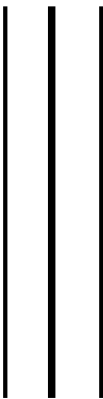


Facultad de Medicina



CIENCIA
FORENSE
UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE

Elaboración de un protocolo para el análisis del
polimorfismo de las regiones hipervariables I, II y III de la
región control del DNA mitocondrial para la identificación
forense

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN CIENCIA FORENSE

P R E S E N T A:

SAMANTHA VÁZQUEZ CORONA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ MARIANO GUARDADO ESTRADA

Ciudad Universitaria, CD. MX.
2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo me ha costado dos años de vida, dentro de los cuales experimenté muchos desvelos, sacrificios, frustraciones y deseos de querer dejarlo inconcluso. Sin embargo, al escribir la última página de esta tesis, me inundó un profundo sentimiento de auto admiración que sólo podría ser posible gracias al pequeño libro que está en sus manos en este momento.

En mi vida hay muchas personas que se desvelaron conmigo, me dieron ánimos de seguir, me escucharon, me leyeron y tuvieron una gran empatía conmigo y todo mi proceso de titulación. A ustedes les agradezco todas las bases emocionales que me brindaron para lograr concluir la carrera y derivado de ello, esta tesis.

Durante mi formación profesional, he tenido la fortuna de cruzarme con gente increíble que ahora puedo considerar como amistades: Susana, Lucero, Erik y Vero durante la carrera; Alexa, Gaby y Paty durante mi servicio social; Elena, Lore, Gloria y todxs mis compañerxs y superiores de la Fiscalía que han podido comprender lo complejo de elaborar una tesis y que me han tenido fe y paciencia. Les aprecio y admiro mucho.

Mención especial al Dr. Christian Cárdenas, por haber sido un apoyo dentro y fuera del laboratorio y por ser parte del proceso de aprendizaje durante esta investigación. Lo aprecio profundamente.

Por último y no menos importante, me gustaría mencionar a quien desde un inicio creyó en mí, tanto como para adoptarme, enseñarme y asesorarme para lograr esta propuesta de protocolo: el Dr. Guardado. Sin su paciencia, disposición, amabilidad, compromiso y exigencia, definitivamente no hubiese llegado así de lejos. Lo aprecio y admiro inmensamente.

A todxs ustedes, gracias por ayudarme en este último paso de mi licenciatura. Han hecho de mí una persona de la que estoy muy orgullosa.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
GLOSARIO	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVOS	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
MARCO TEÓRICO	9
Generalidades del DNA	9
<i>Variación genética</i>	10
<i>Recombinación genética</i>	10
<i>Mutaciones</i>	10
<i>Polimorfismos</i>	11
DNA mitocondrial	13
<i>Características del DNA mitocondrial</i>	14
<i>Polimorfismos en el DNA mitocondrial</i>	15
<i>Heteroplasmia</i>	16
<i>Región control</i>	16
Técnicas de biología molecular	17
<i>PCR</i>	17
<i>Secuenciación</i>	19
Lineamientos internacionales para el análisis de mtDNA	23
<i>Amplificación</i>	24
<i>Secuenciación</i>	25
<i>Nomenclatura</i>	26
<i>Heteroplasmia</i>	27
<i>Reporte de resultados y conclusiones del análisis</i>	28
Utilidad del análisis poblacional en el estudio de polimorfismos mitocondriales con fines forenses	30
<i>Genética de poblaciones en el análisis de mtDNA</i>	30
<i>Datos poblacionales del mtDNA para uso forense</i>	31

ANTECEDENTES	32
Identificación forense a través de la prueba genética	32
Análisis de mtDNA en la práctica forense	34
<i>Aplicaciones del mtDNA en la identificación forense</i>	35
Aplicaciones de mtDNA en México	39
METODOLOGÍA	40
Control de calidad	41
Procedimiento de estandarización	41
<i>Extracción y amplificación</i>	41
<i>Secuenciación</i>	53
Análisis de los datos	56
Análisis poblacional	72
<i>Polimorfismo mitocondrial</i>	72
<i>Agrupamiento de haplotipos</i>	76
<i>Haplogrupo A2</i>	77
<i>Haplogrupo B</i>	78
<i>Haplogrupo D1</i>	81
Red de haplotipos mitocondriales	83
CONCLUSIONES	88
PERSPECTIVAS	90
BIBLIOGRAFÍA	93

ABREVIATURAS

ATP. Adenosín trifosfato.

A/T. Adenina/Timina.

CODIS. Sistemas de Índice Combinado de ADN, del inglés Combined DNA Index System.

dATP. Desoxiadenosín trifosfato.

DNA. Ácido desoxirribonucleico, del inglés Desoxyribonucleic Acid.

ddNTP. Dideoxinucleótido.

dCTP. Desoxicitidina trifosfato.

dGTP. Desoxiguanosina trifosfato.

dNTPs. Deoxinucleósidos trifosfatos.

dTTP. Desoxitimidina trifosfato.

G/C. Guanina/Citosina.

HVR-I. Región Hipervariable I del DNA mitocondrial, del inglés: Hypervariable Region I.

HVR-II. Región Hipervariable II del DNA mitocondrial, del inglés: Hypervariable Region II.

HVR-III. Región Hipervariable III del DNA mitocondrial, del inglés: Hypervariable Region III.

IUPAC. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, del inglés: International Union of Pure and Applied Chemistry.

Kb. Kilobase

LR. Razón de Verosimilitud, del inglés Likelihood Ratio.

mtDNA. Ácido desoxirribonucleico mitocondrial, del inglés mitochondrial Desoxyribonucleic Acid.

MSN. Red de expansión mínima, del inglés: Minimum Spanning Network.

N. Número total de individuos dentro de una muestra/población.

nucDNA. Ácido desoxirribonucleico nuclear, del inglés nuclear Desoxyribonucleic Acid.

pb. pares de bases

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction.

pH. Potencial de Hidrógeno.

rCRS. Secuencia de Referencia de Cambridge revisada, del inglés: revised Reference Sequence.

rRNA. Ácido ribonucleico ribosomal, del inglés ribosomal Ribonucleic Acid.

tRNA. Ácido ribonucleico de transferencia, del inglés transfer Ribonucleic Acid.

SNP. Polimorfismo de un solo nucleótido, del inglés Single Nucleotide Polymorphism.

STR. Repeticiones cortas en tándem, del inglés Short Tandem Repeats.

Taq. *Thermus aquaticus*.

VNTR. Número variable de repeticiones en tándem, del inglés Variable Number of Tandem Repeats.

GLOSARIO

Agentes mutágenos. Componente físico o puede producir alteraciones en el material genético (Bonilla & González, 2015).

Alelo. Variante de un gen en particular (Abrams et al., 2013).

Amplicón. Fracción de material genético que resulta de un proceso de amplificación (Claros et al., 2004).

Base nitrogenada. Molécula componente de la estructura del DNA. Puede ser adenina, guanina, citosina, timina (DNA) o uracilo (RNA) (Martínez, 2010; J. Vázquez, 2016).

Cromosoma. Complejo formado por DNA y proteínas que se encuentra en el núcleo celular de organismos eucariontes (Trejo & Sánchez, 2012).

Deriva génica. Cambio aleatorio en las proporciones de los alelos en una población, de una generación a la otra (Eguiarte et al., 2013).

Electroforesis. Técnica de separación con base en el tamaño, densidad y carga eléctrica de una molécula (Montalvo & Lugo, 2016).

Electroforesis capilar. Técnica de separación basada en el desplazamiento de las moléculas en un tubo capilar, cuando son sometidas a un campo eléctrico (Osatinsky, 2007).

Electroforesis en gel. Técnica de separación que utiliza una corriente eléctrica y un gel (que puede ser de poliacrilamida o agarosa), cuyos poros actúan como un filtro que permite que las moléculas más pequeñas se muevan con mayor rapidez que aquellas que son más grandes (Fierro, 2014).

Exón. Región de un gen que codifica aminoácidos (Castaño et al., 1996).

Frecuencia alélica. Número de veces que un alelo es observado dentro de una población (Ranjan & Gautam, 2018).

Gen. Unidad básica de la herencia (Crespo, 2010).

Genoma. Conjunto de todo el material genético de un organismo (López et al., 2005).

Haplotipo. Conjunto de polimorfismos de DNA dentro de un individuo y que generalmente se heredan como una unidad (Benavides & Guénet, 2003a).

Haplogrupo. Haplotipos definidos por combinaciones de SNPs en el genoma mitocondrial que se heredan de un ancestro común, resultando en una acumulación de mutaciones que se heredan a través del linaje materno (Mitchell et al., 2014).

Heteroplasmia. Presencia de más de un haplotipo de mtDNA dentro de una misma mitocondria, célula, un mismo tejido o individuo (Parakatselaki & Ladoukakis, 2021).

Hotspot. Del inglés. Hace referencia a cualquier región en la secuencia del DNA que es susceptible a mutar con frecuencia (Benavides & Guénet, 2003b).

Intrón. Parte del gen que no codifica ningún aminoácido (Ghosh & Sinha, 2017).

Locus. La ubicación específica de un gen o de una secuencia del genoma en un cromosoma (Rodríguez & Raventós, 2009).

Loci. Plural de locus (Benavides & Guénet, 2003a).

Marcador genético. Fragmento de DNA con una ubicación identificable y cuya herencia se puede rastrear (Cornejo et al., 2014).

Microsatélites. Secuencias de nucleótidos repetidas en tándem, con una longitud de 1 a 10 pares de bases, y que constituyen parte de las regiones repetitivas del genoma (Vieira et al., 2016).

Minisatélites. Secuencias de nucleótidos repetidas en tándem, con una longitud de 11 o más pares de bases, y que constituyen parte de las regiones repetitivas del genoma (Vieira et al., 2016).

Mutación. Alteración en una secuencia de DNA que puede causar efectos dañinos en el organismo que los presenta (Johnston, 2006), y que suelen ser ocasionados por una ineficiencia en la reparación del DNA al momento de la replicación, así como por agentes bióticos y abióticos.

Nucleótido. Es la conjunción de una base nitrogenada, una molécula de azúcar (llamada ribosa, si se trata de RNA; o desoxirribosa si se trata de DNA) y un grupo fosfato (J. Vázquez, 2016).

Pasos mutacionales. Se refiere a cuántas mutaciones ha sufrido la secuencia del genoma mitocondrial entre un haplotipo y otro (Duarte, 2018).

Perfil genético. Combinación de genotipos para múltiples loci (Tadeo, 2013).

Polimorfismo. Variación en la secuencia de DNA presente en al menos el 1% de la población analizada (Checa, 2007).

Probabilidad de coincidencia al azar. Probabilidad de que dos personas elegidas al azar dentro de la población tengan el mismo genotipo (A. W. Hernández & Trejo, 2014) o haplotipo.

Recombinación. Intercambio de fragmentos de DNA entre cromosomas u otras moléculas de DNA (Carroll, 2013), que resultan en un nuevo arreglo del material genético.

Stock. Término utilizado para referirse al concentrado de una sustancia en particular.

Templado. Cadena de DNA utilizada como base o molde por las polimerasas para unir las bases complementarias durante la amplificación del DNA (Corvalán, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a su alto poder de discriminación, los marcadores nucleares de STRs son comúnmente empleados en la genética forense para realizar identificaciones humanas. Sin embargo, en aquellos casos en donde se encuentren muestras deterioradas, degradadas o en pequeñas cantidades, es difícil obtener perfiles de STRs informativos. En estos casos, el DNA mitocondrial (mtDNA) es susceptible de ser caracterizado con mayor facilidad y con ello, resulta de utilidad para establecer relaciones de parentesco a través de la línea materna (National Institute of Justice, 2015). El mtDNA presenta un alto número de copias, una tasa de mutación alta y se puede extraer de hueso, diente y cabello sin folículo. No obstante, analizar el polimorfismo mitocondrial suele ser complicado en el laboratorio, debido a que no sólo requiere el cumplimiento de los estándares de calidad, sino también cumplir con las recomendaciones internacionales específicas para este marcador.

Para analizar este marcador con fines forenses, rutinariamente se lleva a cabo la secuenciación de las regiones hipervariables I y II (HVR I y II), que se encuentran en la región de control del genoma mitocondrial. Estas regiones son altamente polimórficas y además permiten identificar los haplogrupos mitocondriales a los que pertenece el individuo analizado (Budowle et al., 2003).

Aunque en México existen algunas bases de datos de los polimorfismos de estas dos regiones hipervariables, poco se conoce de los polimorfismos de la región hipervariable III (HVR III) en la población mexicana. Analizar los polimorfismos de las tres regiones hipervariables del mtDNA podría incrementar el poder de discriminación de este marcador. Por tal motivo, se diseñó e implementó un protocolo de laboratorio para el análisis de los polimorfismos de las tres regiones hipervariables del mtDNA que cumple con los estándares de calidad necesarios.

JUSTIFICACIÓN

En México, en el periodo del 2018 al 2020, se reportaron 1,257 fosas localizadas en diversas entidades federativas, de las cuales se logró la exhumación de 1,957 cuerpos, siendo sólo 806 los que han sido identificados (Secretaría de Gobernación, s. f.). Estos cuerpos sin identificar, se añaden a los 38,713 que se han reportado como no identificados desde el año 2006 (Tzuc & Turati, 2020).

Aunque con los sistemas de identificación humana basados en STRs autosómicos se puede incrementar el porcentaje de identificación de los restos de estas fosas, no siempre las muestras se encuentran en condiciones óptimas. Además, existen casos en los que estos restos han sido dañados intencionalmente por agentes físicos o químicos, lo cual podría dificultar la obtención de perfiles de STRs.

A pesar de poder utilizar mtDNA en estas situaciones, no todos los laboratorios cuentan con la capacitación y protocolos necesarios para su análisis. La elaboración de un protocolo de libre acceso para el análisis de polimorfismo mitocondrial, ayudaría a implementar de manera rutinaria el uso de este marcador en la práctica forense. Además, este protocolo sería empleado para la generación de una base de datos poblacional mexicana del polimorfismo de las regiones hipervariables del mtDNA, que sería desarrollada en el Laboratorio de Genética de la Licenciatura en Ciencia Forense.

OBJETIVOS

Objetivo general

Elaborar un protocolo experimental para el análisis de las regiones hipervariables I, II y III del mtDNA.

Objetivos específicos

- 1) Diseñar un protocolo para el análisis de los polimorfismos de las regiones hipervariables I, II y III del mtDNA.
- 2) Estandarizar el protocolo diseñado en el Laboratorio de Genética de la Licenciatura en Ciencia Forense.
- 3) Analizar los resultados obtenidos de la estandarización del protocolo para el análisis de las tres regiones hipervariables del mtDNA en una muestra de individuos mestizo-mexicanos.

MARCO TEÓRICO

Generalidades del DNA

Un ser humano promedio está compuesto de aproximadamente 100 trillones de células, y a su vez, cada una de ellas contiene el material genético que individualiza a las personas, el cual está constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA) (Butler, 2005), y resulta ser el material de estudio de la Genética.

El DNA nuclear (nucDNA) ha sido el más estudiado y utilizado hasta la actualidad, pues los marcadores genéticos que alberga permiten obtener una gran cantidad de información sobre un individuo en particular, haciéndolo útil para estudios poblacionales, pruebas de identificación con fines de individualización, estudiar la variabilidad genético entre y dentro de las diversas especies, entre otras cuestiones (D.-X. Zhang & Hewitt, 2003). En 1990 dio inicio al proyecto llamado “Genoma Humano”, en donde los investigadores buscaban su decodificación mediante la obtención de secuencias de manera simultánea en diversos centros involucrados, llegando a su conclusión en el año 2001. El resultado de este trabajo fue una porción consenso de 3.2 Gb, de la cual, el 1.1% comprendía exones, 24% intrones y el 75% era DNA intragénico (León, 2020; Venter et al., 2001) (Diagrama 1).

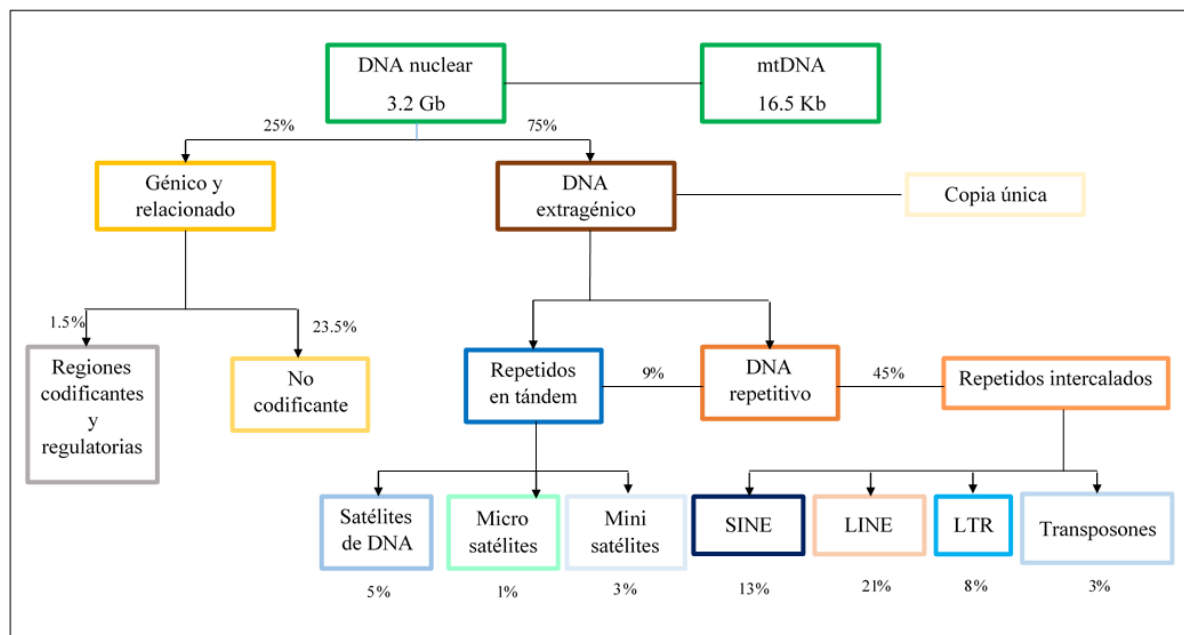


Diagrama 1. Clasificación del genoma humano. Se muestran las categorías de DNA que se encuentran en el genoma humano, de acuerdo a su estructura y secuencia, así como el porcentaje en el que se encuentran cada uno (W. Goodwin et al., 2011).

Variación genética

Los seres humanos compartimos muchas características básicas, sin embargo, existe un amplio rango de variación en los rasgos que poseemos, los cuales suelen ser influenciados por muchos factores ambientales y genéticos (NHGRI, 1999).

La variación genética se refiere a las diferencias que pueden existir entre poblaciones u organismos, como resultado de las diferentes formas que puede presentar la secuencia de DNA (Ritu & Mohapatra, 2018). Aun cuando todos los humanos poseemos la misma cantidad de pares de bases (pb), entre dos individuos de nuestra especie la variación genética es cerca del 0.1%, es decir, que aproximadamente 1 de cada 1,000 pb serán diferentes (NHGRI, 1999). Estas diferencias, que una vez formadas, son heredables (Teama, 2018), surgen principalmente de la recombinación y mutaciones.

Recombinación genética

La recombinación genética es un proceso que permite la reorganización de fragmentos de DNA, produciendo nuevas combinaciones de alelos (Burks et al., 2020; Rajesh Kumar Sharma & Choudhary, 2017). Esto quiere decir que los arreglos de los alelos heredados de cada progenitor no son preservados, sino que las nuevas células llevan cromosomas con nuevas variaciones de los diversos genes.

Mutaciones

Los cambios en las porciones codificantes del DNA pueden alterar las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Las modificaciones en las regiones no codificantes del DNA tienen el potencial de cambiar la expresión de algunos genes (Schleif, 1993), es decir, que a pesar de que esas regiones no tienen relación directa con la generación de proteínas, pueden influir en la forma en que aquellos genes que sí la tienen, expresen una proteína (por ejemplo, en la abundancia de esta). Por lo tanto, cualquier proceso celular que utilice alguna secuencia de DNA puede ser afectado por una mutación.

A pesar de la existencia de mutaciones a lo largo del genoma, estos se mantienen estables, por lo que las funciones celulares no se ven afectadas. La secuencia de DNA que se encuentra en las células de los diversos tejidos y órganos del cuerpo, en gran parte, es idéntica, sin embargo, las diferencias localizables existen gracias a los procesos mutacionales (Winters-Miner, 2015), que pueden generarse a partir de errores en la replicación, o por la interacción del genoma con diversos agentes mutágenos.

Las mutaciones que comúnmente pueden localizarse son las sustituciones, en donde existe el cambio de una base nitrogenada por otra distinta. Las inserciones se presentan a partir de la adición de uno o más nucleótidos en una posición particular, mientras que las deleciones implican la pérdida de estos. Por último, vale la pena mencionar las transposiciones, que son un tipo de mutación dada a partir de la ruptura de un fragmento en la molécula de DNA, que posteriormente se unirá en un sitio distinto del cual se localizaba (Hardison, 2008b, 2008a).

Polimorfismos

Tal como se mencionó en párrafos anteriores, existe una pequeña fracción de DNA (~10 millones de nucleótidos) que difiere entre personas. Esto permite usar la información genética contenida en ella para cuestiones de identificación humana, ya que parte de esta porción variable del genoma está constituida por polimorfismos. Hay dos posibles formas de polimorfismos a nivel de DNA: de secuencia y de longitud. Dentro de ellas, pueden encontrarse diversas variaciones con características particulares (Cuadro 1).

Tipo de polimorfismo	Nombre del polimorfismo	Características	Ejemplo
Secuencia	SNP	Puede estar presente como delección, inserción o sustitución (Marwal & Gaur, 2020).	--TTC T ATCG-- --TTC C ATCG--
Longitud	STR	Microsatélite. Tiene unidades de repetición con una longitud de 2-6 pb (Butler, 2005)	--- (AATG) (AATG) (AATG) --- - <i>3 repeticiones</i> <i>STR simple</i>
		Componen el 3% del genoma total (Butler, 2005) Para ser analizado, se requiere una pequeña cantidad de DNA (Marwal & Gaur, 2020).	--- (AATG) (AGCA) (AATG) (AGCA)) --- <i>Compuesto de 2+ unidades</i> <i>STR compuesto</i>
	VNTR	Minisatélite. Tiene unidades de repetición con una longitud de 7-100 pb (W. Goodwin et al., 2011) Para ser analizado, se requiere una gran cantidad de DNA (Marwal & Gaur, 2020)	---- (ATTCGTG) (ATTCGTG) (ATTCGTG) (ATTCGTG) ---- <i>4 repeticiones</i>

Cuadro 1. Clasificación de polimorfismos. Se muestran algunos de los polimorfismos presentes en el genoma humano, clasificados por su variación en secuencia o por su longitud. También se muestran algunas de las características que poseen y un ejemplo.

DNA mitocondrial

Como se expresa en el Diagrama 1, además del nucDNA, los seres humanos tenemos otro tipo de material genético, que se encuentra dentro de las mitocondrias (organelo ubicado dentro de las células eucariotas, encargadas de producir el ATP) (Taanman, 1999).

