0.999999999997562
Poder de Coincidencia	2.43797E-12

**Tabla de resultados 7.-** Resumen que muestra todos los parámetros estadísticos forenses calculados.

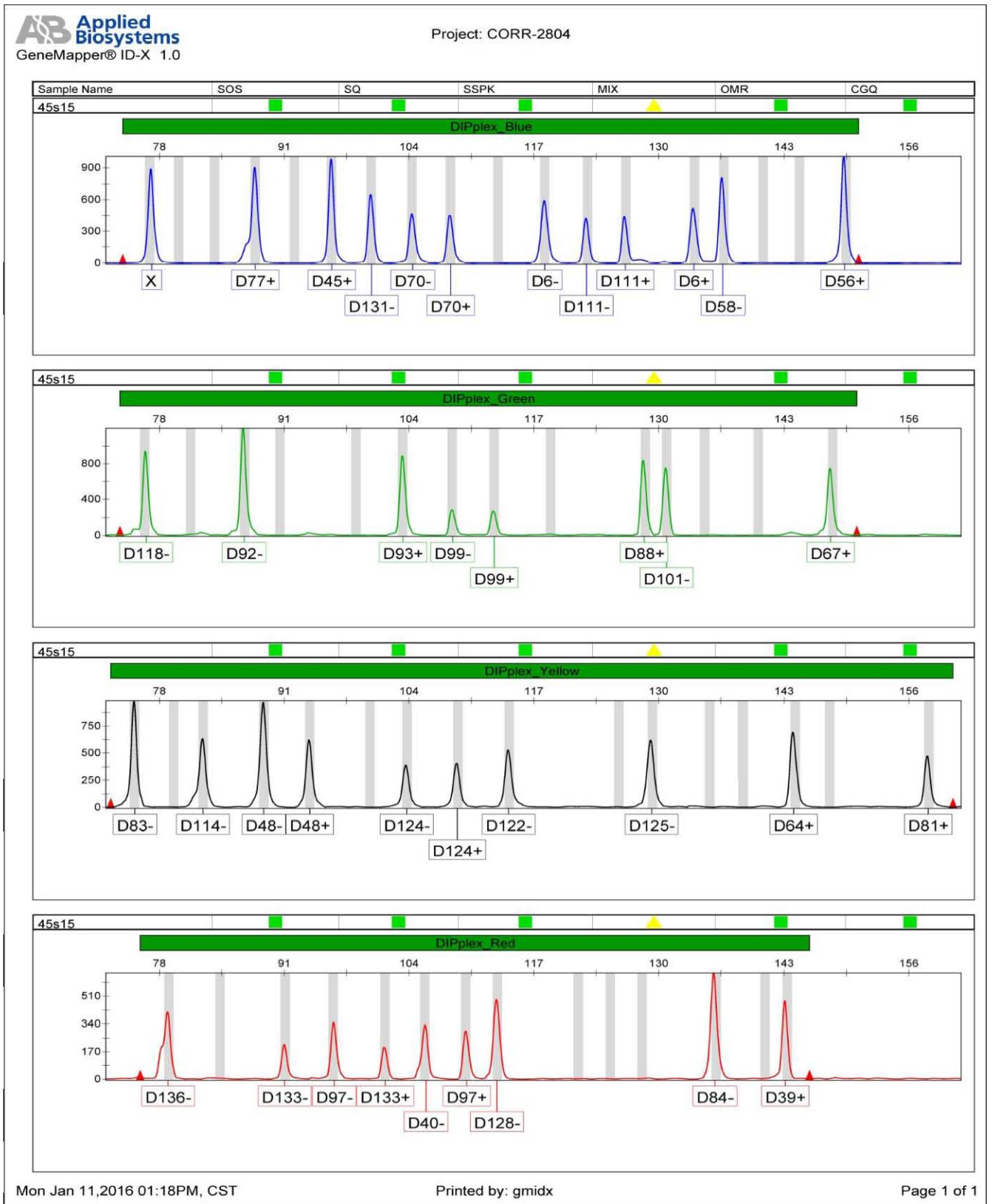
InDel	Localización en el cromosoma	Acceso en GenBank / rs ID	Delección	Inserción	Ho	He	E H-W (p) exacto	PD	PC	PE			
HLD77	7q31.1	rs1611048	0.517	0.482	0.5333	0.4996	0.5130	0.6063	0.3937	0.2184			
HLD45	2q31.1	rs2307959	0.362	0.637	0.4800	0.4608	0.7234	0.5952	0.4048	0.1706			
HLD131	7q36.2	rs1611001	0.658	0.342	0.4533	0.4530	1.0000	0.5980	0.4020	0.1498			
HLD70	6q16.1	rs2307652	0.282	0.718	0.3933	0.4061	0.6898	0.5674	0.4326	0.1099			
HLD6	16q13	rs1610905	0.391	0.609	0.5000	0.4758	0.6048	0.6008	0.3992	0.1875			
HLD111	17p11.2	rs1305047	0.623	0.377	0.5000	0.4696	0.4894	0.5946	0.4054	0.1875			
HLD58	5q14.1	rs1610937	0.732	0.268	0.3467	0.3848	0.2326	0.5512	0.4488	0.0846			
HLD56	4q25	rs2308292	0.222	0.778	0.3467	0.3432	1.0000	0.5096	0.4904	0.0846			
HLD118	20p11.1	rs16438	0.683	0.317	0.4133	0.4352	0.5737	0.5923	0.4077	0.1222			
HLD92	11q22.2	rs17174476	0.500	0.500	0.5533	0.5000	0.2524	0.5940	0.4060	0.2386			
HLD93	12q22	rs2307570	0.306	0.694	0.3800	0.4226	0.2454	0.5860	0.4140	0.1022			
HLD99	14q23.1	rs2308163	0.586	0.414	0.5352	0.4880	0.2478	0.5935	0.4065	0.2202			
HLD88	9q22.32	rs8190570	0.387	0.613	0.4733	0.4728	1.0000	0.6100	0.3900	0.1652			
HLD101	15q26.1	rs2307433	0.556	0.444	0.4933	0.4911	1.0000	0.6194	0.3806	0.1817			
HLD67	5q33.2	rs1305056	0.435	0.565	0.4626	0.4933	0.5033	0.6349	0.3651	0.1568			
HLD83	8p22	rs2308072	0.761	0.239	0.3533	0.3542	1.0000	0.5203	0.4797	0.0880			
HLD114	17p13.3	rs2307581	0.556	0.444	0.5267	0.4936	0.5080	0.6042	0.3958	0.2119			
HLD48	2q11.2	rs28369942	0.250	0.750	0.3533	0.3816	0.3917	0.5476	0.4524	0.0880			
HLD124	22q12.3	rs6481	0.644	0.356	0.4400	0.4608	0.5963	0.6104	0.3896	0.1402			
HLD122	21q22.11	rs8178524	0.687	0.313	0.5000	0.4278	0.0552	0.5528	0.4472	0.1875			
HLD125	22q11.23	rs16388	0.789	0.211	0.3867	0.3356	0.0869	0.4980	0.5020	0.1060			
HLD64	5q12.3	rs397832668	0.173	0.827	0.2667	0.2778	0.5631	0.4378	0.5622	0.0507			
HLD81	7q21.3	rs17879936	0.293	0.707	0.4043	0.4267	0.5547	0.5858	0.4142	0.1165			
HLD136	22q13.1	rs16363	0.458	0.542	0.4067	0.4962	0.5162	0.6548	0.3452	0.1180			
HLD133	3p22.1	rs2067235	0.630	0.370	0.4467	0.4626	0.7241	0.6100	0.3900	0.1449			
HLD97	13q12.3	rs17238892	0.553	0.447	0.4000	0.4956	0.4172	0.6556	0.3444	0.1139			
HLD40	1p32.3	rs146044344	0.454	0.546	0.4564	0.4962	0.3254	0.6402	0.3598	0.1521			
HLD128	1q31.3	rs2307924	0.588	0.412	0.4600	0.4838	0.6122	0.6264	0.3736	0.1548			
HLD39	1p22.1	rs17878444	0.592	0.408	0.4200	0.4838	0.1278	0.6392	0.3608	0.1266			
HLD84	8q24.12	rs3081400	0.553	0.447	0.5600	0.4943	0.1370	0.5839	0.4161	0.2456			
Amel X	Xp22.1-22.3	M55418											
Amel Y	Yp11.2	M55419											
												PCD	0.99999999997562
												PCC	2.43797E-12
												PCE	0.992076333

**HLD:** Locus Humano DIP. **DIP:** Polimorfismo de Inserción Delección. **Delección:** Frecuencia Alélica de la Delección. **Inserción:** Frecuencia Alélica de la Inserción. **Ho:** Heterocigocidad Observada. **He:** Heterocigocidad esperada. **E H-W (p) exacto:** Equilibrio Hardy-Weinberg con valor de *p* de Prueba Exacta de Fisher. **PD:** Poder de Discriminación. **PC:** Poder de Coincidencia. **PE:** Poder de Exclusión. **PCD:** Poder Combinado de Discriminación. **PCC:** Poder Combinado de Coincidencia. **PCE:** Poder Combinado de Exclusión

**Gráfica 3.** Electrogerogramas obtenidos para control positivo ADN control (*izq.*) y control negativo de citocepillo (*der.*).

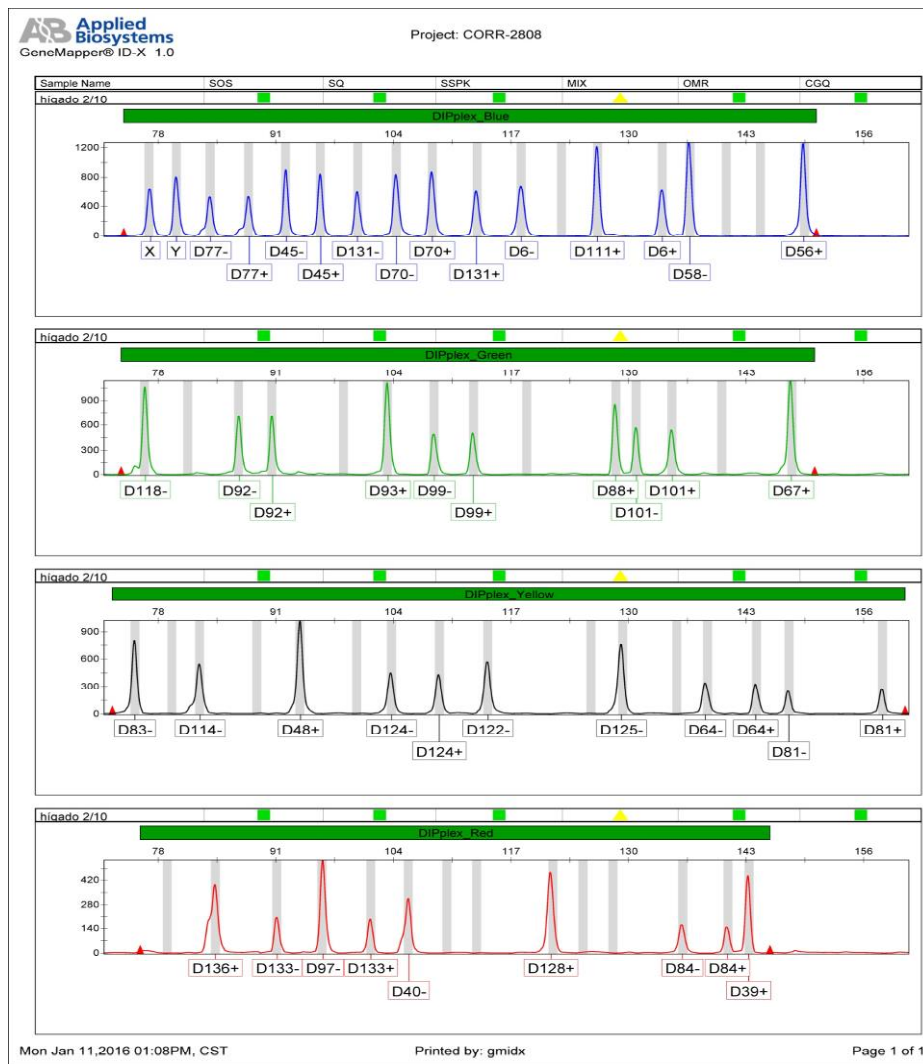
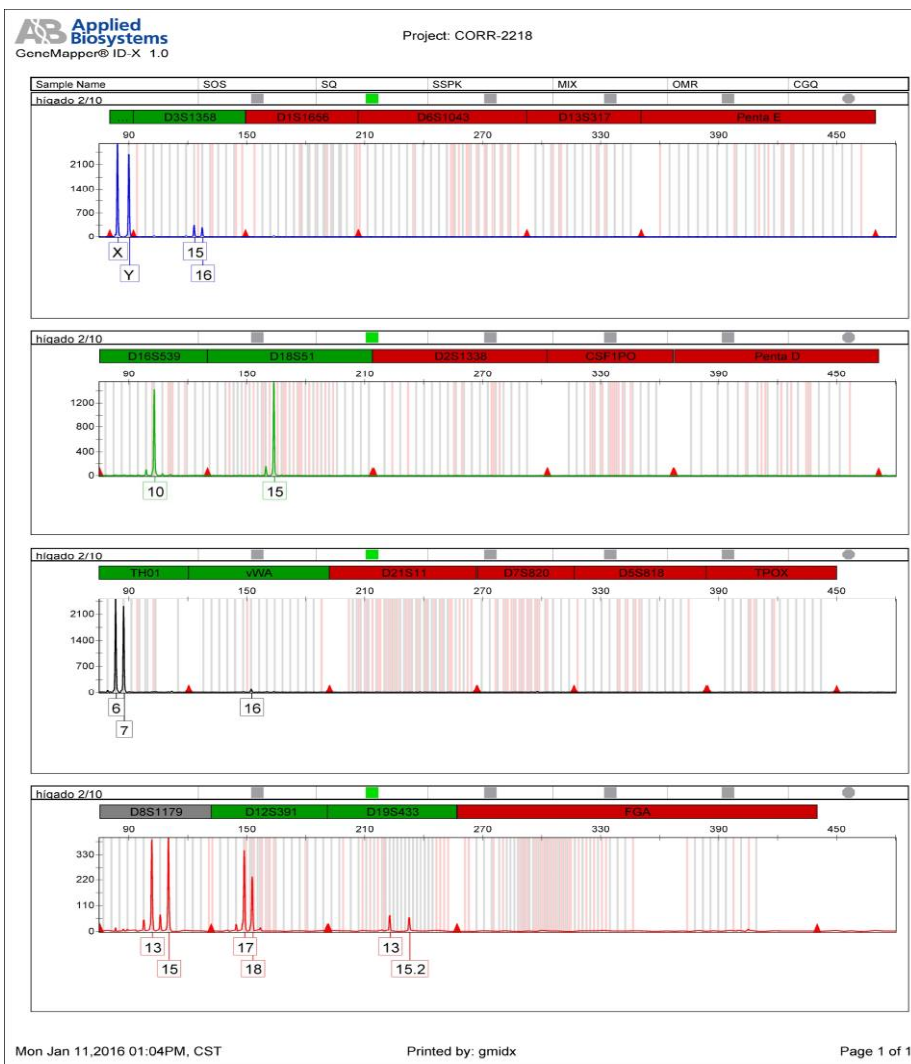