Descubierto en 1963 por Margit y Sylvan Nass, el DNA mitocondrial (mtDNA) es una molécula pequeña (en comparación con el nucDNA) de aproximadamente 5µm y con forma circular. Tiene una longitud de 16,569 pb, codifica para 37 genes, de los cuales 13 están orientados a la producción de proteínas, 22 para tRNA y dos para rRNA (Mishra, 2018). En su mayoría se trata de DNA codificante compuesto por ~15,447 pb, sin embargo, existe una región no codificante de 1,122 pb conocida como “D-loop”, en la cual se encuentra el sitio de inicio de la replicación, lo que ha llevado a conocerle también con el nombre de “región control” (Figura 1) (W. Goodwin et al., 2011).

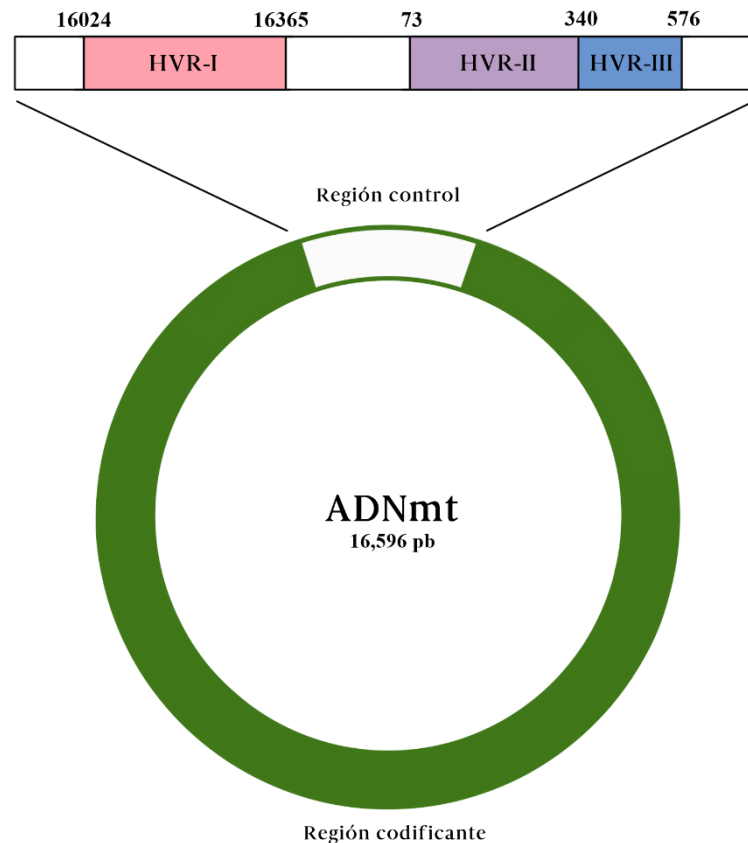


Figura 1. Genoma mitocondrial. Las regiones hipervariables I, II y III están localizadas dentro de la región control. Otras regiones del genoma que son utilizadas para identificación forense son las regiones codificantes para los rRNAs 12S y 16S y el gen del citocromo *b* (W. Goodwin et al., 2011).

Características del DNA mitocondrial

Dentro de una célula, pueden existir varias mitocondrias, las cuales contienen el material genético propio de este organelo, estimándose un valor entre cientos y miles de copias de mtDNA dentro de una sola célula, aunque este número puede variar, dependiendo el tipo de célula del que se trate (Butler, 2012). Estos valores se mantienen como aproximados, pues el número de estas moléculas de material genético es variable al tipo de célula (Robin & Wong, 1988), a diferencia del nucDNA, que se encuentra presente en dos copias por cada célula (Butler, 2005).

Las características que posee el mtDNA (Cuadro 2) hacen que sea una excelente opción de estudio como marcador genético al hablar de muestras biológicas que se encuentren degradadas. El genoma mitocondrial puede ser estudiado a partir de diversas fuentes biológicas, como cabello, diente y hueso, lo que también representa una ventaja, pues en un contexto forense, este tipo de indicios suelen ser localizados frecuentemente.

Características	nucDNA	mtDNA
Porcentaje total de DNA contenido por cada célula	99.75%	0.25%
Estructura	Linear; compactado en cromosomas	Circular
Heredado por	Madre y padre	Madre
Pareo cromosomal	Diploide	Haploide
Reparación en la replicación	Sí	No
Único	Único para cada individuo (excepto gemelos idénticos)	No es único para cada individuo (idéntico en linajes maternos)
Tasa de mutación	Baja	De 5 a 10 veces mayor que en el nucDNA

Cuadro 2. Comparación entre el nucDNA y el mtDNA. Se muestran algunas características que poseen tanto el nucDNA como el mtDNA (Butler, 2005).

Que el mtDNA sea heredado únicamente por vía materna indica que no lleva a cabo recombinación genética generacional, como sucede con el nucDNA. Cuando ocurre la fecundación, la mayoría de las veces sólo ingresa al óvulo la cabeza del espermatozoide (porción que contiene el núcleo celular), dejando fuera la pieza intermedia (porción que contiene las mitocondrias) y el flagelo. De esta forma, el total del material genético del cigoto tras la fecundación, consiste en dos copias del nucDNA (paterno y materno) y una sola copia de mtDNA (materno).

Las excepciones a la situación planteada anteriormente vienen al momento de la fertilización, cuando existe la posibilidad de que entre al óvulo una fracción muy pequeña de la pieza intermedia del espermatozoide, sin embargo, la enzima CPS-6 (endonucleasa G) se encarga de la eliminación selectiva del mtDNA paterno, que consiste en la despolarización de las mitocondrias paternas, perdiendo así la integridad de su membrana interna, lo que parece generar una marca autofágica. Posteriormente, la CPS-6 entra desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial, permitiendo la degradación del mtDNA paterno, preservando así únicamente el genoma mitocondrial materno (Taanman, 1999; Q. Zhou et al., 2016).

Polimorfismos en el DNA mitocondrial

Tal como se muestra en el Cuadro 2, el genoma mitocondrial posee una tasa de mutación de 5 a 10 veces más alta que el nucDNA, existiendo aproximadamente 1.70×10^{-8} sustituciones por sitio/año en todo el genoma (sin contar la región control) (Ingman et al., 2000). Esta característica se debe a la exposición del mtDNA a: especies reactivas de oxígeno, producto de la fosforilación oxidativa; a la diferencia en el proceso de reparación del genoma mitocondrial en contraste con la que es realizada sobre el nucDNA; y a una alta tasa de replicación, generando así heteroplasmias (Chinnery & Hudson, 2013; W. Goodwin et al., 2011).

Heteroplasmia

La heteroplasmia es comúnmente observada en el mtDNA de los humanos, es decir, que albergamos más de un genotipo mitocondrial con patrones específicos que pueden transmitirse o suprimirse dentro de la línea de herencia materna (Stewart & Chinnery, 2021). Existen dos tipos de heteroplasmia: de longitud y de secuencia/de sitio. La primera es descrita como la co-existencia de por lo menos dos tipos diferentes de mtDNA hallados en un mismo extracto de DNA, y que difieren en el número de nucleótidos, afectando así su longitud (Berger et al., 2011). La segunda ocurre cuando en una posición en particular dentro de alguna secuencia hay una base distinta (Quintero Ferrer et al., 2019). La heteroplasmia de sitio ha sido observada dentro de la región control en aproximadamente el 6% de individuos, cuando el mtDNA fue extraído de muestras de sangre o hisopados bucales. Las posiciones de la región control en donde se ha observado la heteroplasmia de sitio con mayor frecuencia, son consistentes con las posiciones con mayores tasas de sustitución (Just, Irwin, et al., 2015).

Esta variedad de distintos tipos de genoma mitocondrial, en humanos, suele tener relación con enfermedades mitocondriales, pues puede ser encontrada en la región codificante del mtDNA (detectada en aproximadamente 1 de cada 25 humanos); sin embargo, también se ha descubierto heteroplasma presente en la región no codificante de este genoma (Parsons et al., 1997; Stewart & Chinnery, 2021).

Región control

Dentro de la región control se encuentran algunos bloques de DNA altamente conservados y otros que son altamente polimórficos, conocidos como las regiones hipervariables (HVR I y II), que representan los marcadores genéticos con mayor poder de discriminación de interés forense en el mtDNA. Existe una tercera región hipervariable (HVR III), que hasta ahora sólo ha sido utilizada en casos donde las HVR I y II no tienen el poder de discriminación suficiente para distinguir haplotipos (Butler, 2005; W. Goodwin et al., 2011; Parson et al., 2014).

El conocimiento de los polimorfismos del mtDNA toma relevancia al hablar de haplotipos y haplogrupos. Debido a que la herencia es uniparental, los haplogrupos mitocondriales son altamente susceptibles a la deriva génica. Esto da lugar a que existan grandes diferencias entre los patrones de los haplogrupos, dependiendo del área geográfica a la que pertenezca la población de estudio (Røyrvik et al., 2016).

Técnicas de biología molecular

Parte importante sobre el análisis de los polimorfismos mitocondriales recae en la selección de las técnicas de biología molecular que permitan un acercamiento idóneo hacia el material de estudio.

PCR

Una de las herramientas moleculares que permitió la mejora del análisis del material genético fue la PCR. Inventada por Kary Mullis y Michael Smith en 1985, la Reacción en Cadena de la Polimerasa permite amplificar un segmento particular de cualquier secuencia del genoma (W. Goodwin et al., 2011).

La replicación del genoma es un proceso bioquímico que sucede antes de la división celular, y por el cual se obtienen dos copias idénticas del DNA “original”. Para lograrlo, diversas moléculas interactúan con el material genético, como son las enzimas, siendo algunas de ellas (Simion, 2018):

- 1) Helicasa: su función es separar las dos hebras de DNA para que pueda actuar la DNA polimerasa.
- 2) DNA polimerasa: se encarga de replicar la molécula de DNA para la síntesis de una nueva hebra.
- 3) Primasas: indican la posición en la que la DNA polimerasa debe iniciar la replicación.

La técnica de PCR simula las condiciones del proceso de replicación del DNA que se lleva a cabo dentro de las células, apoyándose del uso de distintos componentes, como son (Serrato et al., 2014):

- 1) Cebadores: fragmentos de nucleótidos que simulan la función de las primasas, es decir, que indican la región que se amplifica. Son sintetizados en laboratorios, y deben cumplir algunas características: tener una longitud de 18-30 bases; no deben ser complementarios entre ellos; y tener la secuencia adecuada para favorecer su unión al templado.
- 2) DNA polimerasa: simula la función de la polimerasa que se encuentra dentro de la célula, es decir, que incorpora los nucleótidos a la nueva cadena durante la amplificación. Inicialmente, se utilizaron DNA polimerasas aisladas de *E. coli*, las cuales resultaron poco eficientes, pues su sensibilidad a las altas temperaturas ocasionaban su desnaturalización en cada ciclo, y por ello debían añadirse enzimas frescas. Años después, se lograron aislar DNA polimerasas del organismo *Thermus aquaticus*, cuyas propiedades (principalmente su alta estabilidad térmica) permiten su uso funcional durante todo el proceso de PCR (que involucra el uso de altas temperaturas y el cambio de estas), lo cual ha facilitado que sea utilizada hasta el día de hoy.
- 3) Buffer: estabiliza la reacción al proporcionar la capacidad amortiguadora para lograr la amplificación. Mantiene el valor de pH entre 8.3 y 8.8 a temperatura ambiente (Gupta, 2019), pero durante la reacción, puede llegar a tener un valor aproximado de 7.2, que es idóneo para que la polimerasa realice su función (Sambrook & Russell, 2001). Generalmente se trata de Tris-Cl.
- 4) Cationes mono y/o divalentes: cofactores necesarios para la actividad enzimática de la DNA polimerasa. El catión mayormente utilizado para la reacción de amplificación es el $MgCl_2$, pues estabiliza la unión de cebadores-templado. Generalmente su concentración oscila entre 1.5-2.5 mM (W. Goodwin et al., 2011).
- 5) DNA “molde” o “templado”: fragmento de DNA que es amplificado.

- 6) dNTPs: son el sustrato de la DNA polimerasa para la síntesis de nuevas cadenas de DNA (dATP, dGTP, dCTP y dTTP, uno por cada base nitrogenada que compone al DNA) (Tamay de Dios et al., 2013).

La mezcla de los componentes mencionados anteriormente es puesta en un tubo de PCR, que será introducido en el termociclador, que es un instrumento que cuenta con bloques térmicos con pozos para tubos de 0.2 mL, y que aumenta o disminuye la temperatura de dichos bloques de acuerdo con el orden de las temperaturas previamente programadas, brindando así las condiciones necesarias para que la PCR realice sus tres etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación.

La desnaturalización consiste en elevar la temperatura para permitir que las hebras del DNA se separen. El alineamiento se da cuando la temperatura disminuye (generalmente entre 50-65°C, esta temperatura dependerá de la cantidad de G/C y A/T de los cebadores) permitiendo que los cebadores se unan al templado de DNA que se va a amplificar. Por último, la elongación ocurre al momento de llevar la temperatura a 72°C, que es la necesaria para que la *Taq* polimerasa pueda actuar incorporando nucleótidos complementarios a la cadena molde (Garibyan & Avashia, 2013; Sambrook & Russell, 2001).

Secuenciación

Así como existía la necesidad de tener una forma de amplificar el material genético, persistía la necesidad de una técnica que permitiera conocer su secuencia, por lo que se desarrollaron técnicas de secuenciación.

En 1949, se contemplaba la importancia de la secuenciación de cadenas proteicas, debido a que el orden de los arreglos que presentaban parecían aleatorios, pero significativos sobre la acción fisiológica de estos (Hutchison, 2007). Posteriormente, con el descubrimiento de la estructura del DNA en 1953, se buscó aplicar en ésta área el avance en secuenciación de proteínas, sin embargo, los resultados no fueron fructíferos, pues las moléculas de DNA son mucho más grandes y están compuestas por un menor número de unidades que se parecen

entre ellas, lo que dificulta su distinción (Heather & Chain, 2016). De hecho, los esfuerzos por aplicar las técnicas de química analítica al descubrimiento de la secuencia de nucleótidos no dieron resultados positivos hasta 1965, que Robert Holley y colaboradores lograron producir la primer secuencia de ácidos nucleicos pertenecientes al tRNA de alanina de *Saccharomyces cerevisiae* (Holley et al., 1965), levadura utilizada en la elaboración de pan y bebidas alcohólicas (Suárez et al., 2016).

Gracias a investigaciones posteriores (Brownlee & Sanger, 1967; Sanger et al., 1965; Wu & Kaiser, 1968), se pudo lograr una separación de los nucleótidos mediante electroforesis con gel de poliacrilamida, que fue integrado en el protocolo de Alan Coulson y Sanger: el sistema *plus and minus* (Heather & Chain, 2016; Sanger & Coulson, 1975). Este comprendía el uso de una DNA polimerasa de *E. coli* y otra del bacteriófago T4 para sintetizar cadenas de DNA a partir de un templado para generar varios grupos de moléculas de DNA y de diversas longitudes que posteriormente pudieran ser separadas por el gel de poliacrilamida (Sanger & Coulson, 1975). Usando esta técnica fue que Sanger y colaboradores lograron secuenciar el primer genoma nuclear, perteneciente al bacteriófago ϕ X174 (Sanger et al., 1977).

Para 1977, Fred Sanger y colaboradores implementaron una modificación en este método de secuenciación, a través de la polimerización enzimática: la secuenciación de terminadores de cadena (França et al., 2002), también conocida como “secuenciación de Sanger”. La reacción se lleva a cabo con el uso de una DNA polimerasa, dNTPs y ddNTPs que estuvieron marcados radiactivamente. Estos ddNTPs carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', que impiden la extensión de la cadena más allá de este punto (Heather & Chain, 2016).

Esta secuenciación comienza con la repartición del templado de DNA en cuatro diferentes reacciones que contienen dNTPs, ddNTPs, DNA polimerasa y los cebadores (los cuales se encontraban radiomarcados). Se utilizan cuatro tubos diferentes, pues cada uno corresponde a un tipo distinto de dideoxinucleótido, es decir, ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP (França et al., 2002; Karger & Guttman, 2009). La característica de estos ddNTPs es

que carecen de un grupo hidroxilo en el carbono 3' de la pentosa, lo que los convierte en una “señal de paro” una vez que son incorporados en una cadena de DNA que se está sintetizando, al evitar que exista un enlace fosfodiéster con el dNTP que debería continuar la cadena (Sambrook & Russell, 2001).

La polimerasa une los dNTPs al templado hasta que se encuentra con un ddNTP, terminando así con la integración de la nueva cadena y dando como resultado diversos fragmentos de diferentes tamaños y pesos (Figura 2), que son separados por medio de un gel de poliacrilamida.

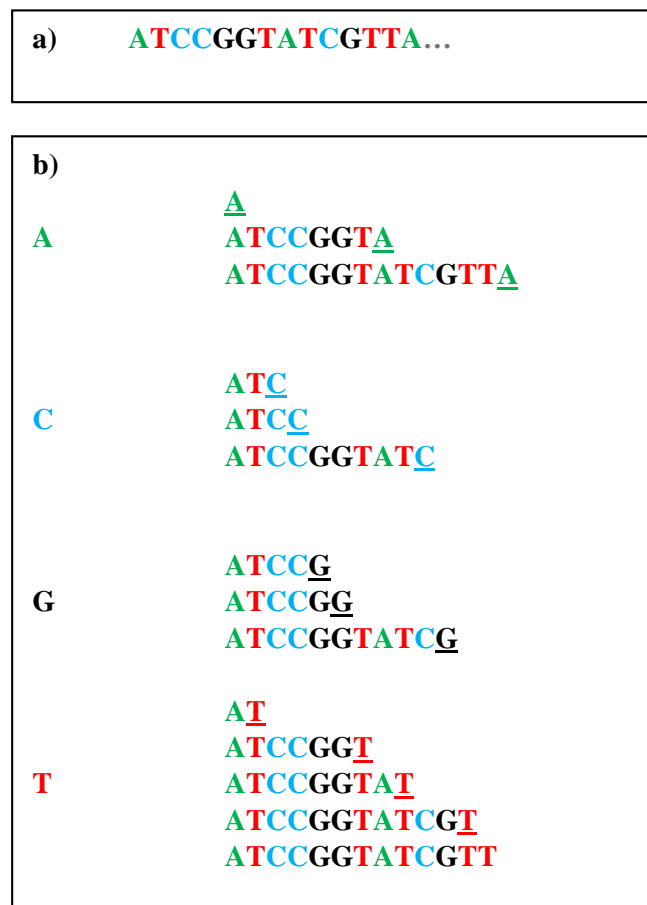


Figura 2. Ejemplo de una secuencia de DNA obtenida mediante secuenciación de Sanger. a) Representación de una fracción de la secuencia obtenida, siendo A, C, G y T las bases nitrogenadas que la componen. b) Las 14 filas representan los distintos fragmentos sintetizados de esa sección específica del genoma. La letra “A” representa la reacción que contiene ddATP, la letra “C” representa la reacción que contiene ddCTP, la letra “G” representa la reacción que contiene ddGTP, y la letra “T” representa la reacción que contiene dTTP. Cada letra subrayada indica la posición en la que la polimerasa detuvo la síntesis, mostrando la base nitrogenada que corresponde a ese lugar en particular.

Posteriormente, se hicieron modificaciones a la secuenciación de Sanger, que incluyen el marcaje de los ddNTPs con fluorocromos, sustituyendo el marcaje de los cebadores. Los ddNTPs fluoromarcados emiten luz a distintas longitudes de onda al utilizar un rayo láser sobre ellos (Smith et al., 1986). Otra modificación hecha es el cambio de la electroforesis en geles de poliacrilamida, por electroforesis capilar para la lectura de la secuencia (Karger & Guttman, 2009). Estas últimas modificaciones son utilizadas por equipos de secuenciación, que a través de su detector reciben la emisión de fluorescencia de los fluorocromos que marcan los ddNTPs, indicando el orden de los nucleótidos posteriormente observados con la ayuda de un equipo de cómputo mediante la elaboración de un electroferograma (Figura 3).

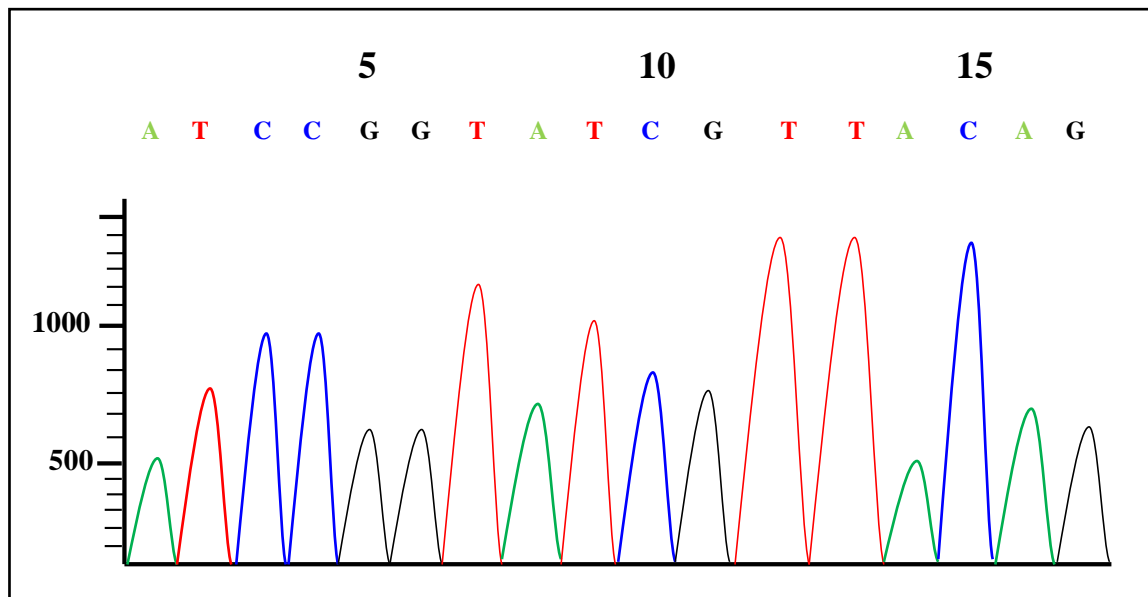


Figura 3. Ejemplo de un electroferograma obtenido por un equipo de cómputo después del proceso de secuenciación de Sanger. Un electroferograma está constituido por picos de distintos colores, cada uno de ellos correspondiente a una base nitrogenada (A, T, C o G). A cada base le corresponde un color particular (verde para adenina; rojo para timina; azul para citosina; y negro para guanina) sobre cada uno de los picos, se encontrará la letra que concuerda con el pico detectado por el equipo, es decir, el pico verde tendrá una “A” en la parte de arriba; el pico rojo tendrá una “T” en la parte de arriba; etc. Además, es común encontrar números que indiquen el número de una base en particular dentro de la secuencia. En la figura, el número 5 corresponde a la base cuya posición es la número cinco; el número 10 corresponde a la base cuya posición es la número diez; y así sucesivamente (Márquez et al., 2014).

Lineamientos internacionales para el análisis de mtDNA

La metodología para el análisis de polimorfismos mitocondriales ha sido revisada y estandarizada a nivel internacional, con el fin de proporcionar a los investigadores varios parámetros de calidad durante el proceso de estudio que puedan servirles para realizar un trabajo adecuado y que se encuentre elaborado “con el mismo lenguaje” en cualquier lugar del mundo, lo que facilita la reproducibilidad del análisis, independientemente del laboratorio del que se trate.