**Gráfica 4.** Electroferograma obtenido para una de las 150 muestras de saliva de referencia.

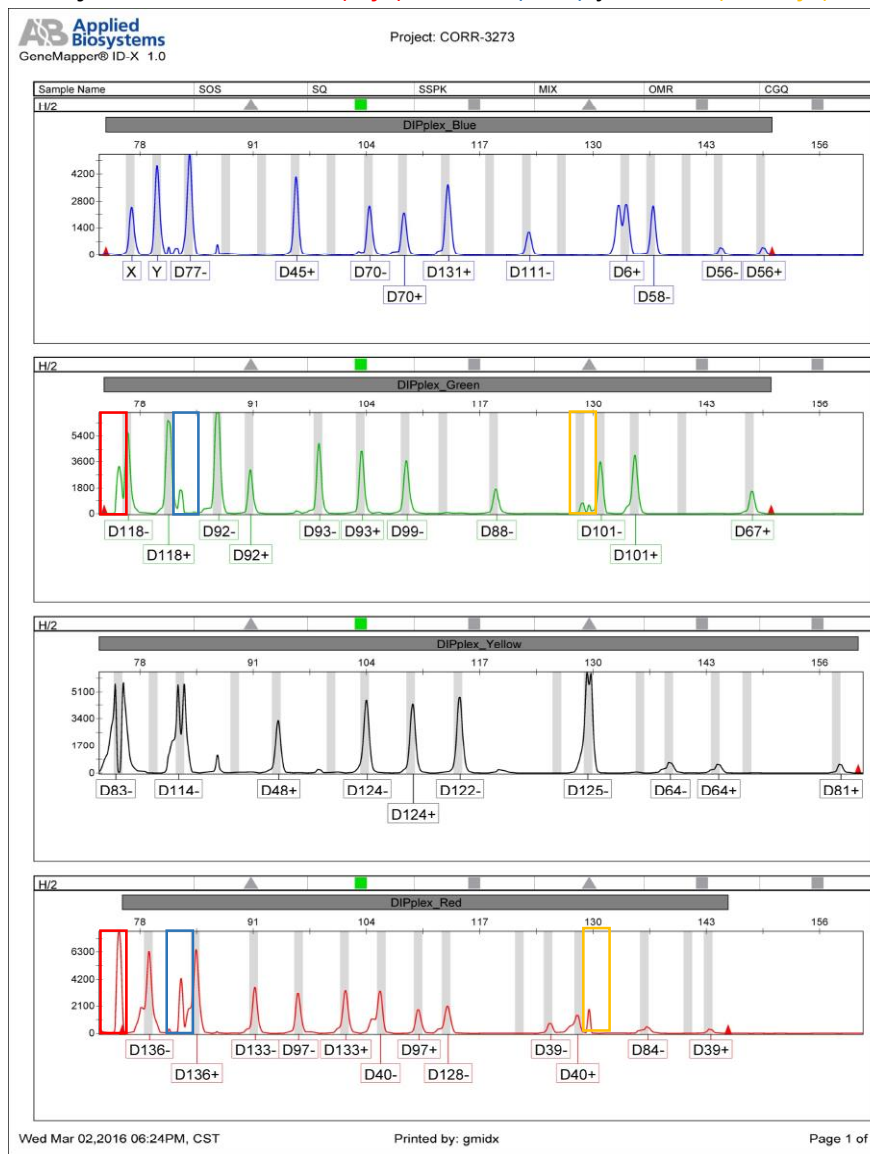
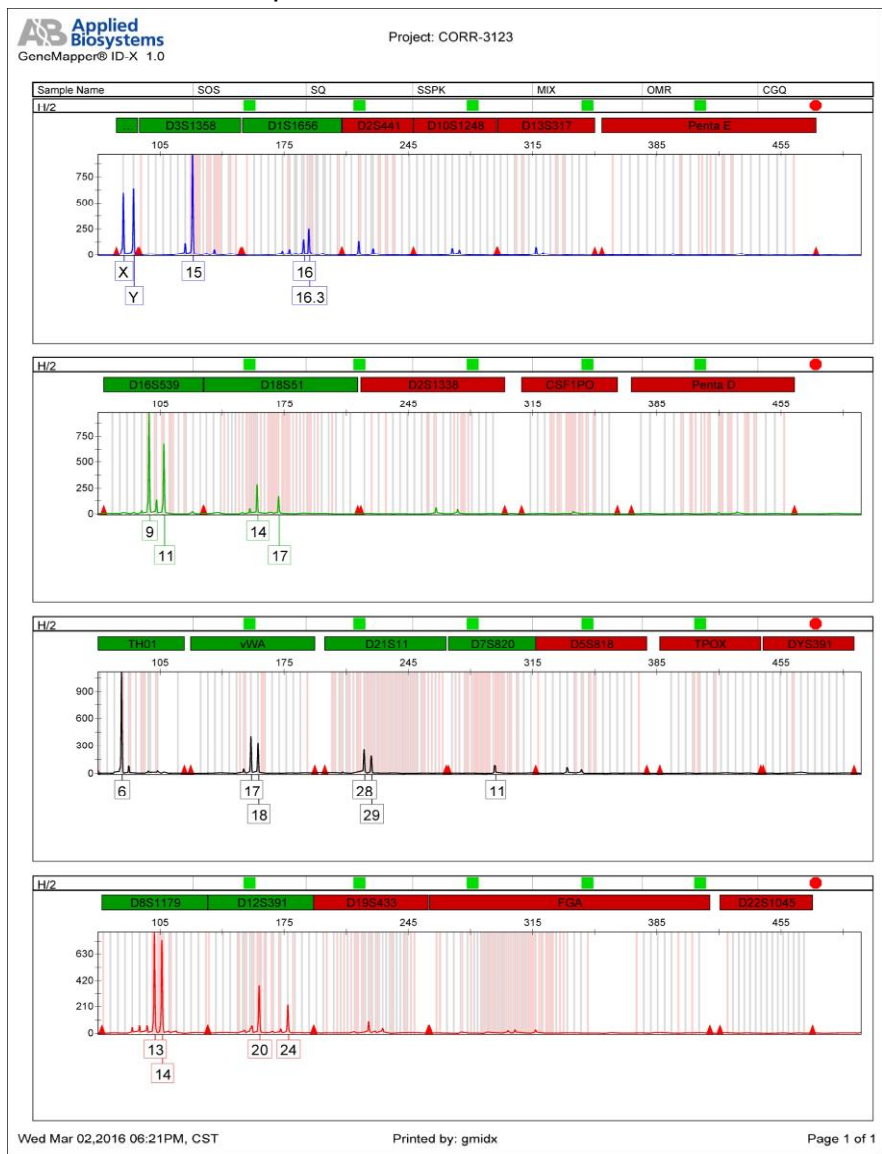


## 7.2 Muestras Problema

**Gráfica 5.** Comparación de electroferogramas obtenidos, ambos, de la misma muestra de tejido embebido en parafina fijado en formol: bloque **2/10**. Perfil parcial (ausencia de amplificación de marcadores indicados en color rojo) obtenido para sistema de identificación de STR's (*izq.*). Perfil completo obtenido para sistema de identificación con InDel's (*der.*).



**Gráfica 6.** Comparación de electroferogramas obtenidos, ambos de una misma muestra de restos óseos (costilla): **H/2**. Electroferograma parcial obtenido con marcadores de identificación de tipo STR (*izq.*). Electroferograma completo obtenido con marcadores tipo InDel (*der.*), en recuadros se muestran los *reflejos* del alelo D83- (rojo), D114- (azul) y D125- (naranja).



**Tabla de resultados 8.** Genotipos de cada una de las muestras problema para marcadores STR. (---- : marcadores que no lograron amplificarse)

<b>Genotipos obtenidos en las muestra problema para sistema de identificación con marcadores tipo STR</b>										
<b>muestra</b>	<b>Tejido 1/10 (corazón)</b>		<b>Tejido 2/10 (hígado)</b>		<b>Tejido 3/14 (músculo)</b>		<b>H/1 (estado avanzado de putrefacción)</b>		<b>H/2 (exposición al fuego)</b>	
<b>marcador/genotipo</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>
<b>Amelogenina</b>	X	X	X	Y	X	X	X	Y	X	Y
<b>D21S11</b>	----	----	13	15	----	----	29	30	28	29
<b>D19S433</b>	----	----	13	15.2	----	----	12	13	----	----
<b>D12S391</b>	----	----	17	18	----	----	20	22	20	24
<b>vWA</b>	----	----	16	16	----	----	15	19	17	18
<b>D18S51</b>	----	----	15	15	----	----	17	17	14	17
<b>D3S1358</b>	----	----	15	16	----	----	16	16	15	15
<b>THO1</b>	----	----	6	7	----	----	7	9.3	6	6
<b>D16S539</b>	----	----	10	10	----	----	9	10	9	11
<b>D8S1179</b>	----	----	----	----	----	----	13	14	13	14
<b>D7S820</b>	----	----	----	----	----	----	9	12	11	11
<b>D1S1656</b>	----	----	----	----	----	----	17	17.3	16	16.3
<b>D13S317</b>	----	----	----	----	----	----	11	12	----	----
<b>FGA</b>	----	----	----	----	----	----	22	25	----	----
<b>D2S441</b>	----	----	----	----	----	----	10	10	----	----
<b>TPOX</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>D2S1338</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>D5S818</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>D10S1248</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>Penta E</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>D2S1336</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>CSF1PO</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>Penta D</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
<b>DYS391</b>	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----



**Tabla de resultados 9.** Genotipos de cada una de las muestras problema para marcadores InDel's. (ins: inserción; del: delección; ---- : marcadores que no lograron amplificar)