La Comisión de DNA para la Sociedad Internacional de Genética forense (ISFG, por sus siglas en inglés) fue conformada con el objetivo de estandarizar lineamientos y recomendaciones en pos de mejorar las prácticas realizadas en los análisis de polimorfismos en el genoma con fines de identificación humana (Gill et al., 2006; Parson et al., 2014). Dentro de los documentos elaborados, se encuentran lineamientos para el análisis del mtDNA (Carracedo et al., 2000; Parson et al., 2014).

Control de calidad

Carracedo y colaboradores, así como Parson y colaboradores (Carracedo et al., 2000; Parson et al., 2014) establecen como primer punto el control de calidad. Al someter un indicio degradado o que se encuentra en bajas cantidades a un proceso de amplificación, se puede aumentar la sensibilidad de detección del material genético de estudio (Sundquist & Bessetti, 2005), pero de manera directamente proporcional aumenta el riesgo de contaminación con DNA externo, es decir, que es distinto al de la muestra. Por esto, se considera que una de las medidas para reducir la contaminación al mínimo es la separación del espacio físico entre el área donde se realiza la extracción de DNA, el área donde se realiza la preparación de reacción para PCR, y el área “post-amplificación”; es decir, el espacio donde se trabajará con los productos de PCR. Las buenas prácticas de laboratorio, como el uso de equipo de protección personal, también ayudan a disminuir la contaminación, por lo que son recomendables la incorporación de guantes, bata, cofia y material de esterilización (incluido el uso de luz UV sobre los instrumentos y materiales) (Carracedo et al., 2000; ISFG, 1992; Parson et al., 2014).

Dentro del control de calidad, se sugiere el uso de controles negativos, que son mezclas que contiene todos los reactivos, excepto el templado de DNA, y que serán utilizados durante el proceso de PCR con el fin de observar si existe o no presencia de material genético exógeno (Parson et al., 2014). Estos controles deberán ser tratados bajo los mismos métodos y técnicas que las muestras, y si se observa contaminación en alguna parte del procedimiento, se recomienda descartar los resultados y repetir el análisis; sin embargo, de no ser posible esta opción (lo que es muy recurrente en laboratorios forenses, pues los recursos y el tiempo suelen ser muy limitados), puede ser tolerada la existencia de bajos niveles de contaminación, procediendo con cautela en la interpretación de los resultados (Carracedo et al., 2000; Parson et al., 2014).

El Grupo de Trabajo Científico sobre Métodos para el Análisis de DNA (SWGDM, por sus siglas en inglés), concuerda con los dos lineamientos anteriores, agregando el uso de un control positivo, que es una muestra que contiene todos los reactivos y un templado de DNA conocido, utilizado para monitorear el éxito del análisis (SWGDM, 2003).

Amplificación

La región amplificada rutinariamente ha sido la región control, pues las variaciones de la HVR I y II suelen ser suficientes para poder establecer que, entre una muestra dubitada y una muestra de referencia, existe una coincidencia en el linaje materno (Amorim et al., 2019; Sultana & Sultan, 2018; SWGDM, 2003). Sin embargo, utilizar únicamente estas dos regiones presenta algunas limitaciones, como un menor poder de discriminación (Coble et al., 2006).

Usualmente se apunta a un análisis individual de cada HVR, es decir, que se amplifica y secuencia de manera independiente la HVR I, la HVR II y en algunos casos (como aquellos donde el análisis de estas dos HVR no brinda el poder de discriminación suficiente (Irwin et al., 2011)), la HVR III. Se considera que este acercamiento no es el adecuado, pues junto con el procesamiento manual de varias muestras a la vez, es decir, que el experto trabaje con varias muestras de forma simultánea, se aumenta el riesgo de recombinaciones artificiales,

que resultan de la contaminación de las muestras cuando contienen una mezcla de mtDNA de diferentes individuos (Bandelt et al., 2004; Parson et al., 2014), sin embargo, el análisis individual de cada HVR es recomendable en casos donde las muestras biológicas se encuentren altamente degradadas, pues la disponibilidad de amplicones de mayor tamaño es mucho más baja, comparada con muestras que presenten un buen estado de conservación (C. Goodwin et al., 2018; Zavala et al., 2019).

Por los riesgos de contaminación y recombinación artificial anteriormente mencionados, se recomienda la amplificación de la región control como un solo amplicón para obtener resultados con alta calidad y que puedan ser utilizados para construir bases de datos. Además de la amplificación de un solo fragmento, otras medidas que pueden ser adoptadas para reducir estas recombinaciones son: 1) trabajar con una sola muestra a la vez; 2) hacer el análisis por duplicado (en caso de ser posible); 3) etiquetar debidamente los tubos y reactivos utilizados; entre otras (Parson et al., 2014).

Secuenciación

La secuenciación exclusiva de las HVR I y II en el ámbito forense se realiza, entre otras razones, por la minimización de costos y esfuerzos en la generación de información y bases de datos, pues sólo se trabaja con aproximadamente 608 pb.

Gracias a las ventajas de presupuestos y de equipo que implica la secuenciación de Sanger modificada, en comparación con otras tecnologías, ésta sigue siendo una técnica ampliamente utilizada y con vigencia en la validación de su empleo. La secuenciación de Sanger puede ser utilizada para muestras de mtDNA extraídas de cabello, huesos, dientes y sangre (Wilson et al., 1995) debe realizarse tanto de la hebra 5'-3', como en su complementaria, con el fin de reducir ambigüedades en la interpretación (Carracedo et al., 2000; SWGDAM, 2019).

En los últimos años, se ha implementado la Secuenciación de Nueva Generación en el análisis forense del genoma mitocondrial (Ballard et al., 2020; Dames et al., 2015; Huang,

2011; Just, Irwin, et al., 2015; SWGDAM, 2019), y si bien es idónea para muestras altamente degradadas o alteradas, pues eleva la sensibilidad de detección y mejora la detección de heteroplasmia (Ballard et al., 2020) (que, de no ser interpretada correctamente, podría considerarse como ruido o contaminación de la muestra), sin embargo, la capacidad de los laboratorios forenses para obtener los equipos necesarios suele verse mermada por el costo de su adquisición, así como por la falta de capacitación de los expertos en su fundamento y manejo.

Independientemente de los métodos o las técnicas de secuenciación que se elijan para el estudio de los polimorfismos mitocondriales, se recomienda que los protocolos desarrollados estén orientados a secuenciar, por lo menos, las HVR I y II (Parson et al., 2014).

Nomenclatura

La nomenclatura utilizada para el reporte de resultados debe ser compatible con los códigos de la IUPAC, y las variaciones observadas deberán ser puntualizadas conforme a la rCRS (Carracedo et al., 2000).

Si existe una inserción, se debe poner la posición cercana inmediata al extremo 3' de la cadena ligera en la que se observa esa inserción, acompañada de un punto y el número de bases adicionales, terminando con el tipo de la base a la que corresponde esta variación (ej. Si se observa una inserción de A entre la posición 74 y 75 de la HVR II, la forma de etiquetarla sería 74.1A). En caso de que se trate de una inserción dentro de un tracto homopolimérico, en donde se desconoce su ubicación exacta, se asume que ocurrió en la última posición de este tracto (extremo 3' de la cadena ligera), insertando un punto y el número de bases adicionales, seguido del tipo de base a la que corresponde este cambio en la secuencia (ej. Si se observa la inserción de una C en el tracto de cinco citosinas entre las posiciones 568-573 de la HVR III, la forma de reportarla es 573.1C). Si se trata de una delección, estas deberán ser indicadas como "DEL", "del" o "-" (ej. Si se observa una delección de C y A en las posiciones 522 y 523 respectivamente de la HVR III, se reportaría como

522DEL y 523DEL; 522del y 523del; o 522- y 523-) (Carracedo et al., 2000; Parson et al., 2014).

Cuando la variación que se observa es una transición o una transversión, como prefijo se indica con letra mayúscula la base que se reporta en la rCRS, seguida de la posición donde se encuentra la variación, y como sufijo se indica con letra mayúscula cuál es la base nitrogenada observada (ej. Si se observa la transición de una A por una G en la posición 73 de la HVR II, la manera de reportarla es A73G) (Parson et al., 2014).

Interpretación

Heteroplasmia

La heteroplasmia es un factor que puede volver el análisis de mtDNA un reto, pues su presencia puede llevar a malinterpretaciones de los resultados, pudiéndose considerar a la secuencia como una de mala calidad. Dependiendo del tejido del cual se extraiga el material genético, será la frecuencia de la presencia de heteroplasmia (Amorim et al., 2019). Por ejemplo, tejidos con una alta actividad metabólica, como el músculo o el tejido hepático (Calloway et al., 2000; Wang et al., 2010), pueden presentar una mayor proporción heteroplásmica, comparados con otros. Igualmente, el proceso de segregación replicativa puede originar que los niveles de heteroplasmia no siempre sean iguales en los diversos tejidos dentro de un mismo individuo, pues la segregación replicativa refiere a la inclinación que tenga la mitocondria sobre un mtDNA mutado o uno no mutado, tras varios ciclos de división (Quintero Ferrer et al., 2019).

La heteroplasmia de secuencia es comúnmente encontrada en la región control y ha sido reportada en muestras de sangre y bucales (Irwin et al., 2009), considerando que cuando la misma heteroplasmia de sitio es observada en haplotipos idénticos, se aumenta el peso que puedan tener esos resultados como evidencia (Parson et al., 2014).

La heteroplasmia de longitud es frecuentemente observada en regiones que presentan trectos homopoliméricos que tienen más de ocho nucleótidos idénticos, es decir, que hay más de ocho bases nitrogenadas iguales que se repiten de manera sucesiva (ej. CCCCCCCCCC

en las posiciones 16184-16193) (Parson et al., 2014). En la HVR II hay una mayor frecuencia de este tipo de heteroplasmía, precisamente en las posiciones 303 y 315, las cuales encuadran el tracto de citosinas (Ramos et al., 2013). En la HVR III también existe un tracto de citosinas donde se puede observar heteroplasmía de longitud: entre las posiciones 568-573; y los cinco pares de CA/AC entre 514-524 (Sylvester et al., 2018).

A pesar de lo común que es encontrar este tipo de heteroplasmía, en la práctica forense su interpretación y posterior reporte no es rutinario (Parson et al., 2014). Para confirmar que se trata de heteroplasmía y no de algún defecto en la calidad de la secuencia, se debe observar la presencia de dicha variación en la cadena 5'-3' y en su complementaria. La lectura de los picos en el electroferograma debe ser clara y en un 20% mayor al nivel basal (Parson et al., 2014; Quintero Ferrer et al., 2019). Por otro lado, la existencia de diferencias tanto en la heteroplasmía de secuencia como en la de longitud no es elemento suficiente para excluir dos haplotipos idénticos que derivan de la misma fuente o del mismo linaje materno (Parson et al., 2014).

Reporte de resultados y conclusiones del análisis

La interpretación puede culminar en alguno de los siguientes tres escenarios: 1) resultados no excluyentes; 2) resultado excluyente; 3) resultado inconcluso (Department of Justice, 2019).

Una vez obtenidas las secuencias tanto de la muestra de referencia como de la muestra dubitada, se comparan. En el caso en donde las secuencias sean idénticas, no se puede excluir que tanto la muestra de referencia como la muestra problema provengan de la misma fuente (resultado no exclusivo). Si además de esta coincidencia total, hay heteroplasmia idéntica en ambas muestras, se proporciona un aumento en el poder de discriminación. Si la muestra dubitada y la muestra de referencia difieren entre ellas por un solo nucleótido, y no existe evidencia de heteroplasmia, se reporta como un resultado inconcluso. Si las dos secuencias son completamente diferentes, entonces se puede excluir que ambas provengan de la misma fuente (resultado excluyente), sin embargo, se tendrá que considerar si las dos secuencias se

obtuvieron del mismo tipo de fuente biológica (ej. Ambas muestras provienen de sangre; o si la muestra de referencia proviene de saliva y la muestra dubitada proviene de sangre), pues la tasa mutacional del mtDNA puede variar, dependiendo del tejido (Carracedo et al., 2000). Finalmente, un resultado inconcluso se obtiene a partir de comparar las dos muestras y observar que éstas difieren entre ellas por un solo nucleótido, cuya posición no pueda ser identificada de manera plena, ya sea por la existencia de heteroplasmia, o porque se trate de una mutación heredada de madre a hija/hijo (Pereira et al., 2010; SWGDAM, 2019).

Dentro de la interpretación de resultados es necesario considerar la frecuencia del haplotipo observado, es decir, cuántas veces se observa ese haplotipo en particular dentro de una base de datos poblacional. Esta frecuencia haplotípica es utilizada para brindar soporte estadístico al análisis de los polimorfismos mitocondriales. Una de las herramientas estadísticas utilizadas para reportar la probabilidad de coincidencia entre dos muestras, es la razón de verosimilitud (LR) (Carracedo et al., 2000), que es un cociente utilizado para evaluar la coincidencia hallada entre dos perfiles genéticos, bajo el supuesto de que éstos pertenecen a dos individuos diferentes (Parson et al., 2014), calculado al dividir la probabilidad de que la muestra problema y la muestra de referencia compartan el mismo linaje materno (x); entre la probabilidad de que el haplotipo de la muestra problema coincida con un haplotipo seleccionado al azar dentro de la base de datos (y) ($LR = x/y$) (Just, Scheible, et al., 2015). Para ello, es indispensable considerar que se requiere una base de datos que sea de la región geográfica de donde provienen las muestras, y que contenga polimorfismos de las HVR de un alto número de individuos, pues con esto, se puede aumentar el valor de la razón de verosimilitud, ya que depende de la cantidad de datos registrados en la base (Butler, 2005).

Con este cálculo, la interpretación dada a los resultados del análisis genético, en conjunto con diversos factores propios del caso que deben ser analizados integralmente, se puede concluir en una identificación positiva o no.

Utilidad del análisis poblacional en el estudio de polimorfismos mitocondriales con fines forenses

Genética de poblaciones en el análisis de mtDNA

La genética de poblaciones tiene como objetivo entender cómo y por qué las frecuencias alélicas y genotípicas cambian a través del tiempo, dentro y entre las diferentes poblaciones (Clark, 2002). En ese sentido, la generación de información sobre las frecuencias alélicas en una población, resulta de interés forense, pues como se mencionó anteriormente, estas bases de datos poblacionales, son de interés al brindar la información necesaria para el cálculo de la razón de verosimilitud.

En el caso del mtDNA, los estudios poblacionales apuntan principalmente a la creación de bases de datos para el estudio de los procesos evolutivos y ancestrías de las diversas especies a través del tiempo (Kivisild, 2015), o para establecer la frecuencia haplotípica dentro de una población (Tillmar, 2010). Esto último es logrado a partir de contar cuántas veces un haplotipo en particular es observado dentro de la población o base de datos.

Las bases de datos sobre información del genoma mitocondrial contienen los polimorfismos encontrados en las secuencias de los individuos estudiados. A partir de estas variaciones, se realiza una asignación de haplogrupo, que consiste en determinar el grupo poblacional al que pertenecen estos polimorfismos mitocondriales, con lo que se evalúa la diversidad haplotípica que existe dentro la población.

Dentro de los estudios poblacionales, se analizan parámetros como la heterocigosidad, que dentro del análisis mitocondrial, indica qué tan polimórfica es una posición en particular. En la genética forense, nos sirve conocer este parámetro, pues entre más altos sean los valores, mayor será la capacidad de individualización a través del uso del marcador genético que se esté analizando (Nuñez Domingo, 2011). Por otro lado, también se establecen los valores de la diversidad haplotípica, la cual indica probabilidad de encontrar dos haplotipos diferentes en la muestra; y de la diversidad nucleotídica, que es la probabilidad de encontrar diferentes nucleótidos entre las secuencias de una misma población (Campo et al., 2010).

Datos poblacionales del mtDNA para uso forense

El análisis de la región control del mtDNA ha resultado útil en casos donde las muestras a estudiar no pueden ser analizadas con otros sistemas de identificación molecular, siendo aplicada, por ejemplo, cuando es necesaria la clasificación y asociación de restos mezclados, o para utilizar la información de ancestría biogeográfica como una herramienta de investigación (Irwin et al., 2011). En este último punto, se puede incorporar la importancia de la creación de bases de datos que contengan la información de los polimorfismos mitocondriales de los individuos, tomando en cuenta la población a la que pertenecen.

Se ha recomendado que para los estudios de genética de poblaciones para fines forenses, la totalidad de la región control del mtDNA sea secuenciada (Amorim et al., 2019; Irwin et al., 2011), ya que se trata de una región pequeña (~1,122 pb). Sin embargo, existen condiciones (como la degradación del material biológico) que dificultan la obtención de un perfil genético que proporcione información útil para identificación, incluso con tan poca cantidad de nucleótidos. Por lo anterior, el análisis de las HVR del mtDNA, es una alternativa útil para el uso de este marcador, incluso dentro de estudios con enfoque poblacional.

Existen investigaciones donde se analizan los polimorfismos de las HVR I y II en individuos de diversas poblaciones (Guardado-Estrada et al., 2009; Hong et al., 2015; Lander et al., 2008; Verma et al., 2018), generando información poblacional que también puede ser aprovechada por la genética forense, sin embargo, hay casos donde el análisis de estas dos HVR no brinda el poder de discriminación suficiente para poder establecer que dos muestras comparten el mismo linaje materno (Irwin et al., 2011), por lo que una propuesta para resolver esta situación es la expansión de las regiones analizadas, como por ejemplo, la inclusión de la HVR III. Se ha reportado que la inclusión ya mencionada, dentro del análisis del genoma mitocondrial, proporciona un mayor poder de discriminación para este marcador (Fridman et al., 2014; Lander et al., 2008; Verma et al., 2018), lo que aporta sustento a la importancia de considerar de manera rutinaria el análisis de la HVR III para el uso del mtDNA con fines de identificación forense.

ANTECEDENTES

Identificación forense a través de la prueba genética

Ya que todos los seres vivos contienen DNA, y todo el DNA presenta variabilidad intra e interespecie, cualquier material biológico asociado con una problemática de índole legal puede contener información acerca de la fuente específica que lo produjo. La genética forense aprovecha estas particularidades biológicas para poder auxiliar al Derecho.

Podríamos rastrear los orígenes de esta especialidad forense al momento en que el descubrimiento y clasificación de los grupos sanguíneos (sistema ABO) de Karl Landsteiner pudo ser aplicado en casos de paternidad (Carracedo, 2015). Sin embargo, el acontecimiento que daría un giro al uso del análisis genético como elemento probatorio para el área jurídica sería en 1984, cuando Alec Jeffreys analizó los minisatélites VNTRs y observó que el número de repeticiones de estas secuencias del DNA, eran diferentes entre individuos, dando así inicio a lo que ahora conocemos como pruebas de identificación humana mediante el análisis de polimorfismos (Jobling & Gill, 2004).

A pesar de la gran ayuda técnica y científica que brindó el uso de estas variaciones en casos legales, las condiciones en las que generalmente se recuperaban las muestras (degradadas y en bajas cantidades) comenzaron a limitar su uso en los tribunales. Estas restricciones comenzaron a verse resueltas con la aparición de la PCR a inicios de 1990, pues permite trabajar con una cantidad igual o menos a 100 pg (Morling, 2009), lo que también facilitó el uso de otros marcadores genéticos con un mayor poder de discriminación, como los STRs (Carracedo, 2015).

Estos STRs o microsatélites están compuestos de repeticiones de 2-6 pb que son variables entre los individuos y que se encuentran en un 3% total del genoma. Estas repeticiones son presentadas en tándem, esto quiere decir que se reiteran de tal manera que cada repetición se encuentra una al lado de la otra. Debido a esto, los marcadores STRs se pueden clasificar en simples y compuestos (Cuadro 1). El éxito de los STRs como un marcador genético tiene relación con la alta variabilidad que posee (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), sin embargo, su limitación viene en la cantidad de

muestra necesaria para poder analizarlos (que usualmente es de un nanogramo (Norrgard, 2008)), siendo el mayor obstáculo que se encuentra en las muestras de origen forense, ya que existen casos en donde la cantidad de muestras es tan baja (por degradación o alteración intencional del indicio) que aumenta el riesgo de obtener errores en las pruebas y con ello, malinterpretar los resultados (Laird & Blackmore, 2009).

Lo anterior ha derivado en la búsqueda de una estandarización sobre qué microsatélites serán los indicados para realizar perfiles genéticos que permitan identificar a un individuo, lo que a su vez ha llevado a la construcción de bases de datos genéticos con los que se pueda hacer una comparación, como es el caso de CODIS en Estados Unidos, en donde se analizan 20 STRs (Hares, 2015); o las bases de datos para población europea que toma como referencia el Conjunto de Estándar Europeo (ESS, por sus siglas en inglés), con el uso de 10-16 loci (National Institute of Standards and Technology, 2015; Schneider, 2009).

Con la evolución de la genética forense y con ello, el avance de los métodos y técnicas que puede aportar para coadyuvar con la procuración de justicia, comienza el entendimiento de los alcances y limitaciones que tiene, e incluso aplicaciones alternativas al estudio de indicios de origen humano, como el estudio de material biológico no humano de interés forense (Arenas et al., 2017).

Actualmente la genética forense tiene una aplicación enfocada en la identificación y establecimiento de relaciones de parentesco, haciéndolo mediante la confronta entre perfiles genéticos. Algunos de los escenarios posibles involucran la comparación entre la información genética obtenida de un indicio biológico encontrado en un lugar de intervención, o de una muestra tomada de un cuerpo cuya identidad se desconoce, con una muestra de referencia (Schneider, 2007). Con este escenario en puerta, conviene mencionar que el peso probatorio de estos análisis recae en la interpretación que el experto en genética le da a sus resultados y que posteriormente será valorada por un órgano jurisdiccional, pues éstos no atribuyen responsabilidad penal sobre una persona, es decir, el hecho de que el material genético de una persona se encuentre en un lugar de investigación no asegura que, como consecuencia, sea responsable de la comisión del delito que se investiga.

Análisis de mtDNA en la práctica forense

Las características del genoma mitocondrial (principalmente su tamaño) hace que sea un marcador óptimo para ser analizado, por lo que el mtDNA de muchas especies ha sido secuenciado exitosamente en su totalidad, siendo el del humano secuenciado a inicios de 1980 y revisado 18 años después, dando lugar a una secuencia de referencia (rCRS) (Anderson et al., 1981; Röck et al., 2013).

Anteriormente se mencionó que las diferencias o polimorfismos mitocondriales que son de utilidad forense se encuentran en la región control, específicamente en las regiones hipervariables, y para poder analizarlas, es necesario extraer, amplificar y secuenciar el DNA de la muestra dubitada (Parson et al., 2014).

Dentro de las opciones existentes para la extracción del DNA, el uso de la técnica de fenol cloroformo sigue siendo cotidiano debido a la accesibilidad económica que comprende en comparación con otras técnicas, sin embargo, la toxicidad e inestabilidad del fenol ha alentado la consideración sobre algunos kits comerciales de extracción genómica. Dentro de estos métodos comerciales se encuentra el kit QIAmp® Blood Mini de QIAGEN, que está diseñado para la purificación del DNA total (incluyendo en ello, la extracción del mtDNA), a partir de diversas muestras biológicas como tejido animal fresco o congelado; sangre; hisopados bucales; u orina. Además, no contiene inhibidores o contaminantes que interfieran con el proceso de amplificación (QIAGEN, 2016).