<i>Genotipos obtenidos en las muestra problema para sistema de identificación con marcadores tipo InDel</i>										
<b>muestra</b>	<u>1/10 (corazón)</u>		<u>2/10 (hígado)</u>		<u>3/14 (músculo)</u>		<u>H/1 (estado avanzado de putrefacción)</u>		<u>H/2 (exposición al fuego)</u>	
<b>marcador/genotipo</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>	<b>Alelo 1</b>	<b>Alelo 2</b>
Amelogenina	X	X	X	Y	X	X	X	Y	X	Y
HLD77	del.	ins.	del.	ins.	----	----	del.	ins.	del.	del.
HLD45	del.	ins.	del.	ins.	----	----	ins.	ins.	ins.	ins.
HLD131	del.	ins.	del.	ins.	----	----	del.	ins.	ins.	ins.
HLD70	del.	ins.	del.	ins.	----	----	ins.	ins.	del.	ins.
HLD6	del.	del.	del.	del.	----	----	ins.	ins.	ins.	ins.
HLD111	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	del.	ins.	del.	del.
HLD58	del.	ins.	del.	del.	----	----	del.	del.	del.	del.
HLD56	ins.	ins.	ins.	ins.	----	----	ins.	ins.	del.	ins.
HLD118	del.	ins.	del.	del.	----	----	del.	ins.	del.	ins.
HLD92	del.	ins.	del.	ins.	----	----	del.	ins.	del.	ins.
HLD93	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	ins.	ins.	del.	ins.
HLD99	ins.	ins.	ins.	ins.	----	----	del.	del.	del.	del.
HLD88	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	del.	del.	del.	del.
HLD101	del.	ins.	del.	ins.	----	----	del.	ins.	del.	ins.
HLD67	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	del.	ins.	ins.	ins.
HLD83	del.	del.	del.	del.	----	----	del.	ins.	del.	del.
HLD114	del.	ins.	del.	del.	----	----	del.	ins.	del.	del.
HLD48	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	ins.	ins.	ins.	ins.
HLD124	del.	ins.	del.	ins.	----	----	del.	del.	del.	ins.
HLD122	ins.	ins.	del.	del.	----	----	del.	ins.	del.	del.
HLD125	del.	ins.	del.	del.	----	----	del.	del.	del.	del.
HLD64	del.	ins.	del.	ins.	----	----	ins.	ins.	del.	ins.
HLD81	del.	del.	del.	del.	----	----	del.	ins.	ins.	ins.
HLD136	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	ins.	ins.	del.	ins.
HLD133	del.	ins.	del.	ins.	----	----	ins.	ins.	del.	ins.
HLD97	del.	ins.	del.	del.	----	----	ins.	ins.	del.	ins.
HLD40	del.	del.	del.	del.	----	----	del.	ins.	del.	ins.
HLD128	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	del.	ins.	del.	del.
HLD39	del.	ins.	ins.	ins.	----	----	del.	del.	del.	ins.
HLD84	del.	ins.	del.	ins.	----	----	del.	ins.	del.	del.

**Tabla de resultados 10.-** Análisis estadístico de las muestras problema. Por muestra se indica el código de identificación, los ng de ADN recuperado por mg de muestra procesada, el número de marcadores STR recuperados, la frecuencia del genotipo de STR's y el índice de población indicado como: 1 en ... (número de habitantes). Lo mismo para marcadores InDel's y finalmente considerando ambos sistemas de identificación (suma de STR's + InDel's).

Muestra	ADN recuperado (ng ADN/mg muestra)	STR's recuperados	Frecuencia del genotipo STR's	1 en .....	InDel's recuperados	Frecuencia del genotipo InDel's	1 en .....	Frecuencia del genotipo STR's + InDel's	1 en .....
<b><i>Bloques de Tejido parafinado fijado en formol</i></b>									
1/10 (corazón)	20ng/20mg	amel.	-----	-----	30 + amel.	1.6026E-13	6.23993E+12	1.60258E-13	6.2399E+12
2/10 (hígado)	38ng/20mg	8 + amel.	1.8978E-11	5.2692E+10	30 + amel.	5.8792E-13	1.70091E+12	1.11577E-23	8.9624E+22
3/14 (músculo)	2ng/20mg	0	-----	-----	0	-----	-----	-----	-----
<b><i>Restos óseos</i></b>									
H/1 (estado avanzado de putrefacción)	50ng/50mg	13 + amel.	1.0704E-18	9.3425E+17	30 + amel.	3.568E-12	2.80269E+11	3.81913E-30	2.6184E+29
H/2 (exposición al fuego)	58.5ng /50mg	10 + amel.	5.5229E-14	1.8106E+13	30 + amel.	5.2534E-13	1.90354E+12	2.90E-26	3.45E+25

## 8. DISCUSIÓN

**Frecuencias alélicas.-** Con base en las frecuencias alélicas obtenidas y mostradas a manera de proporciones en la Tabla de Resultados 1 y Gráfica 1 es posible observar marcadores como el HLD125, HLD83 y HLD58 con frecuencias de 0.78, 0.76 y 0.73 respectivamente para el alelo de la delección y frecuencias de 0.21, 0.23 y 0.26 respectivamente para el alelo de la inserción que aluden lo informativo que resultan los InDel's ya que, al ser la inserción un alelo poco frecuente, cuando este alelo está presente en un individuo para fines de identificación, resulta muy informativo pues es mayor la cantidad de individuos (del 73% al 78% de la población) que pueden ser excluidos del estudio; es decir, si se compara con un marcador donde ambos alelos tienen una frecuencia de 0.5, la presencia de uno u otro alelo en un individuo, únicamente permitiría excluir a un 50% de la población. Sin embargo, también es importante que lo poco frecuente de uno u otro alelo en un marcador genético forense sea tanta que lo vuelva casi imposible de ser encontrado en la población (ej. Alelo  $p= 0.01$  y alelo  $q= 0.99$ ), para estos casos, dicho alelo tan escaso deja de ser informativo. De igual manera, es de considerarse que sin importar si un alelo en un marcador es muy poco o muy frecuente, es la frecuencia del genotipo en la población lo que da la importancia a las pruebas de identificación humana. En el presente trabajo los 30 marcadores aquí analizados presentan frecuencias alélicas representativas dentro de la población que en consecuencia, podrán ser utilizadas para el cálculo del resto de los parámetros estadísticos de interés forense, ya que sin esta información, ningún cálculo para fines del presente trabajo, sería posible.

Por otra parte, al comparar las frecuencias alélicas observadas en este trabajo con las reportadas por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b en la Tabla de Resultados 2, observamos que sólo en 18 de los 30 InDel's contenidos en el kit Investigator DIPplex (QIAGEN) coinciden las frecuencias alélicas. Es así, que los 12 marcadores restantes con diferencias en las frecuencias pueden atribuirse entre otras razones, a una N muestral insuficiente, pues como se mencionó anteriormente, la N utilizada en su estudio fue de 67 individuos que comparado con el presente estudio, nuestra N muestral fue casi 3 veces más grande la de ellos, por tanto es una muestra más representativa de la población de la Ciudad de México. Aquellos 18 marcadores donde las frecuencias alélicas son iguales a las obtenidas en nuestro trabajo, podemos asumir que son marcadores donde a partir de los 67 individuos las frecuencias se mantienen estables en la población, lo que no ocurre para los 12 marcadores restantes. Es importante mencionar que nuestra N muestral quedó definida obteniendo las frecuencias con 60, 80, 100, 120, 140 y finalmente 150 individuos y fue a partir de los 120 individuos donde se observó que las frecuencias de los 30 marcadores se mantenían estables.

**Heterocigocidad observada y esperada.-** Con base en la Tabla de Resultados 3 y Gráfica 2 a modo de proporciones se muestran las heterocigocidades observadas y esperadas para los 30 marcadores, vemos que para todos ellos se obtuvo un error

estándar menor a 0.03, lo cual estadísticamente nos indica que el índice de heterocigocidad observado, es igual al índice de heterocigocidad esperado cuando la población se encuentra bajo equilibrio de Hardy-Weinberg. De manera individual, el HLD92 es el marcador con el valor más alto (0.55) y el HLD64 el marcador con el valor más bajo (0.26); los cuales representan una mayor y una menor aportación al poder de discriminación total de la prueba respectivamente. Finalmente, los valores en dicha tabla observados, hacen que este set de marcadores disminuya la probabilidad de coincidencia entre muestras y por el contrario, tengan un alto poder de discriminación.

**Ley de equilibrio de Hardy-Weinberg.-** En la Tabla de Resultados 4 se muestra la comparación de los valores de  $p$  para la prueba exacta de Fisher obtenidos en el presente trabajo y los reportados por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b, estos valores son los que dan soporte estadístico y justifican las similitudes o diferencias existentes entre las frecuencias observadas y las esperadas para la generación actual y generaciones futuras de la población de la Ciudad de México.

La columna izquierda de la tabla muestra los valores de  $p$  obtenidos en el presente estudio donde se contempló un  $\alpha=0.05$ . Los 30 marcadores poseen valores mayores al  $\alpha$  establecido lo que nos indica que cada uno de estos marcadores se encuentra bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, a su vez, esto refiere que nuestra  $N$  muestral ( $n=150$ ) es representativa del total de la población de la Ciudad de México y que las frecuencias aquí reportadas son estables en la generación actual y generaciones futuras, por tanto pueden ser utilizadas en tanto la población no se vea afectada por la acción de fuerzas evolutivas. Igualmente hace posible el cálculo de parámetros estadísticos forenses presentados más adelante.

Al ser  $p$  una probabilidad, sus valores oscilan entre 0 y 1; mientras más cercano a 1 sea el valor de  $p$ , menos diferencia estadística habrá entre nuestras variables (frecuencias observadas y frecuencias esperadas) y de lo contrario, mientras el valor de  $p$  tienda más al 0 mayor diferencia habrá entre ellas. Del lado derecho de la tabla se exponen los valores de  $p$  reportados por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b quienes contemplan un  $\alpha=0.0017$ , a pesar de que de manera consensuada se eligen valores de alfa ( $\alpha$ ) iguales a 0.05 ó 0.01 para modelos biológicos y/o humanos. En su trabajo se reportan que los 30 marcadores se encuentran bajo equilibrio H-W. Sin embargo, es de señalarse que reportan correcciones de Bonferroni en algunos marcadores (no se especifican cuántos ni cuáles) corrección que sirve para normalizar los datos y aplicable cuando se tienen muestras muy pequeñas por ejemplo. Los marcadores HLD64, HLD81 y HLD133 presentan en su trabajo valores de  $p<0.05$  lo que para nosotros representarían marcadores fuera de equilibrio H-W y puesto que nuestra población no ha pasado por procesos migratorios o de endogamia con un impacto evolutivo, el desequilibrio podría atribuirse a dos razones posibles, (1) una genotipificación incorrecta o (2) una  $N$  muestral no representativa. Para fines de identificación, el desequilibrio de éstos implicaría que no serían marcadores adecuados puesto que estarían aumentando la probabilidad de hacer asociaciones fortuitas o poco certeras.

**Parámetros Forenses.-** En la Tabla de Resultados 5 se muestran los valores obtenidos en los diferentes parámetros estadísticos de interés forense para cada marcador de manera individual. Es el HLD97 el que muestra mayor poder de discriminación (PD) con un valor de 0.65 y el HLD64 el de menor PD con un valor de 0.43, por consiguiente es el HLD64 el que mayor poder de coincidencia (PC) tiene y el HLD97 el del valor más bajo, pues estos dos parámetros son recíprocos. Finalmente, para el poder de exclusión (PE) es el HLD84 con un valor de 0.24 el más alto del set de los 30 marcadores y el HLD64 con un valor de 0.05 el más bajo. Son los valores más altos y los más bajos de cada parámetro los que mayor y menor información proveen a la prueba total. Sin embargo, el valor real de estos parámetros es representativo hasta que se calculan de manera conjunta, es decir, los valores de toda la prueba, los cuales son mostrados en el Tabla de Resultados 6. Se obtuvo un poder combinado de discriminación (PCD) de 0.999999999997564 lo cual refiere una probabilidad de 99.9999999997564% de poder diferenciar genéticamente a dos individuos no relacionados biológicamente y tomados al azar de la población de la Ciudad de México mediante el análisis de los 30 marcadores InDel contenidos en el kit Investigator DIPplex. Para el poder combinado de coincidencia (PCC) se obtuvo un valor igual a  $2.43797^{-12}$  lo cual refiere la probabilidad de que un determinado perfil genético aparezca en la población más de una vez; cuando a la unidad se le divide entre este valor se obtiene que dicho perfil aparecerá en nuestra población 1 vez por cada 410, 178, 000, 000 habitantes, siendo que la población total de la Ciudad de México no es mayor a 9, 000, 000 y la población total del país es de 118, 915, 373 habitantes, esto nos indica que prácticamente, es imposible que dos personas tengan el mismo perfil genético (exceptuado casos de gemelos monocigóticos). Por otra parte, se obtuvo un valor de 0.992076333 para el poder combinado de exclusión (PCE), a manera de ejemplo, refiere que un hombre no donante de una muestra biológica puede ser excluido de un caso con una probabilidad de 99.20%. Es de señalarse que cuando este valor de PCE es comparado con los obtenidos para sistemas actuales de STR's con baterías de 20 o más marcadores, el PE de los InDel's se ve superado, ya que los STR's presentan valores de hasta 99.92% (Rubi-Castellanos *et al.*, 2009), valores que se logran por lo polimórficos que son los STR's. Dichos valores de exclusión obtenidos pueden ser alcanzados por InDel's si la batería de marcadores aumenta. A pesar de todo esto, los valores aquí obtenidos sirven para fines de identificación y se plantea la idea de usar la presente batería de InDel's como un sistema de apoyo para sistemas de STR's donde existan mutaciones para algún marcador y que por tanto, puedan generar suspicacias, así mismo para casos de relaciones de parentesco complejas y paternidades deficientes. Finalmente, en la Tabla de Resultados 7 se resumen todos los parámetros anteriormente calculados de manera individual y de la prueba en general.

**Electroferogramas para muestras de referencia.-** En la gráfica 3 se muestran los electroferogramas obtenidos para un control positivo (un perfil ya esperado) y un control negativo, donde no se obtuvo señal alguna de amplificación. Es así que ambos controles refieren el buen estado de los reactivos y del material de toma de muestra utilizados para este trabajo así mismo, refieren que la técnica aquí empleada para genotipificar es adecuada. De manera ilustrativa se muestra en la gráfica 4 un electroferograma obtenido

a partir de una de las 150 muestras de referencia trabajadas para el estudio poblacional, trata de un individuo del sexo femenino (X,X) donde claramente se pueden identificar marcadores para los cuales es heterocigoto como el D70 (cuenta con el alelo de la inserción y la delección) y marcadores como el D92 donde el individuo resulta homocigoto para la delección.

**Muestras Problema.-** De las 5 muestras problema trabajadas, referiremos primeramente las de tejido parafinado. Para fines prácticos e ilustrativos se eligió mostrar sólo los electroferogramas obtenidos para la muestra de hígado etiquetada como 2/10 que se observan en el Gráfico 5; del lado izquierdo vemos el perfil parcial obtenido con sistema de STR's, 8 marcadores autosomales y amelogenina (X,Y) donde se logró amplificar fragmentos de hasta 240pb correspondientes al marcador D19S433 y son todos los marcadores en color rojo los que no lograron amplificar dadas las características que presentaba la muestra. En este perfil cabe señalar el tamaño tan pequeño de los picos, lo que puede llegar a generar dudas o suspicacias acerca de si son o no alelos verdaderos como el caso del marcador vWA o D19S433. Este mismo extracto con cuantificación de 38ng de ADN por 20mg de muestra trabajada, generó un perfil genético completo para sistema de InDel's mostrado del lado derecho del gráfico, en el cual primeramente se corrobora el sexo del individuo (X,Y) y se observa la homogeneidad esperada en el tamaño de los picos, así mismo el perfil es perfectamente interpretable por la definición obtenida para cada alelo. El genotipo de esta muestra y de las dos muestras restantes se encuentran en las Tablas de Resultados 8 y 9 para STR's e InDel's respectivamente. En la muestra 1/10 perteneciente a un bloque de corazón se destaca que, a pesar de haber obtenido una cuantificación de 20ng de ADN por 20mg de muestra, únicamente se logró obtener el marcador de la amelogenina para el sistema de STR's. Esto indica que no siempre cantidades suficientes de ADN para sistemas de identificación forense, son sinónimo de ADN en buen estado sin degradación. Para esta misma muestra se generó un perfil genético de InDel's completo, lo que hace notar la importancia de trabajar con fragmentos de amplificación de menor tamaño. Sin embargo, existen muestras donde el nivel de degradación del material genético es tanto que prácticamente es imposible generar un perfil genético, tal es el caso de la muestra 3/14 (músculo) con cuantificación de 2ng de ADN por 20mg de muestra, donde no se logró obtener información para ningún marcador STR ni InDel. Es de mencionarse que para ninguna de las tres muestras se tiene referencia de las condiciones previas en las cuales se encontraban (por ejemplo putrefacción, exposición a fuego, deshidratación o exposición prolongada en cuerpos de agua) ni los detalles del proceso de parafinado. Por tanto, adicional a que son consideradas muestras críticas, las condiciones a las que pudieron haber sido sometidas son variables de las que cabe la posibilidad afecten aún más el rendimiento de ADN y es esta última muestra la que hace notar las limitaciones de nuestro sistema de identificación de InDel's pues a pesar de trabajar con fragmentos muy pequeños, muestras con material genético demasiado dañado superan este sistema.