Sobre la amplificación de la región control, esta puede hacerse completa o amplificando cada HVR por separado, esto dependiendo del nivel de degradación del mtDNA o de las condiciones a las que haya estado expuesta la muestra. Posteriormente, es necesario conocer el orden de los nucleótidos presentes en las regiones amplificadas, y para ello se hace uso de la secuenciación (S. Vázquez & Guardado, 2021). El resultado de la secuenciación deberá ser comparado con la rCRS para identificar los cambios de nucleótidos que ocurren con respecto de ésta (Parson et al., 2014; Terreros, 2010), y cada variación encontrada se deberá reportar, determinando así un haplotipo mitocondrial (ej. C16111T, C16223T,

C16290T, G16319A, A73G, T146C, T152C, A153G, T195C, A235G, A263G, 309.1C, 315.1C) (C. L. Hernández et al., 2017; Izagirre et al., 2005).

Dentro del área de estudios antropológico-moleculares se realiza la determinación de haplogrupos mitocondriales. Estos haplogrupos son heredados de manera uniparental, por lo que evidencian información genética que no sufrió recombinación, lo que la llevaría a ser compartida por diversos individuos (Parson et al., 2014). Además, se pueden localizar algunas posiciones del genoma donde se presentan cambios con mayor o menor frecuencia, dependiendo de la población de estudio (S. Vázquez & Guardado, 2021). Por ejemplo, en Europa, los haplogrupos más comunes son el H, K, K, N1, T, U4, U5, V, X y W (Loogväli et al., 2004); y en el caso de México, los haplogrupos A, B, C y D predominan en un 90% (Guardado-Estrada et al., 2009). Una vez realizado el análisis, se debe hacer una comparación entre los haplotipos mitocondriales contenidos en la muestra dubitada y la muestra de referencia. En este caso, es de suma importancia recordar que se trata de genoma heredado por vía materna, lo que significa que las madres, hermanos/hermanas, tíos/tías, abuela y demás familiares maternos son los individuos que pueden proporcionarla.

Aplicaciones del mtDNA en la identificación forense

El análisis del genoma mitocondrial es una herramienta útil en el ámbito forense que puede ser usada para lograr la identificación de, por ejemplo, restos hallados que se presume pertenecen a una persona reportada como desaparecida, pues los familiares maternos pueden proporcionar las muestras de referencia para realizar una comparación entre estas y aquellas obtenidos de los restos biológicos (Amorim et al., 2019). A pesar de esto, es importante considerar que el análisis de mtDNA con fines de identificación forense suele ser un complemento a los análisis de marcadores autosómicos, ya sea por la falta de un perfil genético con información útil, o porque las condiciones de las muestras recolectadas no permite el estudio de estos marcadores.

Uno de los primeros casos donde se utilizaron los polimorfismos mitocondriales para identificar a una persona se dio en 1986, con el hallazgo de restos óseos humanos de una

persona infante de tres años de edad que se encontraron a 3.2 km de la casa de dos adultos cuya hija de esa misma edad desapareció de su hogar en 1984. Después de amplificar y secuenciar las HVR I y II de las muestras de la madre y de los restos encontrados, se observaron haplotipos idénticos entre las dos muestras, lo que derivó en concluir una identificación positiva de la infante que había sido reportada como desaparecida (Amorim et al., 2019; Stoneking et al., 1991).

Otro caso fue en 1990, en Inglaterra, donde se localizó el cuerpo de una persona del sexo femenino en un avanzado estado de descomposición en un paraje (lugar abierto que, por sus condiciones, podría favorecer la degradación del cuerpo y con ello, de las muestras por analizar). Se orientó el establecimiento de identificación hacia una mujer de edad avanzada que había sido reportada como desaparecida, esto gracias al estudio odontológico de los indicios dentarios que tenía el cadáver, sin embargo, se solicitó la ejecución de un análisis genético a partir de fragmentos de hueso calcáneo, fíbula, muestras de cabello y piel. Como muestra de referencia, se tomó sangre de quien se presumía en ese momento, era la hermana biológica de la persona fallecida. Se amplificaron las regiones HVR I y II del genoma mitocondrial de las muestras dubitadas y la de referencia, y después de observar que no existían diferencias entre el haplotipo obtenido del cadáver y el haplotipo de quien se presumió que era su hermana, se estableció una identificación positiva para los restos (Amorim et al., 2019; Sullivan et al., 1992).

Además de casos mencionados anteriormente (donde únicamente es una sola persona a quien se busca identificar), el mtDNA ha sido utilizado en contextos abiertos (casos en donde el número de víctimas es incierto, y la información sobre ellas no es totalmente clara (República del Perú, 2009)), como en casos de desastres masivos, tomando como ejemplo el tsunami ocurrido en Tailandia en el año 2004, en donde se estimó un total de 5,400 víctimas, incluyendo turistas provenientes de Europa, regiones de Asia y del resto del mundo. Debido a las condiciones del acontecimiento, los restos analizados se encontraban severamente degradados. Se amplificaron las HVR I y II de muestras dentales recolectadas de los cuerpos, y se compararon con las muestras de referencia provenientes de los familiares de las víctimas,

logrando una identificación positiva de cerca de 200 personas que perdieron la vida en medio de ese desastre natural (Amorim et al., 2019; Deng et al., 2005).

Otro contexto en el cual el mtDNA es útil como herramienta de identificación es dentro de los actos violentos generalizados que derivan en graves violaciones a derechos humanos (como las guerras o actos de represión en contra de diversas poblaciones). Cercano al año 2010, se localizaron los restos de un soldado que en ese momento se presumía de nacionalidad italiana (por el uniforme que portaba) esto dentro del territorio que en su momento fue utilizado por el impero Austro-húngaro en 1915. En ese momento, se creía que los restos pertenecían a Libero Zugni Tauro, un atleta italiano reconocido que en su momento llevó a varios voluntarios a hacer frente a un ataque cercano al lugar donde residía, momento en el cual se supo que “cayó” y su cuerpo nunca fue recuperado. Gracias al contexto de hallazgo y al conocimiento que en ese momento se tenía de las circunstancias de desaparición, se solicitó a familiares del exsoldado que donaran una muestra de referencia, y después de establecer una coincidencia entre los polimorfismos de las HVR I y II de los restos y de las muestras de referencia, se concluyó una identificación positiva (Amorim et al., 2019; Piccinini et al., 2010).

Además de la región control, los rRNAs 12S y 16S y el gen del citocromo *b* del mtDNA han sido empleados con fines forenses, principalmente para la diferenciación de algunas especies. En el caso del gen del rRNA 12S, se ha utilizado como matriz biológica cabellos, huesos y/o dientes, sangre y músculo para diferenciar entre humanos, perros, gatos, roedores, algunos ovinos y bovinos (Hu et al., 2015; Melton & Holland, 2007). La región del rRNA 16S también ha sido estudiada con el objetivo anteriormente mencionado, por ejemplo, en la aplicación de la identificación de especies para combatir el tráfico de especies en peligro de extinción, como algunos cocodrilos (Naga et al., 2013); y también en el diseño de cebadores específicos que permitan diferenciar entre sangre de origen humano, ovino, caprino y bovino (O.M. Al-Dahmoshi & J. Al-Nayili, 2021). Por su parte, el gen del citocromo *b* ha sido utilizado para la diferenciación entre especies domésticas (como gallos, caballos y cerdos), especies salvajes (como leopardos, venados y elefantes) y algunas

especies de peces (como bacalao y algunas especies de peces lija, frecuentemente comercializados en Japón) (Frag et al., 2020).

Aplicaciones de mtDNA en México

Si bien ya se han revisado casos en otras partes del mundo donde el uso del mtDNA para identificación es exitoso, en México, el uso de este marcador genético se ha enfocado principalmente a cuestiones antropológicas y aquellas relacionadas con enfermedades y genética de poblaciones (Bodner et al., 2021; González Olivier et al., 2013; Guardado-Estrada et al., 2009; Peñaloza et al., 2014).

En el país son contados los casos de conocimiento público en donde la aplicación del análisis de los polimorfismos mitocondriales haya coadyuvado en una investigación penal. El primer caso conocido de identificación forense a través del mtDNA, es el de Lucio Cabañas Barrientos, fundador de un movimiento político-armado y del Partido de los Pobres, cuyos restos fueron exhumados en junio del 2005. Debido a las condiciones de los restos óseos, la identificación genética se realizó a través del análisis de polimorfismos mitocondriales (Sánchez & Rangel, 2019). Otro caso que resalta es el de la desaparición de los 43 estudiantes normalistas de la Escuela Normal Rural “Raúl Isidro Burgos” en Guerrero, donde se pudo analizar la región control del mtDNA en al menos dos restos óseos, utilizando tecnología innovadora como lo es la Secuenciación de Nueva Generación, concluyendo en una identificación parcial del 72% (Equipo Argentino de Antropología Forense, 2016; PGR & Institut für Gerichtliche Medizin der Medizinischen Universität Innsbruck, 2016).

METODOLOGÍA

Acorde a los lineamientos internacionales revisados para el análisis del genoma mitocondrial, se desarrolló una metodología general (Diagrama 2) que comprende medidas para el control de calidad, los procedimientos necesarios para la obtención del material genético que se estudiará, así como las consideraciones para el análisis de los datos obtenidos.

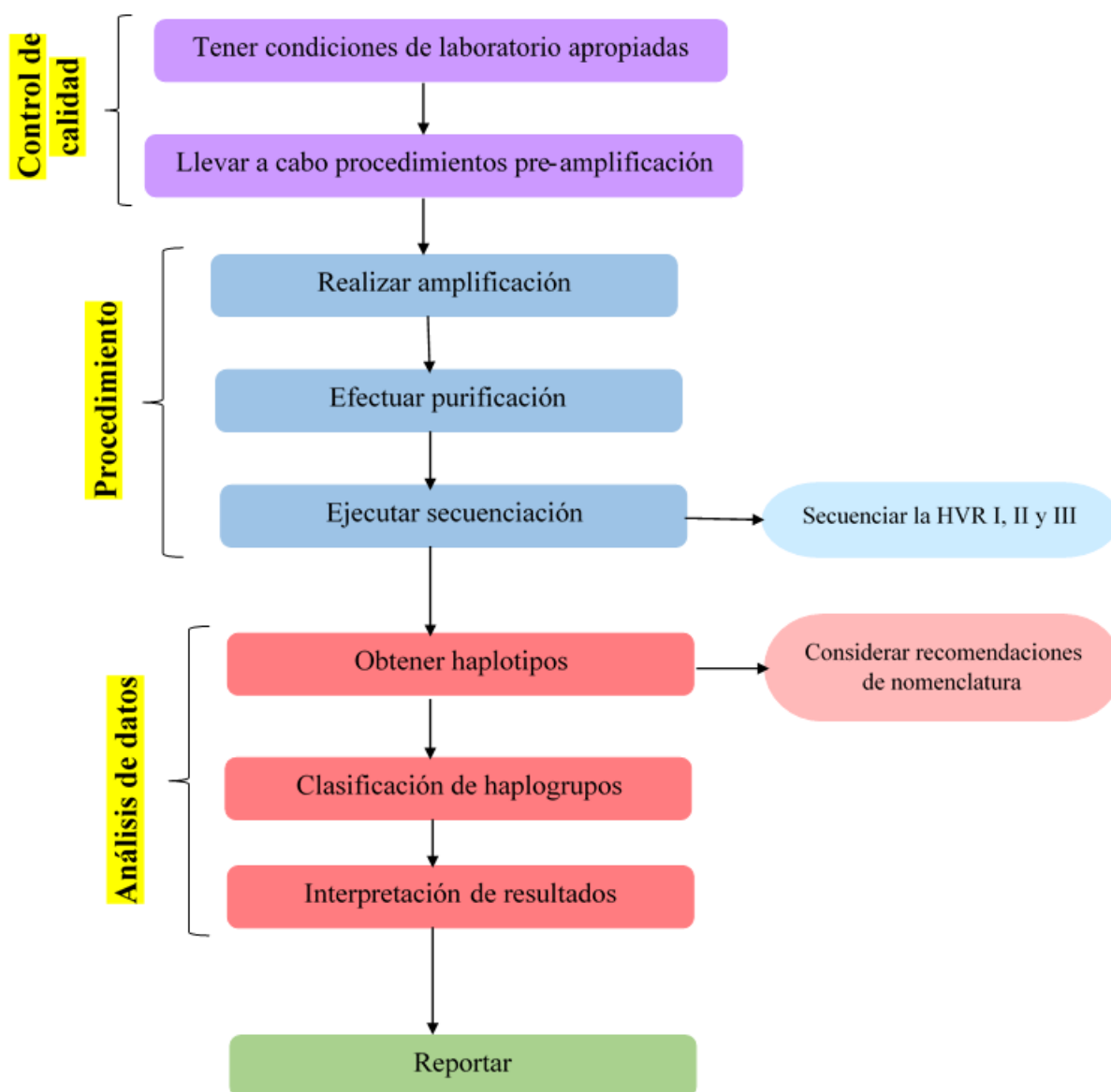


Diagrama 2. Metodología general para el análisis de mtDNA. Se establece de manera global qué es lo que comprende el control de calidad, procedimiento y análisis de datos al estudiar el mtDNA.

Control de calidad

Considerando las recomendaciones de control de calidad establecidas a nivel internacional, para el desarrollo del protocolo, se trabajó en el Laboratorio de Genética de la Licenciatura en Ciencia Forense, que cuenta con áreas separadas para el análisis: área de extracción, área de PCR y otra área de procedimientos post PCR. Las áreas fueron limpiadas con hipoclorito de sodio al 2%. Las puntas para micropipeta y los microtubos utilizados se encontraban estériles; las micropipetas fueron sometidas a luz UV dentro de la campana de PCR. Se utilizó equipo de protección personal: bata de laboratorio, lentes de seguridad, cofia y guantes desechables, los cuales fueron cambiados por cada ingreso a las diversas áreas del laboratorio, con el fin de reducir la contaminación.

En este último sentido, se hizo uso de controles negativos (para el monitoreo de contaminación con DNA exógeno) y controles positivos (para monitorear el éxito del análisis) durante todo el procedimiento.

Procedimiento de estandarización

Extracción y amplificación

Para la estandarización de la extracción de DNA, se seleccionó una muestra de sangre perteneciente a la colección de muestras biológicas del Laboratorio de Genética de la Licenciatura en Ciencia Forense, la cual fue obtenida con previo consentimiento informado. La obtención del material genético se realizó utilizando el kit QIAmp® DNA Blood Mini de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN, 2016).

El análisis cualitativo de la extracción, es decir, conocer si el material genético fue extraído exitosamente, se preparó un gel de agarosa Bioline® al 1% en 40 mL de buffer TBE al 0.5X (EDTA con concentración de 1mM y Tris-borato con concentración de 45 mM) pH 8.3, y 10 µL de GelRed® Nucleic Acid Stain de Biotium. En los diferentes pozos del gel se agregaron: 1.5 µL del marcador de peso molecular HyperLadder™ 1 Kb de Bioline® mezclado con 1.5 µL del loading buffer Bioline® (pH 8); 1.5 µL de la muestra de DNA extraída previamente y 1.5 µL del mismo loading buffer; y 1.5 µL de agua purificada con

sistema Mili-Q® con 1.5 µL del loading buffer usado anteriormente (Figura 4). El proceso de separación por electroforesis se realizó durante 60 minutos con un voltaje de 110 V.

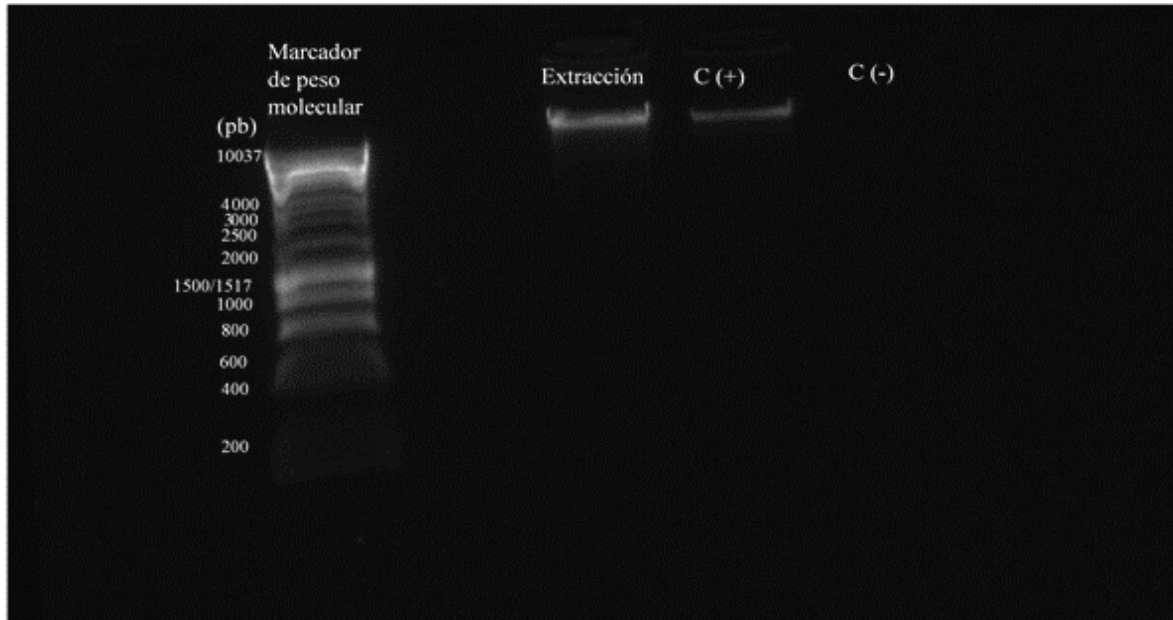


Figura 4. Gel de electroforesis de la extracción de DNA. Gel de agarosa donde se introdujo el marcador de peso molecular de 1 Kb, el resultado de la extracción de DNA (Extracción), el control positivo del análisis (C (+)) proveniente de una muestra de sangre periférica y el control negativo (C (-)). El DNA extraído con este kit es de hasta 50 Kb (QIAGEN, 2016), lo que indica que la banda que se espera visualizar en el gel tiene que estar arriba de la banda correspondiente a 10037 pb. Esto corresponde con el resultado observado en esta figura.

Una vez confirmada la extracción del material genético, se comenzó el procedimiento de estandarización de la amplificación de la región control del mtDNA, replicando las condiciones experimentales del trabajo realizado por Guardado y colaboradores (Guardado-Estrada et al., 2009) (Cuadro 3).

		Temperatura	tiempo
		94°C	2 minutos
30 ciclos	Desnaturalización	94°C	45 segundos
	Alineamiento	60°C	1 minuto
	Elongación	72°C	2 minutos
		72°C	7 minutos
		4°C	∞

Cuadro 3. Condiciones de PCR para la amplificación de la región control del mtDNA extraído de una muestra de sangre. El cuadro registra las condiciones de temperatura y tiempo establecidas por Guardado y colaboradores para la amplificación de la región control del mtDNA (1261 pb) (Guardado-Estrada et al., 2009).

Para la amplificación, se utilizaron cebadores de 20 bases de longitud. La secuencia de los cebadores es la siguiente (Guardado-Estrada et al., 2009):

L-15926 (5'-ATACACCAGTCTTGTAACC-3'), posiciones 15907-15926; y
H-00580 (5'-TTGAGGAGGTAAGCTACATA-3', posiciones 599-580)

En una reacción de 25 µL, se añadieron estos cebadores a una concentración de 1 µM, dNTPs a 200 µM, 4.1 µL de buffer de PCR al 0.6X, y 0.5 U de Taq polimerasa de Accuris™ Taq DNA Polymerase.

Posteriormente, se realizó otro gel de agarosa al 1% en 40 mL de buffer TBE al 0.5X y 10 µL de GelRed®. En los pozos del gel se agregaron: 1.5 µL del marcador de peso molecular HyperLadder™ 1 Kb de Bioline® mezclado con 1.5 µL del loading buffer; 1.5 µL de la muestra de DNA extraída previamente y 1.5 µL del mismo loading buffer; y 1.5 µL de agua grado biología molecular con 1.5 µL del loading buffer usado anteriormente (Figura 5). En este caso, el tiempo fue de 60 minutos, con un voltaje de 90 V.

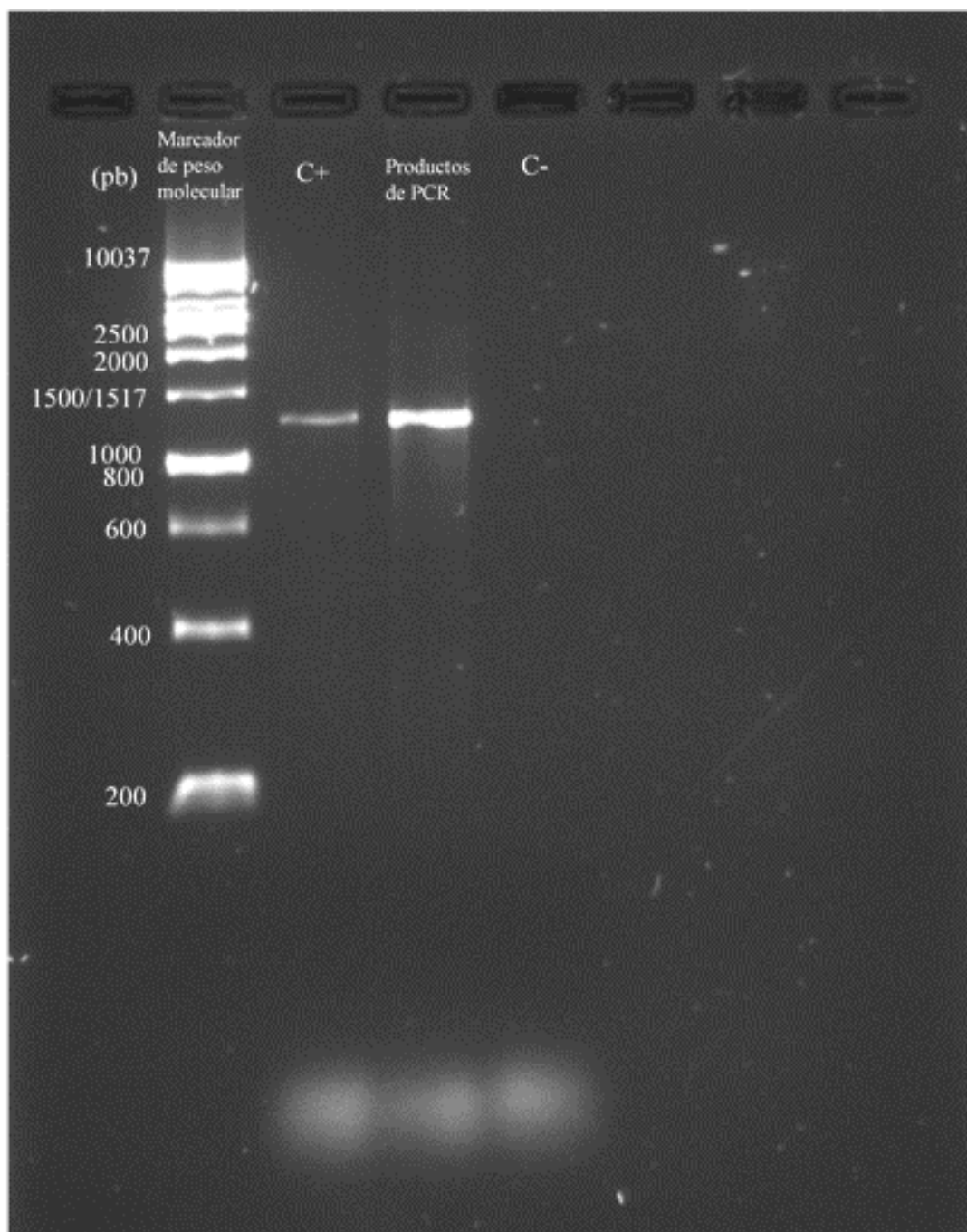


Figura 5. Gel de electroforesis de los productos de PCR con las condiciones experimentales utilizadas por Guardado y colaboradores. Gel de agarosa en donde se introdujo el marcador de peso molecular de 1 Kb, el control positivo del análisis (C (+)), los productos de PCR y el control negativo (C (-)). El tamaño del amplicón esperado fue de 1261 pb (Guardado-Estrada et al., 2009), que es un peso encontrado entre las 1500/1517 y 1000 pb, lo cual coincide con el tamaño de la banda observada en esta figura.