La importancia de los genotipos generados, se hace notar cuando se calcula la frecuencia del genotipo en la población, datos mostrados en la Tabla de Resultados 9 e interpretados de la siguiente manera, se obtuvo que la frecuencia del genotipo de STR's de la muestra 2/10 es de  $1.8978^{-11}$ , lo que alude que este perfil aparece una vez en la población por cada  $5.2692^{10}$  habitantes. El genotipo de esta misma muestra pero para marcadores InDel presenta una frecuencia de  $5.8792^{-13}$  equivalente a aparecer una vez por cada  $1.70091^{12}$  habitantes. Aunque con ambos sistemas se lograron valores de PD altos, para este caso vemos que el set de 30 marcadores InDel's resulta aún más discriminativo que los 8 marcadores STR's obtenidos. Sin embargo, el PD aumenta aún más cuando se conjuntan ambos genotipos, es decir, contemplando la frecuencia del genotipo de STR's y la del genotipo de InDel's, resultando así una frecuencia total de  $1.11577^{-23}$  y por tanto el genotipo se repite uno de cada  $8.96242^{22}$  individuos. Los valores anteriores toman mayor relevancia cuando provienen de casos de identificación o evidencias biológicas, ya que si un individuo no se excluye del estudio como fuente biológica del indicio recolectado, o si el perfil genético de una persona, tiene concordancia con el o los perfiles genéticos de individuos con quienes se presume existe una relación biológica de parentesco, es necesario aplicar cálculos estadísticos para determinar la fuerza de la relación que existe entre el probable responsable y la evidencia o la relación que existe entre determinados individuos respectivamente, en consecuencia siempre se requiere utilizar la mayor cantidad de marcadores genéticos disponibles con la finalidad de proporcionar soporte y valor probatorio a un estudio de confronta. Para la muestra 1/10, al carecer de un genotipo para marcadores STR's sólo se puede contemplar la frecuencia del perfil de InDel's que es igual a  $1.6026^{-13}$  lo que equivale a encontrar este perfil en una persona por cada  $6.23993^{12}$  habitantes y finalmente en la muestra 3/14 al carecer de información, se imposibilita el cálculo de estos parámetros.

Para el caso de las dos muestras de restos óseos, se obtuvieron perfiles genéticos de InDel's completos a pesar de las condiciones de putrefacción y exposición al fuego a las que fueron sometidas. Para fines prácticos e ilustrativos se eligió mostrar únicamente los electroferogramas obtenidos para la muestra H/2 que se observan en el Gráfico 6; del lado izquierdo vemos el perfil parcial obtenido con sistema de STR's, 10 marcadores autosomales y amelogenina (X,Y) donde se logró amplificar fragmentos de hasta 300pb (D7S820), son todos los marcadores en color rojo los que no lograron amplificar dadas las características de la muestra. En este perfil es de señalar la tendencia a la disminución del tamaño de los picos conforme más grandes son los fragmentos de interés, lo que nos indica la degradación del material genético. Este mismo extracto con cuantificación de 58.5ng de ADN por 50mg de muestra trabajada, generó un perfil genético completo para sistema de InDel's observado del lado derecho, para éste es importante hacer notar los "reflejos" resaltados en recuadros rojos, azules y naranjas pertenecientes a los alelos D83-, D114- y D125- los más notorios y productos del alto número de ciclos a los que la muestra fue sometida con la finalidad de que no se perdieran los últimos marcadores correspondientes a los fragmentos más grandes. Sin embargo, es totalmente interpretable el perfil ya que a diferencia de los STR's, los InDel's no generan

microvariantes y por tanto, dichos reflejos no presentan problemas de interpretación respecto a la presencia o ausencia de alelos.

Para la muestra H/1 se logró un perfil parcial de STR's con 13 marcadores autosomales y amelogenina, mientras que para sistema de InDel's se logró un perfil completo. Los genotipos de ambas muestras (H/1 y H/2) son expuestos en las Tablas de Resultados 8 (STR's) y 9 (InDel's), y al igual que con las muestras de bloques parafinados, la importancia de dichos genotipos se hace notar cuando se calcula la frecuencia del genotipo en la población, datos mostrados en la Tabla de Resultados 9. El genotipo de STR's para la muestra H/1 presenta una frecuencia de  $1.0704^{-18}$  lo que alude que este perfil aparece una vez en la población por cada  $9.3425^{17}$  habitantes. El genotipo para marcadores InDel presenta una frecuencia de  $3.568^{-12}$  equivalente a aparecer una vez por cada  $2.80269^{11}$  habitantes, finalmente con ambos sistemas se genera una frecuencia de  $3.81913^{-30}$  y la probabilidad de encontrar dos personas, no relacionadas biológicamente, que compartan los mismos perfiles genéticos de STR's e InDel's es de  $2.6184^{29}$ . Esta misma interpretación es dada para la muestra H/2 con un valor de  $2.90^{-26}$  cuando se contemplan ambos perfiles (STR's e InDel's). De modo tal que entre más marcadores genéticos obtengamos mayor será el PD obtenido.

Dado que recientemente es que se les ha dado interés a este tipo de marcadores, la mayoría de la comunidad científica se ha preocupado por hacer los estudios poblacionales correspondientes con la finalidad de tener valores estadísticos que sustenten los resultados que se puedan generar y razón por la cual no existen estudios de caso reportados para el área forense donde se pongan a prueba los InDel's con muestras forenses reales. Es así que, con las muestras problema aquí presentadas se puso a prueba al set de marcadores del kit Investigator DIPplex (QIAGEN) con muestras forenses donde para la mayoría de los casos se demostró la utilidad de los InDel's para trabajar con muestras altamente degradadas superando a los STR's sin importar las baterías de marcadores tan amplias con las que pueden llegar a contar.



## 9. CONCLUSIONES

- Las frecuencias alélicas de los marcadores tipo InDel del kit comercial Investigator DIPplex (QIAGEN) se obtuvieron con muestras de referencia posterior a la estandarización de la técnica. 12 de los 30 marcadores presentaron diferencias en las frecuencias alélicas al compararse con las reportadas por Martínez-Cortés *et al.*, 2015b, único antecedente de frecuencias alélicas del sistema Investigator DIPplex en población mexicana, diferencias atribuidas a una N muestral pequeña o limitantes en su genotipificación.
- El total de los marcadores se encuentran bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y a partir de los cálculos individuales para los parámetros estadísticos de interés forense, se lograron valores totales de la prueba de 0.9920 para PCE, 0.9999 para PCD y  $2.4379 \cdot 10^{-12}$  para PCC lo que los vuelve un sistema apto para fines de identificación humana en población del Distrito Federal que de igual manera se proponen como un método alternativo o complementario para sistemas de identificación actuales (STR's).
- Los datos poblacionales aquí generados complementarán la base de datos con la que cuenta actualmente el Laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias Forenses del TSJCDMX y permitirán futuras confrontas de perfiles genéticos para fines legales de identificación humana y pruebas de parentesco con valores estadísticos que los soporten.
- Se demostró la utilidad y sensibilidad del kit Investigator® DIPplex (QIAGEN), para el análisis de muestras forenses críticas y altamente degradadas como tejidos embebidos en parafina y fijados en formol, restos óseos calcinados y en estado avanzado de putrefacción generando frecuencias de hasta  $1.602 \cdot 10^{-13}$  que al combinarse con sistemas de STR's logran valores de hasta  $3.819 \cdot 10^{-30}$ , lo que indica que el genotipo se repite uno de cada  $2.6184 \cdot 10^{29}$  individuos. Sin embargo, este set de marcadores presentó dificultades con 1 de las 5 muestras problema la cual hace evidente las limitaciones del sistema.

## 10. PERSPECTIVAS

Este estudio permitirá y tiene como perspectiva continuar realizando futura investigación en el tema de genética de poblaciones ya sea comparando grupos poblacionales dentro de México o con otras naciones, de modo que se vayan aportando cada vez más herramientas a la genética forense que ayuden a la solución de casos legales con rangos de error cada vez menores y se sigan enriqueciendo bases de datos usadas a nivel mundial como la de GeneBank.

Dada la situación actual de nuestro país y la cantidad de casos que han quedado impunes y que involucran la desaparición de individuos, se tiene la expectativa de que se promueva la investigación en el área forense dentro de instituciones privadas así como gubernamentales pues es un deber del estado brindar seguridad y bienestar a sus pobladores. Dicha iniciativa en investigación no es únicamente necesaria dentro del área genética ya que la resolución a casos como éstos implican un trabajo multidisciplinario que requiere del avance de todas las áreas y no sólo de unas cuantas.