Con las condiciones del Cuadro 3 se realizó la amplificación de un segundo fragmento, utilizando el mismo cebador forward (L-15926), y otro cebador de 19 bases con la siguiente secuencia: H-727 (5'-AGGGTGAAGTCACTGGAACG-3'), posiciones 707-727. Este cebador fue utilizado por Fridman y colaboradores para secuenciar la cadena complementaria del mtDNA en la HVR III en población brasileña (Fridman et al., 2014).

Las condiciones de amplificación fueron las mismas utilizadas que con el cebador H-16410 de Guardado y colaboradores.

Finalmente, se realizó otro gel de agarosa al 1% en 40 mL de buffer TBE al 0.5X y 10 µL de GelRed®. En los pozos del gel se agregaron: 1.5 µL del marcador de peso molecular HyperLadder™ 1 Kb de Bioline® mezclado con 1.5 µL del loading buffer; 1.5 µL de la muestra de DNA extraída previamente y 1.5 µL del mismo loading buffer; y 1.5 µL de agua grado biología molecular con 1.5 µL del loading buffer usado anteriormente (Figura 6). El gel de electroforesis fue corrido por 60 minutos con un voltaje de 110 V.

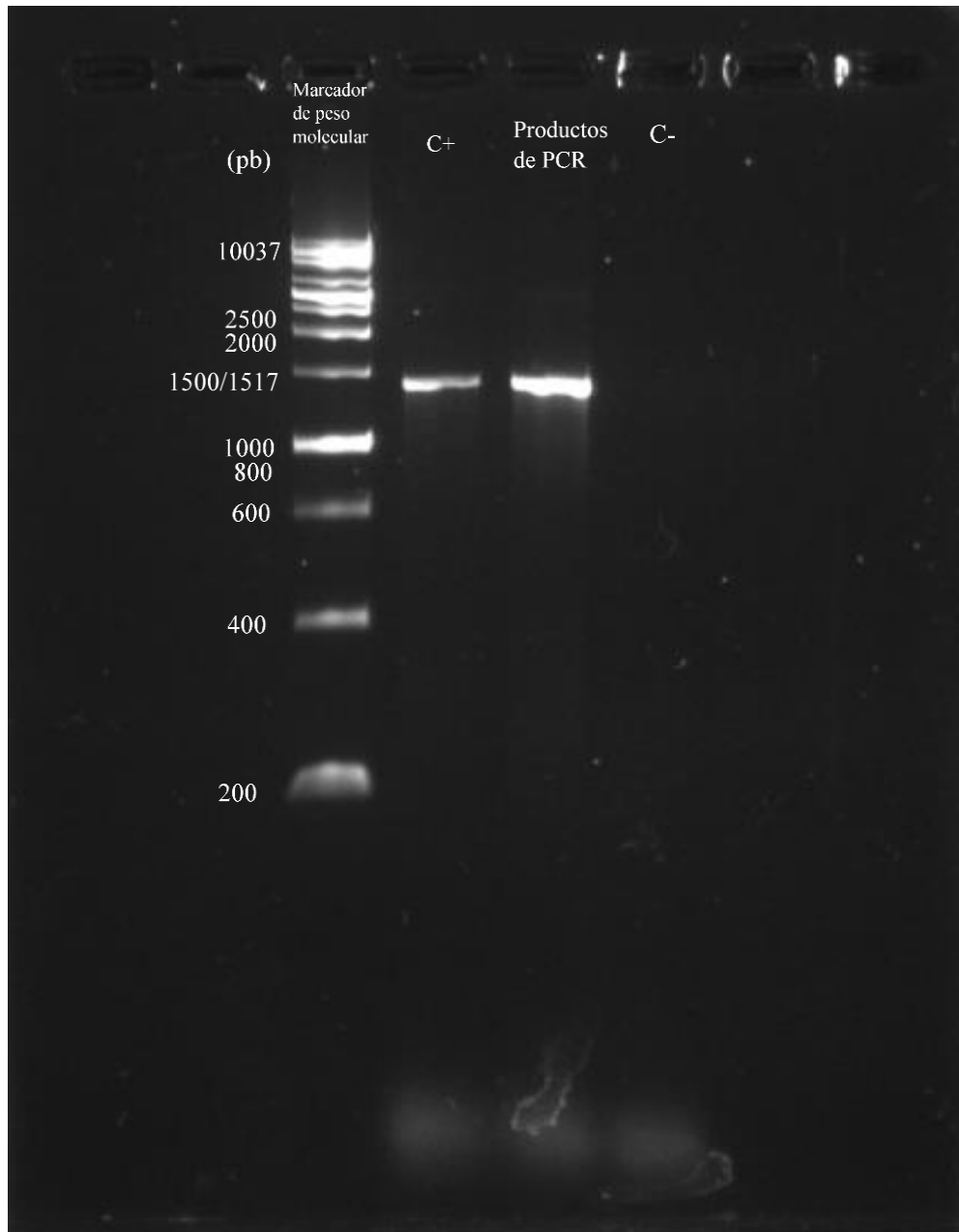


Figura 6. Gel de electroforesis de los productos de PCR amplificados utilizando el cebador H-727 reportado por Fridman y colaboradores. Gel de agarosa elaborado para el análisis cualitativo de los productos de PCR. Orden de las mezclas depositada en los pozos (de izquierda a derecha): marcador de peso molecular; control positivo (C+); productos de PCR; control negativo (C-). El tamaño del amplicón esperado fue de 1389 pb, que es un tamaño encontrado entre las 1500/1517 y 1000 pb, lo cual coincide con el tamaño de la banda observada en esta figura.

Siguiendo con el procedimiento de estandarización de la amplificación, se realizó una curva de $MgCl_2$ con los productos de la PCR realizada anteriormente, con el fin de optimizar la reacción de amplificación de la región control del mtDNA. Se utilizó $MgCl_2$ de Invitrogen® de 50mM, realizando las alícuotas correspondientes para obtener el siguiente intervalo de concentraciones: 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM. Estos valores de concentración se encuentran dentro del rango recomendado para realizar la curva de $MgCl_2$ (1.5 - 4 mM) (Erber, 2010; Serrato et al., 2014), teniendo una diferencia de 0.5 mM entre cada uno de los valores (Sambrook & Russell, 2001).

La curva de $MgCl_2$ se realizó en una reacción de 25 μ L que contenía los cebadores L-15926 y H-727 a una concentración de 1 μ M; dNTPs a 200 μ M, buffer PCR al 0.6X, y 0.5 U de Taq polimerasa de Accuris™ Taq DNA Polymerase.

. Las condiciones de temperatura son las mismas utilizadas previamente (Cuadro 3).

El análisis cualitativo de la curva de $MgCl_2$ se muestra en la Figura 7.

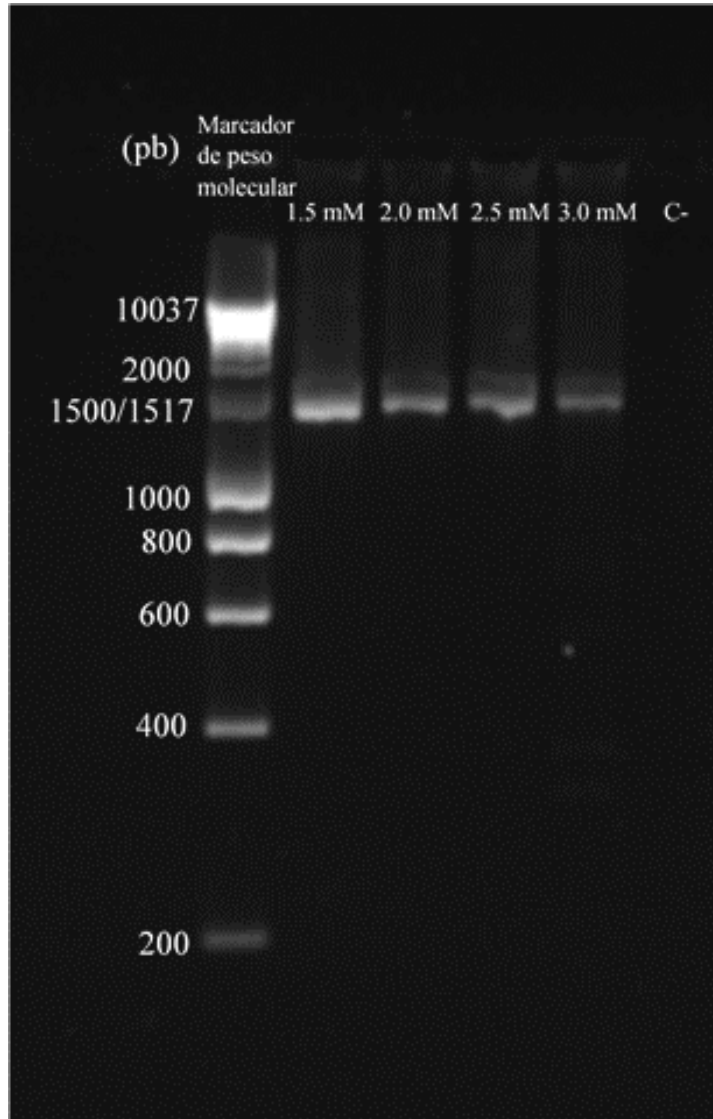


Figura 7. Gel de electroforesis de la curva de $MgCl_2$. Gel de electroforesis utilizado para observar la calidad de los productos de PCR, variando la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Orden de las mezclas depositada en los pozos (de izquierda a derecha): marcador de peso molecular; productos de PCR amplificados con una concentración de 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM de $MgCl_2$; y el control negativo (C-).

El siguiente parámetro estandarizado fue la temperatura de alineamiento (T_m), la cual es de importancia, pues de ésta depende el correcto alineamiento de los cebadores sobre el templado de DNA que se busca amplificar. Para optimizar el alineamiento de los cebadores durante la amplificación, se recomienda realizar un gradiente de temperatura (Sambrook & Russell, 2001) que consiste en realizar una serie de PCRs, estableciendo un rango de temperaturas entre 2-10°C inferiores/superiores a la T_m del cebador (Sambrook & Russell, 2001).

Para establecer los valores de temperatura que tendrá el gradiente, es necesario conocer la T_m de los cebadores que se van a utilizar. En este caso, los cebadores seleccionados para el proceso de amplificación fueron el 1 y 2 (Figura 8) y para la reacción de marcaje, se utilizaron los cebadores 1, 2, 3 y 4 (Figura 8).

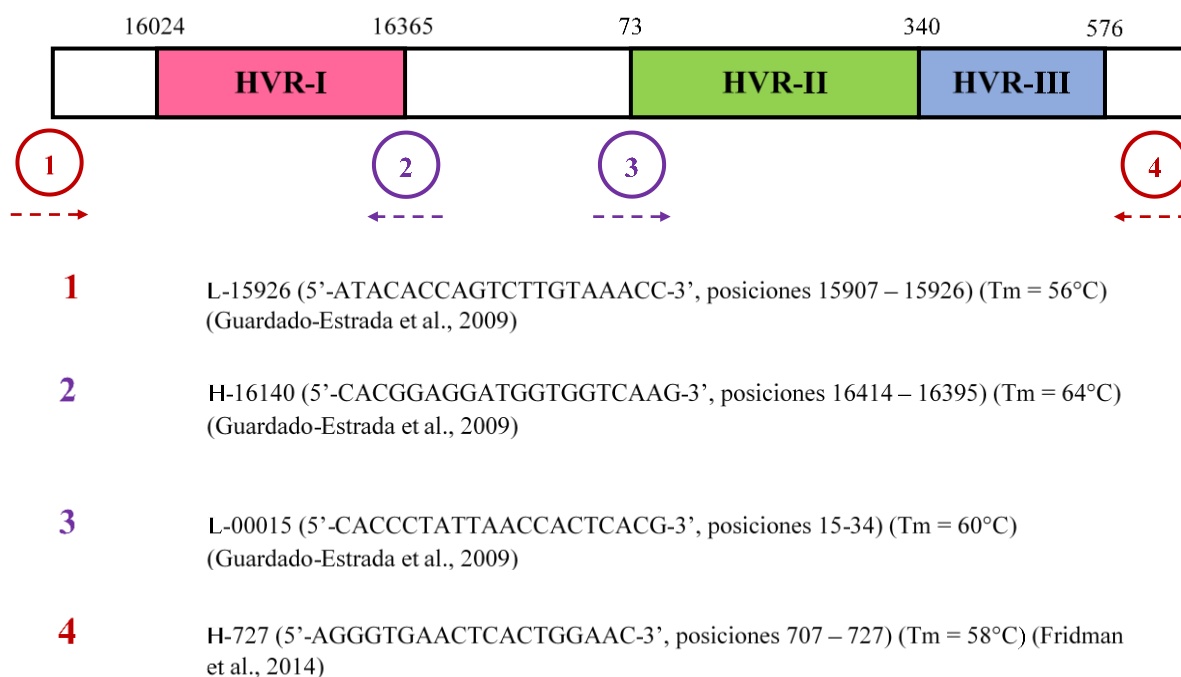


Figura 8. Cebadores utilizados para el análisis de las tres regiones hipervariables. Se representa de forma gráfica la totalidad de la región control del mtDNA. Los números en la parte superior representan las posiciones en las que inician y terminan las tres HVR; los números dentro de los círculos indican la identidad asignada a cada cebador; las flechas indican si se trata de un cebador forward o reverse (si la flecha apunta a la derecha, es un cebador forward; si la flecha apunta hacia la izquierda, se trata de un cebador reverse). Los círculos y números de color morado corresponden a los cebadores utilizados para la reacción de marcaje; los círculos y números rojos indican los cebadores utilizados para la reacción de amplificación. Se establece también la secuencia de los cebadores que irán alineados con su respectiva HVR. Es de resaltar que los cebadores utilizados para la amplificación también fueron utilizados para la reacción de marcaje.

Con el fin de conocer la T_m de los cebadores, se utilizó la fórmula $4(G+C) + 2(A+T)$ (Porta & Enners, 2012). Para utilizar esta fórmula, se debe contar el número de guaninas (G), citosinas (C), adeninas (A) y timinas (T) que posee la secuencia del cebador, y sustituir dichos valores dentro de la fórmula. En este caso, se calculó la T_m para cada uno de los cebadores que fueron utilizados en el proceso de amplificación y de marcaje (Figura 8). A partir de este resultado, se establecieron los valores de temperatura utilizados para el gradiente: 58°C, 60°C, 62°C y 64°C.

Una vez realizadas las amplificaciones con las distintas temperaturas de alineamiento, se hizo un análisis cualitativo de los productos amplificados con un gel de electroforesis. Este gel fue realizado con los reactivos, volúmenes, pesos y concentraciones utilizados en todos los geles anteriores (Figura 9).

La PCR correspondiente a la estandarización de la T_m se realizó en una reacción de 25 μL donde se añadieron los cebadores L-15926 y H-727 a una concentración de 1 μM ; dNTPs a 200 μM , buffer PCR al 0.6X; 0.5 U de Taq polimerasa de Accuris™ Taq DNA Polymerase; y 3 μL del DNA extraído de la muestra de sangre utilizada anteriormente.



Figura 9. Gel de electroforesis del gradiente de temperatura. Gel de electroforesis utilizado para observar la calidad de los productos de PCR, variando la T_m . Orden de las mezclas depositada en los pozos (de izquierda a derecha): marcador de peso molecular; productos de PCR amplificados con una temperatura de alineamiento de 58°C; productos de PCR amplificados con una temperatura de alineamiento de 60°C; productos de PCR amplificados con una temperatura de alineamiento de 62°C; productos de PCR amplificados con una temperatura de alineamiento de 64°C; control negativo (C-).

Después del proceso de estandarización, los reactivos y sus concentraciones finales seleccionadas para la amplificación de las tres HVR de la región control del mtDNA se resumen en el Cuadro 4. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que Guardado

y colaboradores utilizaron en su trabajo sobre ancestría mitocondrial en población amerindia (Guardado-Estrada et al., 2009).

Reactivo	Concentración
Cebador 1 (L-15926) (Guardado-Estrada et al., 2009)	1 μ M
Cebador 4 (H-727) (Fridman et al., 2014)	
dNTPs	200 μ M (Guardado-Estrada et al., 2009)
Accuris™ Taq DNA Polymerase	0.5 U
Buffer	0.6 X
MgCl ₂	2 mM

Cuadro 4. Reactivos y sus concentraciones seleccionados para PCR. El cuadro registra los reactivos y sus respectivas concentraciones seleccionadas para la amplificación de las tres HVR de la región control del mtDNA. La concentración definitiva de MgCl₂ fue determinada a partir de la curva realizada.

Con las condiciones de PCR ya estandarizadas, se amplificaron las tres HVR como un solo amplicón de la región control del mtDNA de 10 muestras de sangre pertenecientes a la colección de muestras mitocondriales del Laboratorio de Genética de la Licenciatura en Ciencia Forense. Estas muestras provienen de sangre total de 150 individuos mexicanos, tomadas en el 2018 con previo consentimiento informado de quienes los proporcionaron. La extracción del material genético se realizó de manera previa a la elaboración del presente protocolo utilizando el kit DNeasy® Blood and Tissue de QIAGEN, siguiendo el protocolo del fabricante (QIAGEN, 2016).

Secuenciación

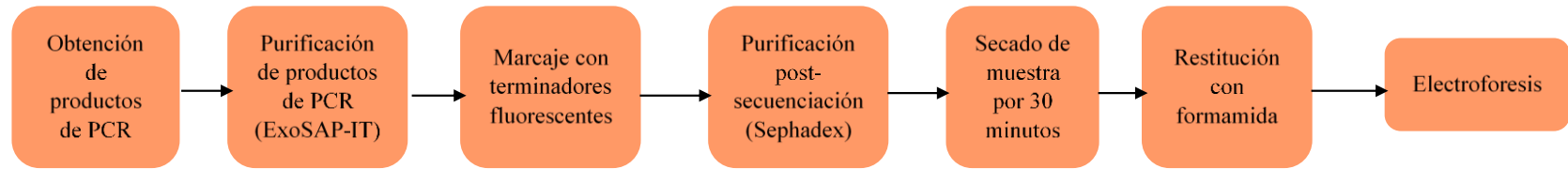


Diagrama 2. Metodología general utilizada para realizar la secuenciación de la región control del mtDNA. Se establece de manera global las etapas previas y posteriores a la secuenciación utilizada en este trabajo para el análisis de los polimorfismos mitocondriales de las tres HVR del mtDNA.

Los productos de PCR de las diez muestras se purificaron utilizando el reactivo ExoSAP-IT®, en una reacción de 8.75 µL de los cuales 6.25 µL corresponden a la muestra, y 2.5 µL al reactivo. Primeramente, se descongeló el ExoSAP-IT®, para después añadirlo en 10 distintos microtubos de 0.2 mL donde también se agregó el volumen correspondiente de muestra. Posteriormente, se incubaron en dos etapas: a 37°C por 15 minutos, y a 80°C por 15 minutos (Applied Biosystems, 2017).

Para realizar la reacción de marcaje se prepararon cuatro mezclas de 52.5 µL. Cada una de las mezclas contenía 21µL del reactivo BigDye Terminator v3.1 Applied Biosystems®; 21 µL de productos de PCR purificados y uno de los cuatro cebadores utilizados con una concentración de 1 µM, es decir, se adicionó un cebador diferente para cada una de las mezclas de reacción. Por cada una de las cuatro mezclas se prepararon 10 tubos de PCR (dando un total de 40 muestras), y a cada uno de ellos se les adicionaron 4 µL de las mezclas previamente preparadas, y 1 µL del templado de DNA, dando un total de 5 µL de mezcla por cada uno de los tubos. En síntesis, los cebadores L-15926 y H-16410 fueron utilizados para conocer las secuencias de la cadena ligera (L) y pesada (H) de la HVR I, respectivamente (dando un total de 20 tubos de PCR), mientras que los cebadores L-00015 y H-727 fueron utilizados para conocer las secuencias de la cadena ligera y pesada de las regiones HVR II y III, respectivamente (los 20 tubos de PCR restantes). Las 40 muestras fueron marcadas en una reacción de PCR con las condiciones registradas en el Cuadro 5.

		Temperatura	tiempo (segundos)
		96°C	60
25 ciclos	Desnaturalización	96°C	10
	Alineamiento	50°C	5
	Elongación	60°C	240
		4°C	∞

Cuadro 5. Condiciones de reacción de marcaje mediante PCR. Muestra las condiciones establecidas por el protocolo del fabricante (Applied Biosystems, 2010), con las cuales los productos de PCR fueron marcados mediante terminadores fluorescentes. Los datos presentados en este cuadro fueron aplicados en las cuarenta muestras que fueron secuenciadas.

Por último, se llevó a cabo la purificación de los productos de PCR marcados con terminadores fluorescentes mediante el uso de columnas Centri-sep™ con Sephadex®, cuyo objetivo es eliminar contaminantes dentro de las muestras. La purificación previa a la secuenciación es necesaria, pues los cebadores, al actuar como sustratos para el rearreglo del genoma, pueden interferir en la lectura que el equipo haga de éste. Esta parte del procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Applied Biosystems, 2009; Princeton Separations, s. f.) (Figura 10).

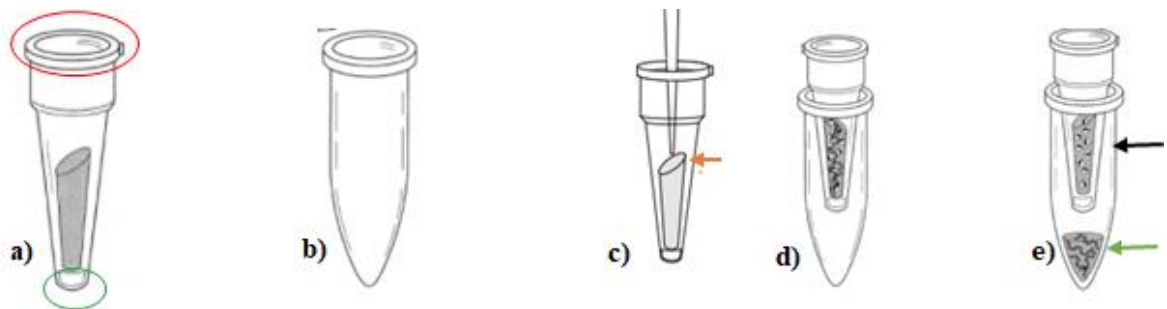


Figura 10. Ilustración general de algunas etapas del proceso de purificación de productos de la PCR de marcaje con el reactivo Sephadex®. a) Columna de filtración Centri-sep™ con Sephadex® en su interior. El círculo rojo indica la tapa superior y el círculo verde indica la tapa inferior de la columna. b) Ejemplo de tubo colector. Se colocará debajo de la columna Centri-sep™ una vez que se hidrate y se retire la tapa inferior para que dentro de ésta sea depositada el agua decantada. c) Adición de muestra en el gel. La muestra debe ser depositada en el centro del gel, sin que éste sea tocado por la punta de la micropipeta; la flecha naranja indica el punto más alto del gel, que deberá ser aquel que se encuentre hacia afuera del rotor de la centrifuga. d) Columna Centri-sep™ con la muestra dentro de un microtubo nuevo. Una vez que la muestra e adicionada, junto con el microtubo nuevo y etiquetado, se deben meter a la centrifuga. e) Resultado final de la purificación. Una vez terminada la centrifugación, en el gel se encontrarán los contaminantes que fueron quitados de la muestra (que pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, buffer, sales, etc.), mientras que en el fondo del microtubo etiquetado se encontrará el DNA purificado (Princeton Separations, s. f., Inglés).

Concluida la purificación, los productos finales fueron cargados en los equipos ABI Prism® 310 Genetic Analyzer y Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer, con un tiempo de inyección de 15 segundos, utilizando un polímero POP-4 y POP-7, respectivamente; y se utilizó Hi-Di™ Formamide. Las condiciones de electroforesis, así como los valores de tiempo de carga fueron los predeterminados para secuenciación. Además, se utilizó el protocolo recomendado para la electroforesis y la obtención de las secuencias.

Análisis de los datos

El análisis de las 40 secuencias se realizó de forma manual, con la ayuda del software BioEdit® versión 7.0.0, que permite editar, alinear y manipular secuencias de nucleótidos (Hall, 2004). La finalidad del análisis fue identificar los polimorfismos que presentan las 10 muestras respecto a la rCRS, que en el presente trabajo corresponde a la secuencia NC_012920.1 (Andrews et al., 1999). Posteriormente, las secuencias fueron ingresadas en el software ClustalX para lograr alinearlas y compararlas con la rCRS y enseguida, se utilizó el sitio web HaploGrep (Haplogrep, s. f.) para obtener la caracterización de las muestras respecto al haplogrupo asignado por dicho software. Los valores de diversidad haplotípica, nucleotídica, diferencias por par entre los haplotipos y heterocigosidad se calcularon mediante el uso de un algoritmo estadístico para genética poblacional (Arlequin versión 3.5).

Como parte del análisis de poblaciones, se realizaron redes de expansión mínima entre los haplogrupos de las 10 muestras, utilizando el software TCS de Clement, cuyo objetivo es estudiar las relaciones que existen entre diferentes haplotipos, dependiendo del número de cambios mutacionales (Aguirre, 2007; Clement et al., 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Estandarización

Amplificación

Elección de parámetros

Dentro del proceso de estandarización, se seleccionaron dos cebadores específicos para la amplificación de las tres HVR (L-15926 y H-727). Particularmente, el cebador H-727 (Fridman et al., 2014) fue seleccionado como idóneo para el análisis de la cadena complementaria de la HVR III del mtDNA debido a que su temperatura de alineamiento (58°C) se encuentra muy cercana a la temperatura de alineamiento del otro cebador utilizado (L-15926: 56°C). Finalmente, con los parámetros estandarizados para la PCR, se logró una amplificación exitosa de las tres HVR del mtDNA en un solo amplicón (Figura 11).

A partir del análisis cualitativo realizado sobre la curva de MgCl₂ elaborada, se eligió la concentración de 2 mM. La banda observada en 1.5 mM es la banda que más abajo se encuentra de todas, lo que podría indicar que la amplificación realizada con esa concentración no fue específica, mientras que la banda en 3.0 mM se observa de manera muy tenue. Las bandas en 2.0 y 2.5 mM son las que mejor calidad presentan, sin embargo, se seleccionó la concentración de 2.0 mM, pues a partir del análisis cualitativo realizado con el gel de la Figura 7, utilizando esa concentración se obtuvo la banda con mejor resolución.

Por otro lado, la elección del valor de temperatura de alineamiento igual a 60°C se dio a partir de observar una banda con la mejor resolución de todas las que están presentes en la Figura 9. La banda de 58°C es la más ancha de todas, lo que no permitió descartar la presencia de dos amplicados, mientras que las bandas de 62°C y 64°C presentan una reducción en su tamaño, lo que indicó que el uso de estas dos últimas temperaturas originó una PCR menos eficiente.

Aplicación del protocolo de amplificación

Las 10 muestras amplificadas posteriormente al procedimiento de estandarización de PCR se visualizaron mediante un gel de agarosa. La amplificación de las tres HVR se realizó como un solo amplicón (1,389 pb) pues además de ser una de las recomendaciones de los lineamientos internacionales sobre el estudio de polimorfismos mitocondriales, permite ver de una manera más clara si hubo éxito en la realización de la PCR y que no haya existido contaminación en el proceso, siendo este el caso en el presente análisis.

Gracias al marcador de peso molecular, se puede observar que el peso del material genético de las 10 muestras está comprendido entre la banda de las 1000 y 1500/1517 pb (Figura 11), lo cual coincide con los cerca de 1,122 pb que comprende la totalidad de la región control (Budowle et al., 2000; W. Goodwin et al., 2011). Adicionalmente, la amplificación se realizó de manera exitosa y sin evidencia de contaminación, pues existe una banda en el carril correspondiente al control positivo (C+) y por el contrario, no existe una banda que señale la amplificación de DNA dentro del carril correspondiente al control negativo (C-) (Figura 11).

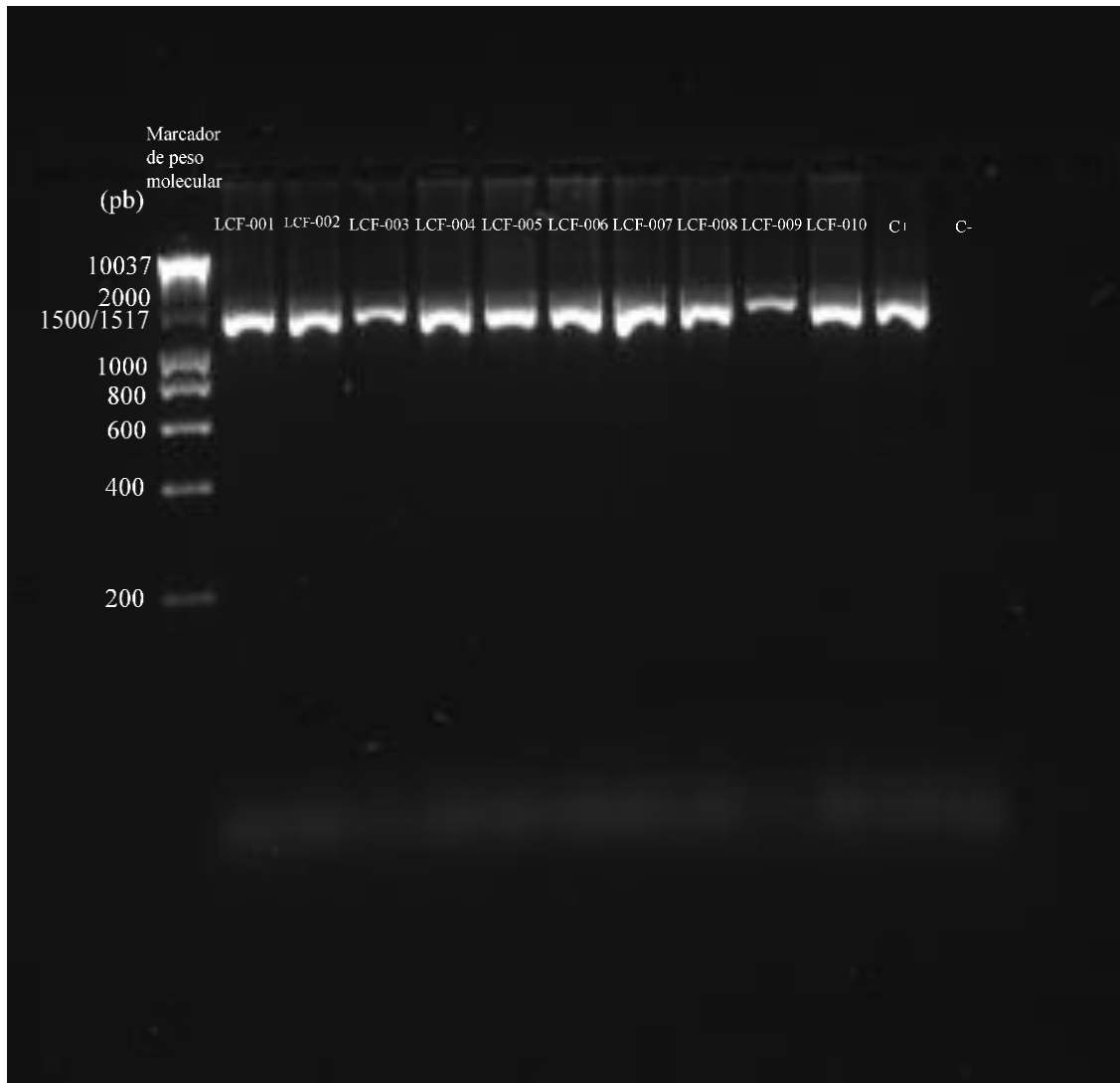


Figura 11. Gel de electroforesis de los productos de PCR de mtDNA. Gel de agarosa al 1% en donde se introdujeron los productos de PCR de las diez muestras amplificadas con las condiciones de PCR seleccionadas.

Secuenciación

Las 40 secuencias obtenidas corresponden al marcaje de las tres HVR de los genomas mitocondriales de las 10 muestras amplificadas. La secuenciación se realizó utilizando la técnica de secuenciación de Sanger, pues sigue siendo utilizada en la producción de protocolos para secuenciar las HVR del mtDNA y obtener secuencias con alta calidad (Ballard, 2016; Lyons et al., 2013; Mita et al., 2020).

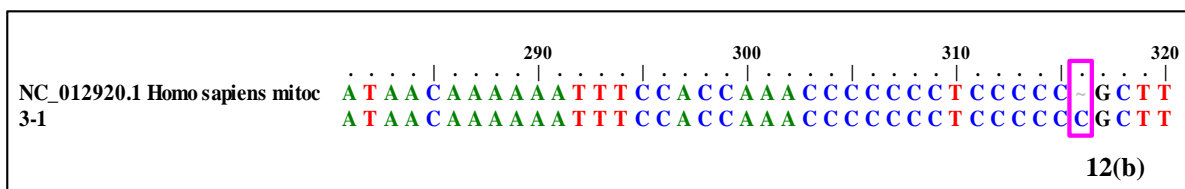
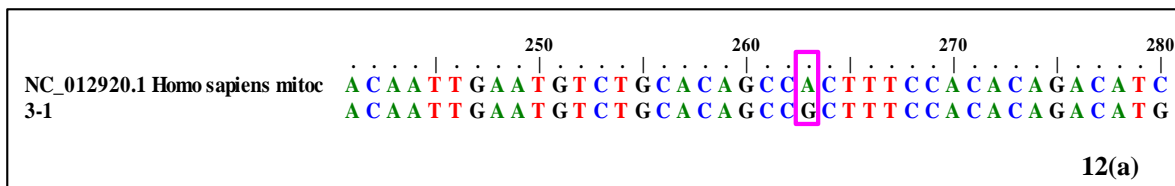
Debido a que el mtDNA es una molécula de doble hebra (Oliveira et al., 2020), se secuenció tanto la cadena ligera como la pesada, pues además de ser una práctica recomendada para el análisis de las secuencias de mtDNA (Bär et al., 2000; Budowle et al., 2000; Parson et al., 2014), secuenciar ambas hebras del genoma mitocondrial permite reducir confusiones al momento de determinar cuál es la base observada en una posición particular (SWGDM, 2019).

Muestra LCF-01

La secuencia de la muestra LCF-01 fue clasificada en el haplogrupo B2t, y presentó las siguientes variaciones: 16051G, 16189C, 16217C, 16259T y 16357C en la HVR I. Sólo esta secuencia presentó las variaciones 16051G, 16259T y 16357C, sin embargo comparte las variaciones 16189C y 16217C con la muestra LCF-09, que fue asignada al haplogrupo B4. Particularmente, la transición de una timina por una citosina en la posición 16189 resultó problemática durante la secuenciación, pues este polimorfismo se encuentra dentro del tracto de citosinas de la HVR I (nt 16183-16193). Al momento de secuenciar estas secciones de varias citosinas seguidas, se produce una caída en la señal que se emite y que es detectada por el equipo, lo que origina que la secuencia de las bases subsecuentes a este tracto de citosinas sea difícil de interpretar (Lee et al., 2016).

Dentro de la HVR II, esta muestra presentó las variaciones 73G, 263G, 315.1C, siendo la menor cantidad de variaciones dentro de esta región de las 10 secuencias analizadas. Estas tres variaciones han sido reportadas como características del haplogrupo B2, C1, D1, que son haplogrupos amerindios, sin embargo, también han sido identificadas en haplogrupos

Europeos (H, J, K, T, U, V) y africanos (L), dentro de estudios en población mexicana (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009; Tamm et al., 2007). De hecho, las variaciones 263G y 315.1C están presentes en todas las muestras, y de acuerdo con los reportes hechos por Bodner y colaboradores, así como por Guardado y colaboradores, es un polimorfismo muy común en haplotipos mexicanos y/o amerindios, respectivamente (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009) (Figuras 12(a) y 12(b)), lo cual coincide con los hallazgos en el presente trabajo, pues las 10 muestras fueron tomadas de individuos mexicanos.



Figuras 12(a) y 12(b). Fragmentos de secuencia de la HVR II correspondiente a la muestra LCF-01. 12(a). Fragmento de 40 nucleótidos (nt 241-280) correspondiente a la HVR II. La secuencia que se encuentra en la parte de arriba nombrada “NC_012920.1 Homo sapiens mitoc” corresponde a la rCRS, mientras que la secuencia identificada como “3-1” corresponde a la muestra LCF-01. El recuadro rosa señala el cambio en la secuencia de la muestra LCF-01 con respecto a la rCRS: la transición de una guanina en la posición 263. 12(b). Fragmento de 40 nucleótidos (nt 281-320) correspondiente a la HVR II. Al igual que en la Figura 12(a), la secuencia de arriba corresponde a la rCRS, mientras que aquella que se encuentra por debajo, corresponde a la muestra LCF-01. Igualmente, el recuadro rosa señala la variación que existe en la muestra LCF-01 con respecto de la rCRS, en este caso, la inserción de una citosina en la posición 315.

La HVR III presentó la variación 499A, siendo la única secuencia dentro de las 10 analizadas que la presenta (Figura 13).

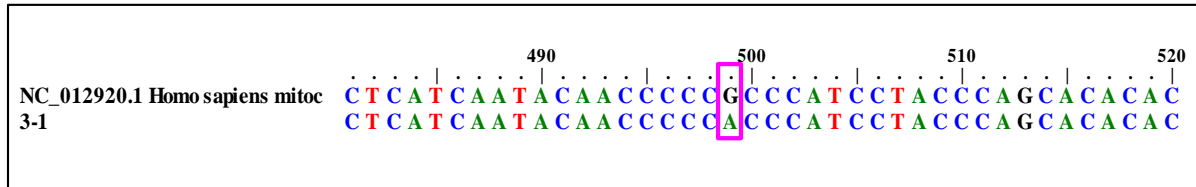


Figura 13. Fragmento de secuencia de la HVR III correspondiente a la muestra LCF-01. Cambios en la secuencia de la HVR III dentro de las posiciones 491-520 de la muestra LCF-01. Dentro del recuadro rosa se indica la variación que presenta la muestra LCF-01, en contraste con la rCRS, que en este caso es la transición de una adenina en la posición 499.

Muestra LCF-02

La muestra LCF-02 fue asignada al haplogrupo C1, presentando las variaciones 16223T, 16274A, 16298C, 16325C, 16327T dentro de la HVR I. La variación 16223T es compartida con las muestras LCF-03, LCF-04, LCF-05, LCF-06, LCF-07, LCF-08 y LCF-10, siendo la muestra LCF-05 con la que comparte mayor número de polimorfismos en esta HVR, pues además de la transición de una citosina por una timina en 16223, comparte las variaciones 16298C, 16325C y 16327T.

Por su parte, la HVR II presentó las variaciones 73G, 249DEL, 263G, 288G, 290DEL, 291DEL, 309.1C, 315.1C. La secuencia de la muestra LCF-02 fue la única que presentó la variación 288G, que Bodner y colaboradores reportaron únicamente en individuos mexicanos pertenecientes al haplogrupo A2 (Bodner et al., 2021) (Figura 14).

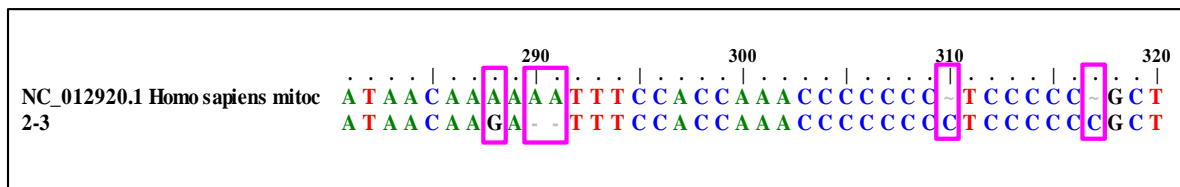


Figura 14. Fragmento de secuencia de la HVR II correspondiente a la muestra LCF-02. Variaciones encontradas dentro de las posiciones 281-320 de la HVR II de la muestra LCF-02 (“2-3”) respecto a la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”). En los recuadros rosas, se observa una transición de guanina en la posición 288, una delección de adenina en las posiciones 290 y 291 e inserción de una citosina en las posiciones 309 y 315.

Dentro de la HVR III se identificaron los siguientes polimorfismos: 489C, 493G, 522DEL, 523DEL. El cambio de una timina por una citosina en la posición 489 que presenta esta muestra sólo es compartido con las muestras LCF-05 y LCF-06, mientras que las deleciones de citosinas y adeninas en las posiciones 522 y 523 respectivamente, son compartidas con 4 de las 10 muestras analizadas. Particularmente, la variación 493G sólo fue observada en esta muestra (Figura 15), que precisamente ha sido reportada en individuos cuyo haplogrupo corresponde al C1b1 (mismo haplogrupo de la muestra LCF-01, sin embargo, también ha sido identificada en los haplogrupos C1b9, C1b3 y C1b, lo cual nos permitiría inferir que esta variación se encuentra presente en los haplogrupos C1b y sus respectivas ramas (Bodner et al., 2021).

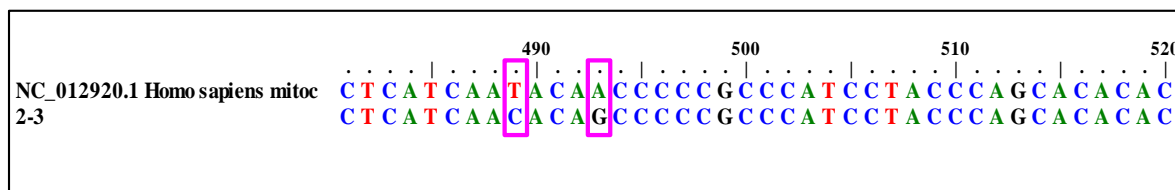


Figura 15. Fragmento de secuencia de la HVR III correspondiente a la muestra LCF-02. Polimorfismos presentados en las posiciones 481-520 de la HVR III de la muestra LCF-02 (“2-3”) con respecto a la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”). De izquierda a derecha: el primer recuadro rosa señala la transición de una citosina en la posición 499; el segundo recuadro rosa señala la transición de una timina en la posición 493.

Muestra LCF-03

Debido a las variaciones que presenta la muestra LCF-03, ésta fue asignada al haplogrupo A2u1. La HVR I de esta secuencia presentó la mayor cantidad de polimorfismos (nueve) con respecto a las otras dos HVR (6 en la HVR II y 2 en la HVR III). Dentro de la HVR I se identificaron las variaciones 16111T, 16136C, 16223T, 16257T, 16290T, 16311C, 16319A, 16344T, 16362C. Las variaciones 16111T, 16223T, 16290T, 16319A y 16362C las comparte con todas las muestras asignadas al haplogrupo A2 (LCF-04, LCF-07, LCF-08 y LCF-10), y específicamente, los polimorfismos en 16223 y 16362 son compartidas con la muestra LCF-06, asignada al haplogrupo D1. Por otro lado, la transición de una timina por una citosina en la posición 16136 sólo es presentada en esta muestra (Figura 16) y la muestra

LCF-08, y ha sido reportada sólo en individuos pertenecientes al haplogrupo A2 (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009). Esta variación ha sido reportada dentro del haplogrupo C1 de población colombiana que tiene una relación ancestral con el linaje materno de población puertorriqueña (Benn Torres et al., 2015).

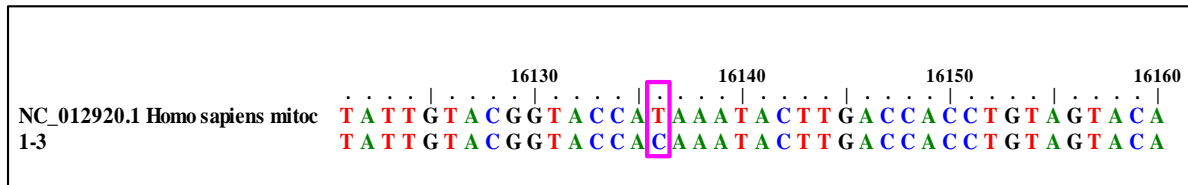


Figura 16. Fragmento de secuencia de la HVR I correspondiente a la muestra LCF-03. Presencia de una transición de una citosina en la posición 16136 de la HVR I de la muestra LCF-03 (“1.3”), al ser comparada con la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”). La variación está señalada dentro del recuadro rosa.

Dentro de la HVR II se localizaron las variaciones 73G, 146C, 153G, 235G, 263G, 315.1C. Las variaciones 146C y 235G son compartidas con todas las muestras clasificadas en el haplogrupo A2. Por otro lado, la HVR III de la muestra LCF-03 únicamente presentó las deleciones de una citosina y una adenina en las posiciones 522 y 523 respectivamente, que también han sido observadas en otras muestras.

Muestra LCF-04

La muestra LCF-04 fue asignada al haplogrupo A2. Dentro de la HVR I de la muestra LCF-04 se observaron las siguientes variaciones: 16111T, 16156A, 16223T, 16290T, 16311C, 16319A, 16362C. Esta secuencia fue la única que presencié el cambio de una timina por una adenina en la posición 16156 (Figura 17).