## 11. LITERATURA CITADA

- Alaeddini, Reza, Simon J. Walsh, and Ali Abbas. 2010. "Forensic Implications of Genetic Analyses from Degraded DNA—A Review." *Forensic Science International: Genetics* 4(3): 148–57. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497309001483>.
- Albarellos, Laura A. 2009. *Identificación Humana Y Bases de Datos Genéticos*. 1ra ed. Ciudad de México, México: UBIJUS.
- Ananian, Viviana et al. 2011. "Tumoural Specimens for Forensic Purposes: Comparison of Genetic Alterations in Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues." *International Journal of Legal Medicine* 125: 327–32.
- Bond, John W., and Christine Hammond. 2008. "The Value of DNA Material Recovered from Crime Scenes." *Journal of Forensic Sciences* 53(4): 797–801.
- Brenner, C. and J. Morris. 1990. "Paternity Index Calculations in Single Locus Hypervariable DNA Probes: Validation and Other Studies." *International Symposium on Human Identification. Promega*: 21–53.
- Buckleton, John., Christopher. Triggs, and Simon. Walsh. 2005. *Forensic DNA Evidence Interpretation*. 1st ed. Auckland, New Zealand: CRC Press.
- Butler, J. M., and C. R. Hill. 2012. "Biology and Genetics of New Autosomal Str Loci Useful for Forensic DNA Analysis." *Forensic Science Review* 24(1): 16–26.
- Butler, John M. 2015. "The Future of Forensic DNA Analysis." *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 370(1674): 20140252 – . <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/370/1674/20140252>.
- Butler, John M. 2009. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. 1st ed. Maryland, USA.: Academic Press, Elsevier.
- . 2011. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*.
- Campobasso, Carlo P, Jason G Linville, Jeffrey D Wells, and Francesco Introna. 2005. "Forensic Genetic Analysis of Insect Gut Contents." *The American journal of forensic medicine and pathology : official publication of the National Association of Medical Examiners* 26(2): 161–65.
- Caputo, Mariela, Maximiliano Irisarri, Evguenia Alechine, and Daniel Corach. 2013. "A DNA Extraction Method of Small Quantities of Bone for High-Quality Genotyping." *Forensic science international. Genetics* 7(5): 488–93. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1872497313001129> (December 7, 2015).
- Carracedo, Angel. 2005. *Forensic DNA Typing Protocols*. 1st ed. Galicia, España: Human Press.
- Clark, David P. (Southern Illinois University), and Lonnie D. (Southern Illinois University) Russell. 2005. *Molecular Biology. Made Simple and Fun*. 3rd ed. Cache River Press.
- Cummings, Michael R. 2000. *Human Heredity. Principles and Issues*. 5th ed. United States of America: Brooks/Cole. Thomson Learning.
- Echeverri, Maria T. 1995. "La Saliva Componentes, Funcion Y Patologia.pdf." *Revista Estomatología Cali. Colombia* 4(2): 55–63.

- Felsenfeld, Gary, and Mark Groudine. 2003. "Controlling the Double Helix." *Nature* 421(6921): 448–53. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature01410>.
- Fung, Wing Kam, and Yue-Qing Hu. 2008. *Statistical DNA Forensics, Theory, Methods and Computation*. 1st ed. England: Wiley.
- Garrido, Armando, and José Ma. Teijón. 2006. *Fundamentos de Química Estructural*. 2da ed. Madrid: Tébar.
- Gaytmenn, Roshale, and David Sweet. 2003. "Quantification of Forensic DNA from Various Regions of Human Teeth." *Journal of forensic sciences* 48(3): 4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12762534>.
- Gill, Peter. 2014. *Misleading DNA Evidence. Reasons for Miscarriages of Justice*. first. United States of America: Elsevier.
- Goodwin, William, Adrian Linacre, and Sibte Hadi. 2011. 53 *Journal of Chemical Information and Modeling An Introduction to Forensic Genetics*. 2nd ed. United States of America: Willey-BlackWell.
- Hartl, Daniel L., and Elizabeth W. Jones. 2009. *Genetics. Analysis of Genes and Genomes*. 7th ed. United States of America: Jones & Bartlett Publishers.
- Hedrick, PW. 2005. *Genetics of Populations*. 3rd ed. Sudbury, MA: Jones & Bartlett.
- Henderson, George, and Thompson Olasiji. 1994. "Native Americans." In *Migrants, Inmigrants and Slaves. Racial & Ethnic Groups in America.*, Lahman, Maryland: University Press os America, 23–43.
- Jones, Richard E., and Kristin H. López. 2014. *Human Reproductive Biology*. fourth. United States of America: Elsevier.
- Karp, Gerald. 2010. *Biología Celular Y Molecular. Conceptos Y Experimentos*. 6ta ed. China: McGrawHill.
- Krawczak, M., and J. Schmidtke. 1998. *DNA Fingerprinting*. 2nd ed. New York, United States of America: BioScientific Publishers, Springer.
- Krebs, Jocelyn E. (University of Alaska), Elliott S. (Arizona State Univerity) Goldstein, and Stephen T. (University of Pittsburgh at Johnstown) Killpatrick. 2014. *LEWIN'S GENES XI*. 11th ed. United States of America: Jones & Bartlett Learning.
- Lee, Steven B., Bruce McCord, and Eric Buel. 2014. "Advances in Forensic DNA Quantification: A Review." *Electrophoresis* 35(21-22): 3044–52. <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201400187>.
- Lodish, Harvey. et al. 2008. *Molecular Cell Biology*. 6th ed. United States of America: W. H. Freeman and Company.
- Maciejewska, Agnieszka, Renata Wlodarczyk, and Ryszard Pawlowski. 2015. "The Influence of High Temperature on the Possibility of DNA Typing in Various Human Tissues." *Folia Histochemica et Cytobiologica*: 27. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379711279900249>.
- Maroñas, O et al. 2015. "The Genetics of Skin , Hair , and Eye Color Variation and Its Relevance to Forensic Pigmentation Predictive Tests The Genetics of Skin , Hair , and Eye Color Variation and Its Relevance to Forensic Pigmentation Predictive Tests." 327.
- Martín, Pablo et al. 2013. "Population Genetic Data of 30 Autosomal Indels in Central Spain and the Basque Country Populations." *Forensic Science International: Genetics* 7(2): 1–4.

- Martínez, J. Ma. Begoña. 1999. *La Prueba Del ADN En Medicina Forense*. 1ra ed. Barcelona, España: Masson.
- Martínez-Cortés, G. et al. 2010. "Origin and Genetic Differentiation of Three Native Mexican Groups (Purepechas, Triquis and Mayas): Contribution of CODIS-STRs to the History of Human Populations of Mesoamerica." *Ann Hum Biol* 37(6): 801–19.
- Martínez-Cortés, G., M. García-Aceves, et al. 2015. "Forensic Parameters of the Investigator DIPplex Kit (Qiagen) in Six Mexican Populations." *International Journal of Legal Medicine*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00414-015-1242-y>.
- Martínez-Cortés, G., L. Gusmão, et al. 2015. "Genetic Structure and Forensic Parameters of 38 Indels for Human Identification Purposes in Eight Mexican Populations." *Forensic Science International: Genetics* 17: 149–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.04.011>.
- McGilvery, Robert W. 1977. *Conceptos Bioquímicos*. 1ra ed. Barcelona, España: Reverté S. A.
- Mills, RE et al. 2006. "An Initial Map of Insertion and Deletion (INDEL) Variation in the Human Genome." *Genome research* 16: 1182–90.
- De Necochea, Rosalia, and Juan Carlos Canul. 2004. *Secuenciación de ácidos Nucleicos*. Cuernavaca, Morelos.
- Nelson, David L. (University of Wisconsin-Madison), and Michael M. (University of Wisconsin-Madison) Cox. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6th ed. New York: W. H. Freeman and Company.
- Neuvonen, Anu M., Jukka U. Palo, Minttu Hedman, and Antti Sajantila. 2012. "Discrimination Power of Investigator DIPplex Loci in Finnish and Somali Populations." *Forensic Science International: Genetics* 6(4): e99–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.09.005>.
- Pelt-Verkuil, Elizabeth, Alex Belkum, and John P. Hays. 2008. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. 1st ed. United States of America: Springer. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-4020-6241-4>  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6241-4_5).
- Relethford, John H. (State University of New York College at Oneonta). 2012. *Human Population Genetics*. 1st ed. eds. Matt Cartmill and Calle Brown. United States of America: Willey-BlackWell.
- Rubi-Castellanos, R. et al. 2009. "Pre-Hispanic Mesoamerican Demography Approximates the Present-Day Ancestry of Mestizos throughout the Territory of Mexico." *Am J Phys Anthropology* 139(3): 284–94.
- Salazar, Adriana, Ana Soledad Sandoval, and Juan Socorro Armendáriz. 2013. "Parte II. Metodología Del ADN Recombinante." In *Biología Molecular. Fundamentos Y Aplicaciones En Las Ciancias de La Salud*, Mexico: McGrawHill, 91–181.
- Shewale, Jaiprakash G., and Ray H. Liu. 2014. *Forensic DNA Analysis. Current Practices and Emerging Technologies*. 1st ed. United States of America: CRC Press.
- Solari, Juan A. 2004. *Genética Humana. Fundamentos Y Aplicaciones En Medicina*. 3ra ed. ed. Editorial Médica PANamericana. España.
- Sorensen, Amy et al. 2015. "Direct-to-PCR Tissue Preservation for DNA Profiling." *International Journal of Legal Medicine*: 7. <http://link.springer.com/10.1007/s00414-015-1286-z>.

- Stray, J. E., Y. Jason. Liu, Maxim G. Brevnov, and Jaiprakash G. Shewale. 2010. "Extraction of DNA from Forensic Biological Samples for Genotyping." *Forensic Science Review* 22: 159–75.
- Stray, J. E., & Shewale, J. G. 2010. "Extraction of DNA from Human Remains. ." *Forensic Science Review* 22: 177–85.
- Tanaka, M et al. 2000. "Usefulness of a Toothbrush as a Source of Evidential DNA for Typing." *Journal of forensic sciences* 45(3): 674–76.
- Watanabe, Yoshihisa et al. 2003. "DNA Typing from Cigarette Butts." *Legal Medicine* 5: S177–79.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1344622302001049> (February 23, 2016).
- Watson, James D, and Francis H C Crick. 1953. "Molecular Structure of Nucleic Acids." *Nature* 171(4356): 737–38. <http://www.nature.com/physics/looking-back/crick/>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13054692>.
- Webb, L G, S E Egan, and G R Turbett. 2001. "Recovery of DNA for Forensic Analysis from Lip Cosmetics." *Journal of forensic sciences* 46(6): 1474–79.
- Weber, James L et al. 2002. "Human Diallelic Insertion / Deletion Polymorphisms." *Am. J. Hum. Genet.* 72: 854–62.
- Wells, Jeffrey D., and Jamie R. Stevens. 2008. "Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology." *Annual Review of Entomology* 53(1): 103–20.  
<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.52.110405.091423>.
- Zupanič Pajnič, Irena et al. 2015. "Highly Efficient Automated Extraction of DNA from Old and Contemporary Skeletal Remains." *Journal of Forensic and Legal Medicine* 37: 78–86.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1752928X15002073> (November 17, 2015).

## Sitios electrónicos

- (a) APPLIED BIOSYSTEMS BY LIFE TECHNOLOGIES. *PrepFiler Express™ and PrepFiler Express BTA™ Forensic DNA Extraction Kits*. [en línea]. 2010. [fecha de consulta 15-Oct-2015]. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms\\_086049.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/cms_086049.pdf)
- (b) APPLIED BIOSYSTEMS BY LIFE TECHNOLOGIES. *Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit*. [en línea]. 2010. [fecha de consulta 15-Oct-2015]. Disponible en: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4391294\\_Quantifiler\\_Duo\\_UG.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4391294_Quantifiler_Duo_UG.pdf)
- FTA®TECHNOLOGY. *Preparing an FTA® Disc for DNA Analysis*. [en línea][fecha de consulta: 24-Feb-2016]. Disponible en: <http://www4.ncsu.edu/~rgfranks/research/protocols/FTA%20cards%20protocols/BD08%20-%20Preparing%20an%20FTA%20Disc%20for%20Analysis.pdf>.

- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA, INEGI. *Panorama Sociodemográfico de México 2015* [en línea] [fecha de consulta: 22-Feb-2016]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/Panorama2015/Web/Contenido.aspx#DistritoFederal09000>
- QIAGEN. *QIAamp® DNA FFPE Tissue Handbook*. [en línea]. 2010 [fecha de consulta 15-Oct-2015]. Disponible en: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=63a84dc7-d904-418e-b71a-1521cf318e82&lang=en>
- STROM, Tim M. y Wienker, Thomas F. *Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and tests for association*. [en línea] . Helmholtz Center Munich. Institute of Human Genetics. [fecha de consulta 15-Ene-2016]. Disponible en: <https://ihg5.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>

## 12. ANEXOS

### Anexo 1. Hoja de información al participante y formato de consentimiento informado



Hoja de Información al Participante



Proyecto de Investigación: "**Estudio genético de 30 polimorfismos Inserciones/Delecciones (InDels) y su aplicación forense en identificación humana para población del Distrito Federal, México**".

A cargo de: **M. en C. Mauro López Armenta**, Jefe de Unidad de Laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias Forenses (INCIFO), Tribunal Superior de Justicia del Distrito Federal (TSJDF).

Se solicita su participación en este proyecto de investigación, cuyo objetivo principal es: generar frecuencias alélicas para marcadores de tipo InDel en población del Distrito Federal, México para fines forenses de identificación humana. Cabe mencionar que el presente estudio genético es **UNICAMENTE** útil para fines de **IDENTIFICACION**, lo que **NO** implica la detección de enfermedades ni desordenes médicos genéticos.

En este estudio participan los servicios de: Laboratorio de Genética del INCIFO, TSJDF y se estima que participen un total de: 150 individuos. Su participación en el estudio es **totalmente voluntaria**. Si usted decide participar, se le realizará: Una toma de muestra de sangre y/o un arrastre de células de mucosa bucal. El ADN es una molécula que está presente en todas sus células porque lo ha recibido de sus padres y lleva un código en forma de "genes" que lo hacen diferente al resto de la población, ya que este código es único y específico de cada persona (excepto en casos de gemelos idénticos).

- La toma de muestra de sangre puede provocar una sensación de ardor en el punto en el que se introduce la lanceta en la piel, dicha sensación desaparece en pocos minutos después de la punción.
- La toma de muestra por arrastre de células de mucosa bucal es por medio de un citocepillo y no presenta ningún efecto de dolor durante o posterior la toma de muestra.

La muestra biológica que le sea tomada deberá incluir datos personales que serán útiles para la estadística de la presente investigación y será esta información, totalmente confidencial.

Se le pedirá su consentimiento para que con su muestra biológica:

1. Usted acepte que en el ADN de su muestra se estudien: InDel's especificados en el trabajo de investigación: "Estudio genético de 30 polimorfismos Inserciones/Delecciones (InDels) y su aplicación forense en identificación humana para población del Distrito Federal, México.
2. Sólo se utilice para: estudiar los InDel's especificados en dicho trabajo de investigación y que por tanto, No se realicen otros estudios con ella. Es entonces que: su muestra se destruirá después de completar la prueba.

Finalmente, usted debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando que acepta el estudio genético y firmando este documento antes de la obtención del ADN.

#### Formato de Consentimiento Informado

Título del trabajo de investigación:

**"Estudio genético de 30 polimorfismos Inserciones/Delecciones (InDels) y su aplicación forense en identificación humana para población del Distrito Federal, México"**.

Yo (nombre y apellidos) .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con personal autorizado por el M. en C. Mauro López Armenta

Y comprendo que mi participación es **voluntaria** y que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera.
2. Sin tener que dar explicaciones.

Así que **presto libremente mi conformidad** para participar en el estudio y me sea tomada una muestra de

Sangre      Saliva

Con la finalidad de que únicamente sea usada para los fines de la presente investigación.

Datos personales.

Sexo: .....      Edad: ..... años.      Lugar de nacimiento: .....

En el último mes, ¿ha recibido algún trasplante de órganos o transfusión sanguínea?

Sí    No

Identificación proporcionada.....

Fecha y firma del participante

Fecha y firma del investigador

**M. en C. Mauro López Armenta**  
J. de U. de Lab. De Genética INCIFO, TSJDF.



## Anexo 2. Extracción de ADN en muestras de saliva

1. En un tubo eppendorf de 2mL colocar ½ citocepillo y agregar:
  - 500µL de buffer de lisis DNA (Promega)
  - 10 µL de β-mercaptoetanol [48.7%] (Promega)
2. Incubar por 30 min a 65°C.
3. Centrifugar el tubo a 13 000rpm por 1 min.
4. Pasar el sobrenadante a una columna de sílica y centrifugarla a 12 000 rpm por 1 min.
5. Agregar 500µL de buffer de lavado y centrifugar 11 000 rpm por 1 min.
6. Volver a centrifugar 11 000 rpm por un minuto.
7. Agregar 100 µL de agua grado biología molecular.
8. Centrifugar a 11 000 rpm por 1 min.
9. Retirar la columna de sílica y mantener el extracto a 4°C.

## Anexo 3. Protocolo de amplificación Investigator® DIPplex (QIAGEN)

<b>REACTIVO</b>	<b>VOLUMEN</b>
Mix de reacción "A"	5.0 µL
Mix de primer's	5.0 µL
ADN polimerasa Multi Taq 2	0.6 µL
Agua libre de nucleasas	11.9 µL
ADN purificado	2.5 µL (1ng/µL)
<b>Volumen Total</b>	<b>25 µL</b>

- El Mix de reacción "A" contiene dNTP's, MgCl<sub>2</sub> y Albumina de Suero Bovino (BSA).

Anexo 4. Protocolo de corrimiento electroforético con el kit Investigator® DIPplex (QIAGEN)

1. Se realizó una mezcla de formamida y size standard (BTO) de acuerdo a la siguiente tabla :

<b>Componente</b>	<b>Volumen por pozo (muestra)</b>
Formamida	12 $\mu$ L
DNA size standard (BTO)	0.2 $\mu$ L

2. Agregar a cada pozo 0.7  $\mu$ L de producto de PCR.
3. En un pozo adicional, con formamida y size standard, agregar 0.8  $\mu$ L de Ladder DIPplex (QIAGEN) (escalera alélica).
4. Cargar la placa en el analizador genético con 4 segundos de inyección.