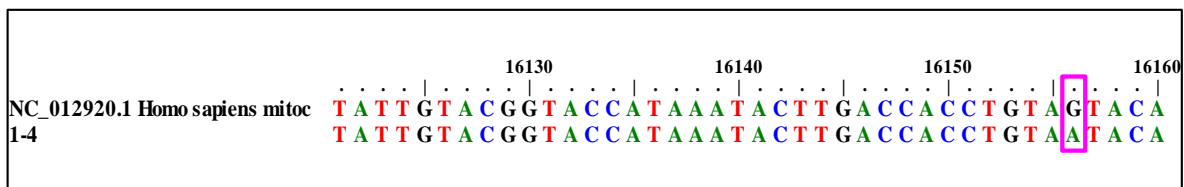
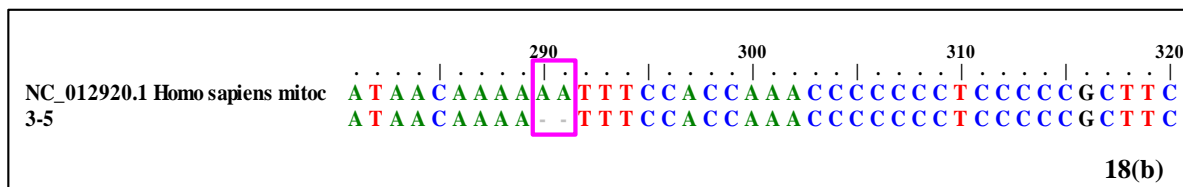
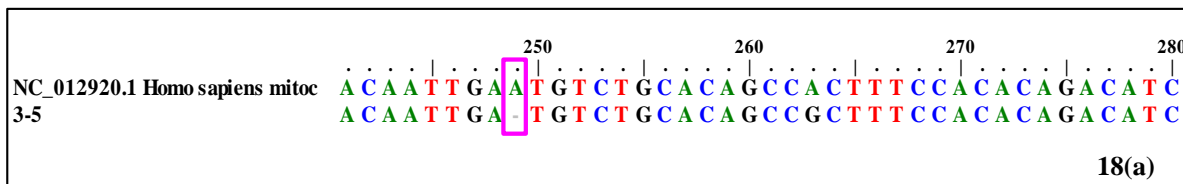


Figura 17. Fragmento de secuencia de la HVR I correspondiente a la muestra LCF-04. Alineamiento de las posiciones 16121-16160 del mtDNA. rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”) y la muestra LCF-04 (“1-4”). El recuadro rosa señala la transición de una adenina en la posición 16156.

Para la HVR II, se observaron las variaciones 73G, 146C, 153G, 235G, 263G, 315.1C, todas observadas en otras muestras. Por último, la HVR III sólo presentó las deleciones de citosina y adenina en 522 y 523 respectivamente, también observadas en otras muestras, lo que hace que ésta sea la región con menor cantidad de variaciones, en comparación con las otras dos.

Muestra LCF-05

Los polimorfismos de la secuencia de la muestra LCF-05 corresponden al haplogrupo C1. Dentro de la HVR I se observaron los polimorfismos 16223T, 16298C, 16325C, 16327T, siendo una de las secuencias con menor cantidad de variaciones en esta HVR. Respecto a la HVR II, esta muestra, en conjunto con la muestra LCF-05 fueron las únicas que presentaron deleciones, curiosamente, en las mismas posiciones (249, 290 y 291) (Figuras 18(a) y 18(b)). Estas deleciones han sido reportadas en individuos pertenecientes al haplogrupo C1 en otros trabajos dentro de población mexicana (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009). Otras variaciones presentadas en la HVR II de la muestra LCF-05 son: 73G, 263G, 309.1C y 315.1C



Figuras 18(a) y 18(b). Fragmentos de secuencia de la HVR II de la muestra LCF-05. 18(a). Variaciones encontradas entre las posiciones 241-280 de la HVR II de la muestra LCF-05 (“3-5”), al ser alineada con la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”). El recuadro rosa señala la existencia de dos deleciones, en este caso, son dos adeninas faltantes en las posiciones 290 y 291.

La HVR III presentó las siguientes variaciones: 489C, 502T. Como se mencionó anteriormente, la variación 489C también la presenta la muestra LCF-02, sin embargo, el cambio de una citosina por una timina en la posición 502 sólo es identificado en esta muestra (Figura 19).

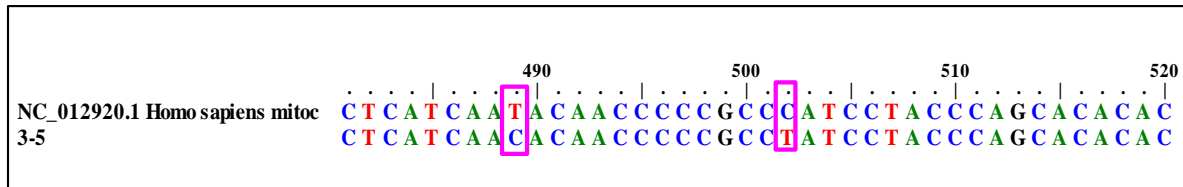


Figura 19. Fragmento de secuencia de la HVR III de la muestra LCF-05. La rCRS (arriba) y la muestra LCF-05 (abajo) se encuentran entre las posiciones 481-520 de la HVR III. De izquierda a derecha: el primer recuadro rosa señala la transición de una citosina en la posición 489; el segundo recuadro señala la transición de una timina en la posición 502.

Muestra LCF-06

Esta muestra corresponde a la única muestra clasificada dentro del haplogrupo D1a, y dentro de la HVR presenta las siguientes variaciones: 16223T, 16325C, 16362C. La existencia de sólo tres polimorfismos hace que sea la muestra con menor cantidad de polimorfismos dentro de esta región. Particularmente, la HVR II presentó las siguientes variaciones: 73G, 263G y 315.1C, que, como se mencionó anteriormente, son compartidas con el resto de las muestras. Sin embargo, dentro de la secuencia de la HVR II de la muestra LCF-06 se identificó la variación 152C, siendo única para esta muestra (Figura 20). Para individuos dentro de población amerindia y/o mexicana, este polimorfismo se ha reportado dentro de secuencias correspondientes al haplogrupo A2, B2, C1, H, J, T, y U (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009).

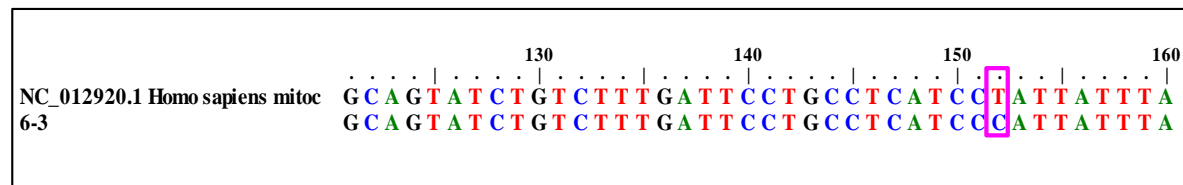


Figura 20. Fragmento de secuencia de la HVR II de la muestra LCF-06. La secuencia “NC_012920.1 Homo sapiens mitoc” corresponde a la rCRS, mientras que la secuencia “6-3” corresponde a la muestra LCF-06. El recuadro rosa indica que en la posición 152 se identificó la transición de una citosina entre las posiciones 121-160.

Finalmente, la HVR III presentó las variaciones 480C, 489C. Si bien esta última variación es compartida con las muestras LCF-02 y LCF-05, la transición de una timina por una citosina en la posición 480 es única para esta muestra (Figura 21). Esta variación ha sido reportada dentro del haplogrupo B4b analizado en individuos mexicanos (Bodner et al., 2021).

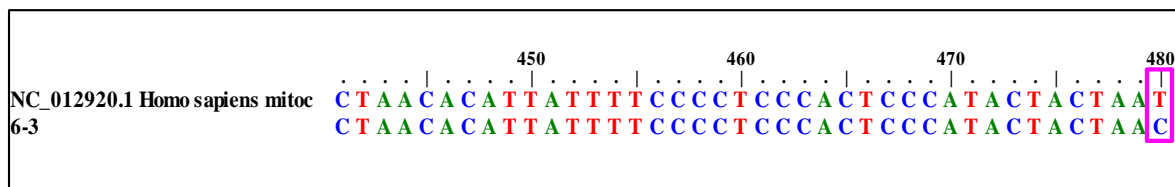


Figura 21. Fragmento de secuencia de la HVR III de la muestra LCF-06. Alineamiento de la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”), y la muestra LCF-06 (“6-3”). Dentro de las posiciones 441-480 se señala la transición de una citosina en la posición 480 (recuadro rosa).

Muestra LCF-07

La muestra LCF-07 presentó 8 polimorfismos en la HVR I; 5 en la HVR II y 2 en la HVR III. Dentro de la HVR I, se encuentran las variaciones 16111T, 16223T, 16290T, 16319A y 16362C, que son características del haplogrupo A2 (Guardado-Estrada et al., 2009; Tamm et al., 2007), al cual esta muestra fue asignado

Respecto a la HVR II, esta muestra presentó las variaciones 73G, 146C, 235G, 263G, 315.1C (Cuadro 6). La variación 73G (Figura 22) se ha reportado como característica del haplogrupo A2 (Tamm et al., 2007), sin embargo, las 10 muestras analizadas en el presente trabajo presentaron este polimorfismo, lo cual no es extraño, pues también se ha reportado que esta variación es característica de haplogrupos amerindios, dentro de los cuales no sólo se encuentra el A2, sino también el haplogrupo B, C y D (Bär et al., 2000). Las variaciones 146C, 153G y 235G también se han considerado características del haplogrupo A2 (Guardado-Estrada et al., 2009; Tamm et al., 2007), pero también han sido reportadas en haplogrupos B, C, D, H, L, K, T y U, todos asignados a individuos pertenecientes a poblaciones mexicanas (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009).

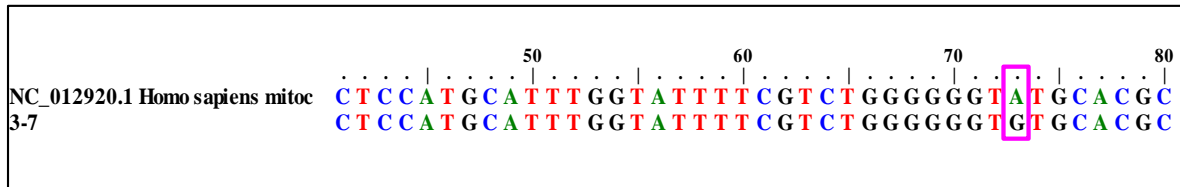


Figura 22. Fragmento de secuencia de la HVR II de la muestra LCF-07. Dos fragmentos de 40 nucleótidos (nt 41-80) de la HVR II de la rCRS (arriba) y la muestra LCF-07 (abajo). El recuadro rosa señala la transición de una guanina en la posición 73, que es el primer nucleótido de la HVR II. Esta variación está presente en las 10 muestras analizadas en el presente trabajo.

Finalmente, la HVR III de la muestra LCF-07, es una de las secuencias que sólo presentó las deleciones de una citosina y una adenina en las posiciones 522 y 523 respectivamente (Figura 23).

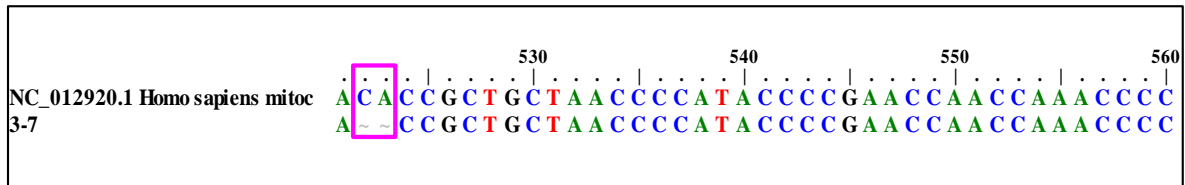


Figura 23. Fragmento de secuencia de la HVR III de la muestra LCF-07. En la Figura se señalan las diferencias entre la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”) y la muestra LCF-08 (“3-7”), entre las posiciones 521-560. Dentro del recuadro rosa se indican las deleciones de una citosina y una adenina en las posiciones 522 y 523 respectivamente.

Muestra LCF-08

Al igual que la muestra LCF-03, esta secuencia pertenece al haplogrupo A2u1. Las variaciones 16111T, 16136C, 16223T, 16247G, 16257T, 16274A, 16290T, 16319A, 16344T, 16362C se identificaron dentro de la HVR I de la muestra LCF-08. Debido a los 10 polimorfismos que existen, esta secuencia es la que más variaciones presenta en esta región con respecto a las demás muestras. Las muestras LCF-03 y LCF-08 comparten la gran mayoría de polimorfismos, sin embargo, la primera mencionada difiere de la segunda porque presenta las variaciones 16247G, 16274A en la HVR I y la inserción de una citosina en la posición 309 dentro de la HVR II (Figura 24). Dentro de esta segunda región hipervariable, también se identificaron las variaciones 73G, 146C, 153G, 235G, 263G y 315.1C

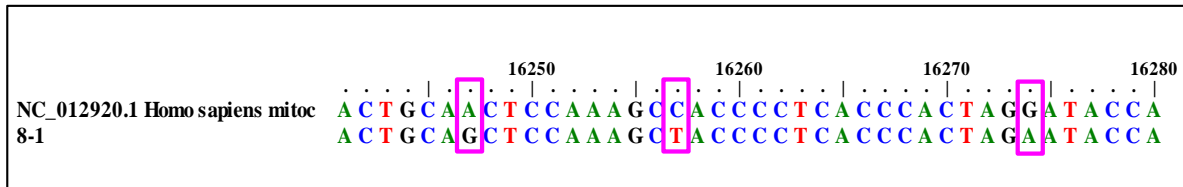
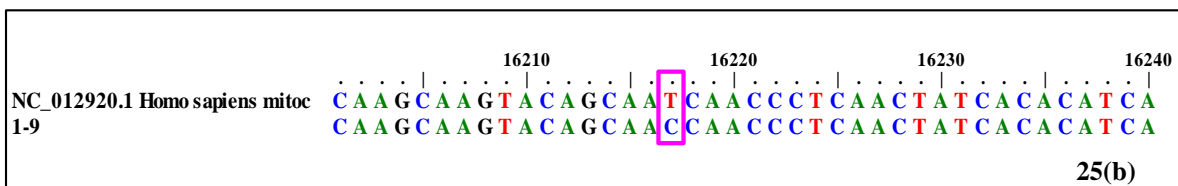
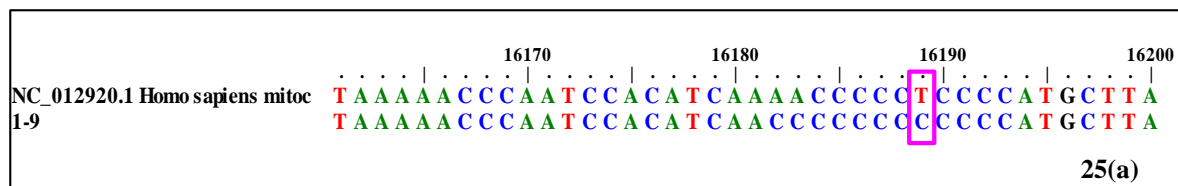


Figura 24. Fragmento de secuencia de la HVR I de la muestra LCF-08. Variaciones observadas entre las posiciones 16241-16280 de la HVR I de la muestra LCF-08 (“8-1”), al compararla con la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”). Dentro de los recuadros rosas se señala (de izquierda a derecha): transición de una adenina por una guanina en la posición 162347; el segundo recuadro indica la transición de una timina en la posición 16257; el último recuadro señala la transición de una adenina en la posición 16274.

Por otra parte, la HVR III de la muestra LCF-08, al igual que las muestras LCF-03, LCF-04 y LCF-07, únicamente presentó las deleciones de una citosina y una adenina en las posiciones 522 y 523 respectivamente.

Muestra LCF-09

La muestra LCF-09 fue clasificada dentro del haplogrupo B4. En la HVR I se identificaron las variaciones 16182C, 16183C, 16189C, 16217C. Las últimas dos variaciones (Figuras 25(a) y 25(b)) también es compartida con la muestra LCF-01, la cual corresponde al haplogrupo B2t. Al igual que con la muestra LCF-01, la muestra LCF-09 presentó problemas al momento de la secuenciación a partir del tracto de citosinas (nt 16183-16193).



Figuras 25(a) y 25(b). Fragmentos de secuencia de la HVR I de la muestra LCF-09. 25(a). Alineamiento entre la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”) y la muestra LCF-09 (“1-9”) de la HVR I, entre las posiciones 16161-16200. Los recuadros rosas señalan la transición de una citosina en la posición 16189 (25(a)), y en la posición 16217 (25(b)).

Curiosamente, la HVR III tanto de la muestra LCF-09 como de la muestra LCF-10 no presentó ningún polimorfismo, sin embargo, para la muestra LCF-09, la HVR II fue la región con la mayor cantidad de variaciones (diez): 73G, 146C, 153G, 204C, 249G, 235G, 263G, 309.2C, 315.1C. La ausencia de polimorfismos en la HVR III ha sido reportada también en otros estudios para población mexicana (Bodner et al., 2021), población euroasiática (Zimmermann et al., 2011) y coreana (Y. Zhang et al., 2005).

Muestra LCF-10

Las variaciones de la muestra LCF-10 corresponden al haplogrupo A2+(64)+16129. La HVR I de la muestra LCF-10 presentó las siguientes variaciones: 16093C, 16111T, 16129A, 16223T, 16290T, 16319 y 16362C. Únicamente dentro de esta secuencia se identificó el cambio de una timina por una citosina en la posición 16093 (Figura 26), la cual, en otros estudios, fue reportada como presente para el haplogrupo B2, C1, D1, L, y V (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009).

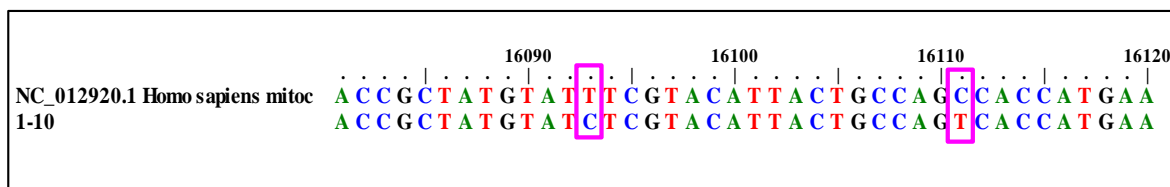


Figura 26. Fragmento de secuencia de la HVR I de la muestra LCF-10. Polimorfismos existentes en la HVR I de la muestra LCF-10 (“1-10”), al compararse con la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”). De izquierda a derecha: el primer recuadro señala la transición de una citosina en la posición 16093; el segundo recuadro en la posición 16111 señala la transición de una timina.

Como se mencionó anteriormente, esta muestra tampoco presentó algún polimorfismo en la HVR III, sin embargo, la HVR II de esta muestra fue la región con la mayor cantidad de variaciones, en comparación con las otras secuencias, identificándose los siguientes polimorfismos: 73G, 146C, 153G, 204C, 249G, 235G, 263G, 309.2C, 315.1C. La variación 204C sólo está presente en esta secuencia (Figura 27), y ha sido reportada para los haplogrupos A2m, D1h1, y T (Bodner et al., 2021).

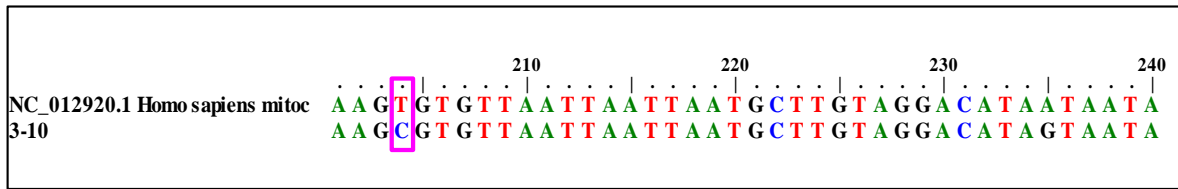


Figura 27. Fragmento de secuencia de la HVR II de la muestra LCF-10. Al comparar la HVR II de la muestra LCF-10 (“3-10”), con la rCRS (“NC_012920.1 Homo sapiens mitoc”). Entre las posiciones 201-240 se identificó la transición de una citosina en la posición 204 (recuadro rosa).

Dentro del trabajo de diversidad mitocondrial de Bodner y colaboradores, el haplogrupo A2+(64)+16129 (mismo haplogrupo al que fue asignado la muestra LCF-10) fue reportado únicamente en 16 de 2021 individuos. Los 16 individuos comparten el polimorfismo 64T, que es el cambio de una citosina por una timina en la posición 64, que si bien es una posición que sale del margen de nucleótidos que abarcan la HVR II (Cardos et al., 2008), pudo ser observada en la secuencia de la muestra LCF-10 (Figura 28).

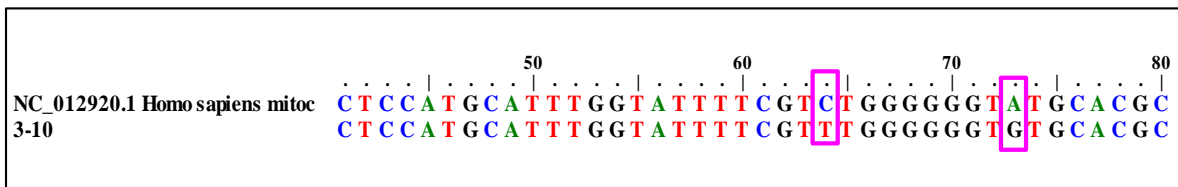


Figura 28. Fragmento de secuencia de la HVR II de la muestra LCF-10. Alineamiento de 40 nucleótidos (nt 51-80) donde se muestran las variaciones que presenta la HVR II de la muestra LCF-10 con respecto a la rCRS. En la posición 64 se indica que existe el cambio de una citosina por una timina. En la posición 73, se observa el cambio de una adenina por una guanina.

Análisis poblacional

Polimorfismo mitocondrial

De 878 posiciones secuenciadas de las regiones hipervariables I, II y III, se encontraron 47 sitios polimórficos, en los cuales se presentaron 41 sustituciones de nucleótidos y 9 inserciones/deleciones. Las sustituciones más comunes fueron las transiciones (n=38) en comparación con las transversiones (n = 3). El promedio de diferencias por par entre los haplotipos fue de 16.5 sustituciones ($\sigma = 8.1$) y la diversidad nucleotídica fue de 0.010 ($\sigma = 0.01$). Vale la pena mencionar que el promedio de diferencias fue, en términos estadísticos, significativamente mayor (16.5 vs 11.1, con un valor de $p > 0.01$ a partir de la ejecución de la prueba t de Student) en comparación con lo reportado por Guardado y colaboradores para las HVR I y II del mtDNA (Guardado-Estrada et al., 2009).

La diversidad haplotípica de las 10 secuencias analizadas fue de 1, lo que resulta en un valor esperado, pues las muestras analizadas para las tres HVR del mtDNA presentaron haplotipos únicos (Cuadro 6). A pesar de tener pocos individuos, la diversidad haplotípica no necesariamente se verá afectada por eso (Saitoh, 2021), sin embargo, los valores de la diversidad haplotípica pueden aumentar o disminuir, dependiendo de cuántas regiones hipervariables de la región control se hayan analizado. En un estudio realizado en la población Brahmin de Haryana, India, se analizaron las tres HVR en 64 muestras, realizando tres cálculos de diversidad haplotípica: con sólo la HVR I (0.986 +/- 0.006); considerando las HVR I y II (como normalmente es realizado en la práctica forense) (0.986 +/- 0.005); y el último añadiendo la HVR III, (0.999 +/- 0.002) (Verma et al., 2018). En 2008, se analizaron 100 muestras de individuos sin relación de parentesco y que residían en Caracas, Venezuela, analizando las HVR I, II y III y reportando la diversidad haplotípica en dos cálculos: únicamente las HVR I y II (0.9842); y las tres HVR juntas (0.9863) (Lander et al., 2008). En un trabajo de ancestría mitocondrial en población mexicana-mestiza, se analizaron las HVR I y II de 270 muestras tomadas de mujeres mexicanas sanas, reportando una diversidad haplotípica de 0.9945 (Guardado-Estrada et al., 2009).

A pesar de que en el presente trabajo el número de individuos es considerablemente menor a los estudios referidos con anterioridad, la obtención de una mayor diversidad

haplotípica (con un valor de 1) y un mayor promedio de diferencias por par entre los 10 haplotipos obtenidos recae en la inclusión de la HVR III en el análisis. Esto es soportado por los valores reportados en los estudios sobre población venezolana e india, pues al utilizar sólo las HVR I y II, obtuvieron un valor más bajo (0.9842 y 0.986 respectivamente) que aquel obtenido al momento de incluir la HVR III (0.9863 y 0.999 respectivamente).

Muestra	Haplogrupo	Calidad	Polimorfismos
LCF-07	A2d	89.95%	16111T, 16129A, 16169T, 16223T, 16234T, 16290T, 16319A, 16362C, 73G, 146C, 235G, 263G, 315.1C, 522DEL, 523DEL
LCF-10	A2+(64)+16129	90.21%	16093C, 16111T, 16129A, 16223T, 16290T, 16319A, 16362C, 73G, 146C, 153G, 204C, 249G, 235G, 263G, 309.2C, 315.1C
LCF-03	A2u1	98.80%	16111T, 16136C, 16223T, 16257T, 16290T, 16311C, 16319A, 16344T, 16362C, 73G, 146C, 153G, 235G, 263G, 315.1C, 522DEL, 523DEL
LCF-08	A2u1	91.62%	16111T, 16136C, 16223T, 16247G, 16257T, 16274A, 16290T, 16319A, 16344T, 16362C, 73G, 146C, 153G, 235G, 263G, 309.1C, 315.1C, 522DEL, 523DEL
LCF-04	A2	98.35%	16111T, 16156A, 16223T, 16290T, 16311C, 16319A, 16362C, 73G, 146C, 153G, 235G, 263G, 315.1C, 522DEL, 523DEL
LCF-01	B2t	95.05%	16051G, 16189C, 16217C, 16259T, 16357C, 73G, 263G, 315.1C, 499A
LCF-09	B4	100%	16182C, 16183C, 16189C, 16217C, 73G, 263G, 309.2C, 315.1C, 321G
LCF-02	C1b1	94.66%	16223T, 16274A, 16298C, 16325C, 16327T, 73G, A249DEL, 263G, 288G, 290DEL, 291DEL, 309.1C, 315.1C, 489C, 493G, 522DEL, 523DEL
LCF-05	C1	93.81%	16223T, 16298C, 16325C, 16327T, 73G, 249DEL, 263G, 290DEL, 291DEL, 309.1C, 315.1C, 489C, 502T
LCF-06	D1a	91.29%	16223T, 16325C, 16362C, 73G, 152C, 263G, 315.1C, 480C, 489C

Cuadro 6. Reporte de haplogrupos y polimorfismos de las muestras estudiadas. Las 10 muestras fueron clasificadas en su respectivo haplogrupo con la ayuda de HaploGrep, que a partir de los polimorfismos identificados en las secuencias de las tres HVR, asignó los haplogrupos y determinó la calidad de dicha clasificación. Esta calidad depende de si todos los polimorfismos de las muestras coinciden con las variaciones que están reportadas en la base de datos de este software (como fue el caso de la muestra LCF-09), por lo que, entre menor sean las coincidencias entre las muestras y la base de datos, menor será el porcentaje de calidad, sin embargo, esto no implica que el análisis de los polimorfismos sea equívoco, pues las diferencias pueden deberse a mutaciones localizadas, hot spots, entre otras cuestiones.

Por otra parte, la heterocigosidad promedio de los sitios polimórficos analizados fue de 0.35225, que es un valor esperado, pues al ser un marcador genético heredado por vía materna y que no sufre recombinación, es únicamente útil en el establecimiento de linajes maternos compartidos.

Los sitios polimórficos que presentaron una heterocigosidad mayor al 0.5 fueron las posiciones 16111, 16290, 16319 de la HVR I; 146, 152, 153, 235, 249, 309, 315 de la HVR II; y 522, 523 de la HVR III. La totalidad de la región control tiene una tasa de mutación entre 0.0574 – 0.2860 mutaciones/sitio (Santos et al., 2008), es decir, que todas las posiciones que componen la región control tienen la misma probabilidad de mutar, sin embargo, los polimorfismos observados en estas posiciones son característicos de los haplogrupos amerindios reportados en población mexicana (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009; Martínez-Cortés et al., 2013).

Con estos datos se hizo un cálculo exploratorio de probabilidad de coincidencia al azar, que tuvo un valor del 10% (lo que indica que de cada 10 veces que se analice una muestra seleccionada de forma aleatoria, al menos 1 de 10 veces coincidirá con el haplotipo de otro individuo dentro de la muestra); con un poder de discriminación del 90%. Es importante recalcar que estos valores son muy bajos y sí son sensibles al tamaño de la muestra, que, en este caso, se trata de una muy pequeña (pues sólo se analizaron 10 muestras de diferentes individuos), si se compara con el tamaño de las muestras empleadas en diversas bases de datos publicadas en otros trabajos (Parson & Dür, 2007), siendo la base de datos de EMPOP la que mayor número de individuos contempla (48,572 en su última actualización en 2019) (EMPOP, 2019; Guardado-Estrada et al., 2009; Ruiz-Pesini et al., 2007). Por lo anterior, este valor debe ser tomado con cautela, pues 10 individuos no representan una muestra lo suficientemente grande para obtener una conclusión más certera, por lo que se reitera la necesidad de ampliar el número de individuos.

Para obtener el valor de la probabilidad de coincidencia al azar, se tiene que dividir 1 (100% de coincidencia entre dos muestras) entre el número de muestras que se tiene; dicho resultado será elevado al cuadrado y ese valor será multiplicado por el número de muestras

estudiadas. Seguido a esto, se tiene entonces $1/10=0.1$; $0.1^2 =0.01$; $0.01 \times 10 = 0.1$. Para obtener dicho valor en porcentaje, basta con multiplicar el resultado por 100 ($0.1 \times 100 = 10$). Dentro del ámbito forense, se busca que los valores de probabilidad de coincidencia aleatoria sean mínimos, por lo que, al ser este parámetro sensible al tamaño de la muestra, es necesario contar con la mayor cantidad de individuos posibles dentro de la base de datos. Siguiendo lo anterior, por ejemplo, si contáramos con 500 individuos en la muestra, el valor de la probabilidad de coincidencia al azar sería de 0.2%.

Agrupamiento de haplotipos

De las muestras analizadas, el 100% de los individuos fueron asignados a uno de los haplogrupos amerindios: A2, B, C1 y D1, con frecuencias del 50, 20, 20 y 10% respectivamente. La presencia de estos haplogrupos refleja la descendencia que tienen los individuos mexicanos de poblaciones asiáticas, a partir de la colonización de éstas últimas dentro del continente americano (Peñaloza et al., 2014). A pesar del tamaño de la muestra ($n=10$) y la diferencia que presenta con otros trabajos, los porcentajes mantienen proporciones similares. En el estudio de ancestría mitocondrial en población mexicana-mestiza, se reportaron haplogrupos amerindios, europeos y africanos, donde predominó el primero con un 93.3%, dentro del cual, el 51.1% correspondió al haplogrupo A2; 17.8% al B; 18.5% al C1; y 5.9% al D1 (Guardado-Estrada et al., 2009). En uno de los estudios más recientes sobre diversidad mitocondrial en población mexicana, se analizaron los polimorfismos de 2021 individuos, donde el haplogrupo amerindio más frecuente fue el A2 con un 41.8%, seguido del C1 con 23.7%, el haplogrupo B con 17.6%, y el haplogrupo D1 con 5.5% (Bodner et al., 2021). Existen otros estudios íntimamente relacionados con las distintas zonas geográficas de nuestro país, donde, a partir de los fenómenos de desplazamiento y de mestizaje que se han vivido a lo largo de la historia de México, se ha evidenciado una diversidad mitocondrial vasta, donde en regiones del norte (como en el estado de Sonora) predomina el haplogrupo A, mientras que en zonas centrales (como Guanajuato) y del sur del país (como Guerrero) es más común el haplogrupo B (González-Sobrino et al., 2016).

Si bien hay diferencias entre los porcentajes de los haplogrupos entre los estudios mencionados y los que son reportados en el presente trabajo, las proporciones se mantienen relativamente constantes, es decir, que a pesar de tener distintos valores de porcentajes, así como un menor número de individuos dentro de la muestra, comparado con los 270 y 2021 que tienen las investigaciones de Guardado y colaboradores y la de Bodner y colaboradores, el haplogrupo A2 mantiene una mayor predominancia por encima de los tres restantes.

Curiosamente, dentro del tracto de citosinas de la HVR II (nt 303-215), el 100% de los individuos presentaron una inserción de C en la posición 315, a diferencia de las cinco que se reporta en la rCRS. Respecto a las inserciones del mismo nucleótido en la posición 309, sólo el 50% de los individuos la presentó.

Por otro lado, los 10 individuos presentaron el cambio de una adenina por una guanina en la posición 73 de la HVR II. Esto también fue observado en el estudio de ancestría en población mexicana-mestiza, donde sólo 4 de 270 muestras pertenecientes a los haplogrupos amerindios no presentaron este polimorfismo, y además, fue observado en 11 de 16 muestras clasificadas en haplogrupos europeos, y en el 100% de las muestras clasificadas en haplogrupos africanos (Guardado-Estrada et al., 2009).

Haplogrupo A2

Las posiciones polimórficas características de este haplogrupo son 16111, 16223, 16290, 16319 y 16362 para la HVR I; 146, 153 y 235 para la HVR II (Snow et al., 2010; Starikovskaya et al., 1998; Tamm et al., 2007). Para la HVR III de las 10 muestras analizadas, se observó que en 4 de 5 muestras, se observa la existencia de deleciones en las posiciones 522 y 523, las cuales han sido reportadas para poblaciones de la tribu Urali Kuruman en el sur de India (Sylvester et al., 2018).

De los cinco haplotipos que conformaron el haplogrupo A2, cuatro de ellos presentaron las deleciones en las repeticiones de dinucleótidos CA dentro de esta HVR, donde la rCRS reporta cinco pares (CACACACACA). En 4 de las 5 muestras que pertenecen

a este haplogrupo, dentro de este tracto de repeticiones, únicamente se contaron cuatro pares (CACACACA), lo que también ha sido reportado para población venezolana (Lander et al., 2008), tailandesa (Thongngam et al., 2016), y coreana (Chung et al., 2005). Los cinco individuos clasificados en este haplogrupo presentaron una timina en lugar de una citosina en la posición 16111, siendo éste el polimorfismo diferenciador entre el haplogrupo A1 y A2 (Guardado-Estrada et al., 2009).

Los cinco individuos que conforman el haplogrupo A2 presentaron inserciones en la posición 315 de la HVR II, mientras que sólo dos muestras presentaron inserciones en la posición 309. Estos polimorfismos se encuentran dentro de un tracto grande de citosinas (poly-C tract, en inglés), que es una variación en la secuencia bastante común, y que puede dificultar la secuenciación de los nucleótidos siguientes a dicha región (Zhao et al., 2010). Como particularidad, la muestra LCF-10 fue clasificada como parte del haplogrupo A2+(64)+16129, que también ha sido reportado en los análisis a evidencias antiguas provenientes de Aguazuque, Colombia (Haplotree, 2021), en población española, específicamente de Granada, Málaga y Almería (Guinaldo, 2016), pero también en población mexicana contemporánea (Bodner et al., 2021). Adicionalmente, el polimorfismo 16129A ha sido reportado para los haplogrupos L1a, L1c, L2b, los cuales fueron identificados en población africana (Allard et al., 2005).

Dos de las cinco muestras fueron clasificadas como pertenecientes al subhaplogrupo A2u1, el cual es diferenciado del A2u2 por las variaciones 16257T y 16344T, y este es un subhaplogrupo que se ha observado en individuos pertenecientes a poblaciones Tepehuas y Zapotecas (Zillges, 2013).

Haplogrupo B

Dentro de este haplogrupo se clasificaron 2 de 10 individuos y fue el segundo más frecuente dentro de los haplogrupos amerindios encontrados dentro de la muestra. Las variaciones características de este haplogrupo son 16189C en la HVR I (Achilli et al., 2008; Tamm et al., 2007).

Una de las dos muestras fue asignada al subhaplogrupo B2t, que adicionalmente cuenta con las variaciones 16259T y 16357C como características (Haplogroup, 2013), y la presencia de otras como 16183C, 16217C, 16259T, 16357C (González-Oliver et al., 2017). La muestra LCF-01 con este haplogrupo, también presenta variaciones en las posiciones 16051 para la HVR I, 315 en la HVR II y 499 en la HVR III. El polimorfismo 16051G se ha encontrado en la HVR I de individuos sudamericanos clasificados dentro del haplogrupo C1 (Sans et al., 2015), en parte de población africana-americana dentro del subhaplogrupo L3e (Johnson et al., 2015) y en individuos mestizo-mexicanos considerados parte de los haplogrupos A2, C1, H, L (Guardado-Estrada et al., 2009). La variación 499A de la HVR III se considera característica del haplogrupo U4, que es mayoritariamente encontrado en población de Eurasia Occidental (Röck et al., 2013), que también comprende algunas regiones geográficas de la India.

Dentro de la región control existen tractos homopoliméricos de varias citosinas, localizadas en la HVR I y la HVR II en las posiciones 16184-16188, 16190-16193, y 311-315 respectivamente. Dentro del tracto de citosinas de la HVR I, se ha reportado un cambio de timina por citosina en la posición 16189 (Guardado-Estrada et al., 2009), que de hecho ha sido localizado en las muestras LCF-01 y LCF-09 que corresponden al haplogrupo B. La variación particular en la HVR II (posición 315) ha sido reportada en individuos caucásicos con el haplogrupo V (Coble et al., 2004), individuos ibéricos “antiguos” clasificados dentro de los haplogrupos H, R y U (Palencia-Madrid et al., 2017), e individuos bolivianos pertenecientes al pueblo indígena Uru (Villarroel, 2011). Esta inserción no sólo fue observada en el haplogrupo B2t, sino también en el haplogrupo B4, que además comparte las variaciones en 16189, 16217, 73, 263.

Sobre la muestra LCF-09 correspondiente al haplogrupo B4, presentó el cambio de una adenina por una citosina en la posición 16182, la cual ha sido observada también en el haplotipo B2 (Guardado-Estrada et al., 2009).

Haplogrupo C

El haplogrupo C estuvo presente en dos individuos (20%) de la muestra total, presentando la misma proporción que el haplogrupo B. El primer haplogrupo mencionado se caracteriza por los polimorfismos 16223T, 16298C, y 16327T en la HVR I (Tamm et al., 2007). Las muestras LCF-02 y LCF-05, a pesar de haber sido agrupadas en subhaplogrupos distintos (C1b1 y C1 respectivamente), ambas comparten estos polimorfismos característicos.

En el caso del haplogrupo C1, adicionalmente a estas variaciones, se reporta el cambio de una timina por una citosina en 16325 de la HVR I; y la existencia de una delección de una adenina en la posición 291 en la HVR II (Tamm et al., 2007), lo cual corresponde con los polimorfismos que fueron encontrados en la muestra LCF-05. El haplogrupo C1 tiene una distribución geográfica contemporánea en asiáticos del este y es considerada como uno de los “haplogrupos fundadores” en población nativa americana (Perego et al., 2010), sin embargo, este haplogrupo y algunas variantes nuevas del mismo, ha sido encontrado en individuos de Islandia (Ebenesersdóttir et al., 2011), a pesar de ser considerado un haplogrupo poco común en población europea (Der Sarkissian et al., 2014).

La delección doble en 290 y 291 ha sido considerada como una variación nueva, sin embargo, es un polimorfismo considerado como característico del haplogrupo C1 (Bandelt et al., 2006). Esta delección también ha sido parte del haplogrupo C1c1 encontrado en población mexicana contemporánea (Bodner et al., 2021) y en el haplogrupo C1b2 de acuerdo con bases de datos forenses, como EMPOP (Holt et al., 2021).

La muestra LCF-05 también presenta el polimorfismo 489C dentro de la HVR III. La variación 489C ha sido reportada dentro del haplogrupo M (Guo et al., 2012), que es más frecuente en poblaciones de Oceanía y porciones centrales, sureñas y orientales de Asia (Pauro et al., 2010); y también en el haplogrupo J dentro del estudio de restos de antiguos conquistadores húngaros (Neparáczki et al., 2017).

El subhaplogrupo C1b1 ha sido encontrado en población nativa americana en Sudamérica (Noguera-Santamaría et al., 2015, p.) y en población mexicana contemporánea

(Bodner et al., 2021), lo cual soporta la clasificación de la muestra LCF-02 dentro de este haplogrupo. Esta muestra, además de tener el común con la muestra LCF-05 el polimorfismo 489C, presenta las variaciones 493G, 522DEL y 523DEL. El cambio de una adenina por una guanina en 493, ha sido reportada como característica del haplogrupo C1b (Tamm et al., 2007), mientras que las deleciones en 522 y 523 (ocasionando que se tengan cuatro pares de las repeticiones CA, en vez de cinco, como lo reporta la rCRS) dentro de la HVR III, como se ha mencionado anteriormente, han sido localizadas en poblaciones asiáticas y sudamericanas.

Haplogrupo D1

Este haplogrupo fue el menos frecuente dentro de la muestra (10%), pues sólo un individuo fue clasificado en él. Los polimorfismos diagnósticos de este haplogrupo son 16223T, 16325C, 16362C para la HVR I (Tamm et al., 2007). El haplogrupo D1 se deriva del haplogrupo D, que es un haplotipo asiático, (Cai et al., 2009; Guardado-Estrada et al., 2009), a partir de la presencia de una variación en 16325 (Achilli et al., 2008) que no es reportada como parte del haplogrupo asiático, sin embargo, el haplogrupo D1 también ha sido reportado en población en población de Siberia (Gilbert et al., 2008) y en población mexicana, particularmente en un individuo Mazahua (Mizuno et al., 2014).

La muestra LCF-06 fue la única que presentó este haplogrupo, y adicionalmente a los polimorfismos característicos anteriormente mencionados, ésta presenta las variaciones 152C en la HVR II; y 480C, 489C en la región HVR III. La variación en 152 ha sido reportada en individuos pertenecientes al haplogrupo B (Liou et al., 2012); en población de Brahmin, India pertenecientes al haplogrupo B (Verma et al., 2018), en contraste con el estudio de ancestría en población mexicana-mestiza, que no reporta la presencia de este polimorfismo en individuos dentro del haplogrupo D1 (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009).

Por otro lado, la variación en 480 de la HVR III ha sido reportada en los haplogrupos H, R, y U, que son comúnmente encontrados en población europea y asiática (particularmente en China) respectivamente (Guardado-Estrada et al., 2009; Rakha et al., 2016; Yang et al.,

2008), mientras que la variación en la posición 489 ha sido reportada en poblaciones asiáticas, europeas y de Oceanía, como se mencionó anteriormente.

Red de haplotipos mitocondriales

Las secuencias de los 10 individuos analizados en el presente trabajo fueron clasificadas en haplogrupos que después se representaron en una red de expansión mínima (Minimum Spanning Network, MSN por sus siglas en inglés) (Clement et al., 2000) (Figura 29). Dentro de estas redes, los haplotipos que corresponden a los mismos haplogrupos fueron agrupados. Se observa que dentro de esta red, los individuos pertenecientes al haplogrupo A no se relacionan con los individuos de los haplogrupos B, C1 y D1, lo cual puede deberse a la existencia de numerosos pasos poblacionales entre los individuos del haplogrupo A y aquellos que no pertenecen a este, por lo que se decidió elaborar redes por separado: una que represente la topología de los individuos del haplogrupo A (Figura 29(a)) y otra elaborada sobre los individuos pertenecientes a los haplogrupos B, C1 y D1 (Figura 29(b)).

La utilización de esta red de topología mitocondrial nos permite entender cuál es la cercanía (respecto a los pasos mutacionales) que se tiene entre un haplotipo y otro. Por ejemplo, en la red elaborada para los individuos del haplogrupo A, se observa que existen la misma cantidad de pasos mutacionales de la muestra LCF-03, y las muestras LCF-08 y LCF-04 (Figura 29(a)). Por otro lado, los haplotipos de las muestras LCF-07 y LCF-10 se encuentran más alejadas del haplotipo de la muestra LCF-03, siendo LCF-10 la que mayor distancia presenta (con 10 pasos mutacionales). Respecto a las muestras LCF-07 (haplogrupo A2d) y LCF-10 (haplogrupo A2+(64)+16129), si bien están alejadas entre sí por 10 pasos mutacionales, ambas tienen un nodo en común que deriva de los pasos mutacionales dados a partir de la muestra LCF-07 (haplogrupo A2). Los pasos mutacionales que existen entre la muestra LCF-10 y la muestra LCF-04 podrían explicarse a que la primera presenta un haplotipo poco común en la población mexicana, sin embargo, para corroborar esta hipótesis, sería necesario incrementar el tamaño de la muestra para conocer la frecuencia que presenta.

En el caso de los individuos que no son parte del haplogrupo A, se puede observar que ningún haplotipo deriva directamente de otro, sin embargo, todos se encuentran relacionados por los pasos mutacionales que existen entre ellos. A pesar de esta particularidad, los individuos del haplogrupo B se encuentran agrupados, y lo mismo sucede con los individuos que corresponden al haplogrupo C1, dejando sin agrupar al individuo del haplogrupo D1 (pues sólo fue uno).

A partir de la rCRS, existen cinco pasos mutacionales hacia los individuos de los haplogrupos B. Este quinto paso mutacional se puede considerar como un nodo en común entre las muestras LCF-01 (haplogrupo B4) y LCF-09 (haplogrupo B2t), a pesar de tener una distancia considerable entre ellas (12 pasos mutacionales) (Figura 29(b)). La lejanía que existe entre estas dos muestras, así como la ausencia de un haplogrupo en común, podría ser explicada por el número de individuos que componen la muestra, sin embargo, para confirmar esta suposición, sería necesario incrementar el número de individuos que componen la muestra.

Los individuos de los haplogrupos C1 y D1 son los que mayor lejanía presentan con respecto a la rCRS (15 y 11 pasos mutacionales respectivamente). Los haplotipos del haplogrupo C se encuentran bien agrupados, pues sólo existen cuatro pasos mutacionales entre ellos, lo cual es coincidente con los polimorfismos reportados entre las muestras LCF-02 y LCF-05 que corresponden a este haplogrupo, pues ambas se diferencian entre sí sólo por los polimorfismos 16274A, 288G, 493G y las deleciones en 522 y 523 (LCF-02); y con la variación 502T de la muestra LCF-05 (Cuadro 6). Los individuos de los haplogrupos C1 y D1 comparten un nodo central, sin embargo, están bien diferenciados entre ellos, con 9 pasos mutacionales entre la muestra LCF-06 y la muestra LCF-05; y 12 pasos mutacionales entre la primera mencionada y la muestra LCF-02.

Particularmente, las muestras LCF-02, LCF-04, LCF-07, LCF-08 y LCF-10 (todas clasificadas en el haplogrupo A2) no fueron agrupadas en la misma red que las demás muestras, pues son 4 de las muestras con mayor número de variaciones (lo que implica mayores pasos mutacionales entre ellas y las demás muestras), sin embargo, para confirmar esta hipótesis, se necesita aumentar el tamaño de la muestra y con ello observar si es posible un mejor agrupamiento.

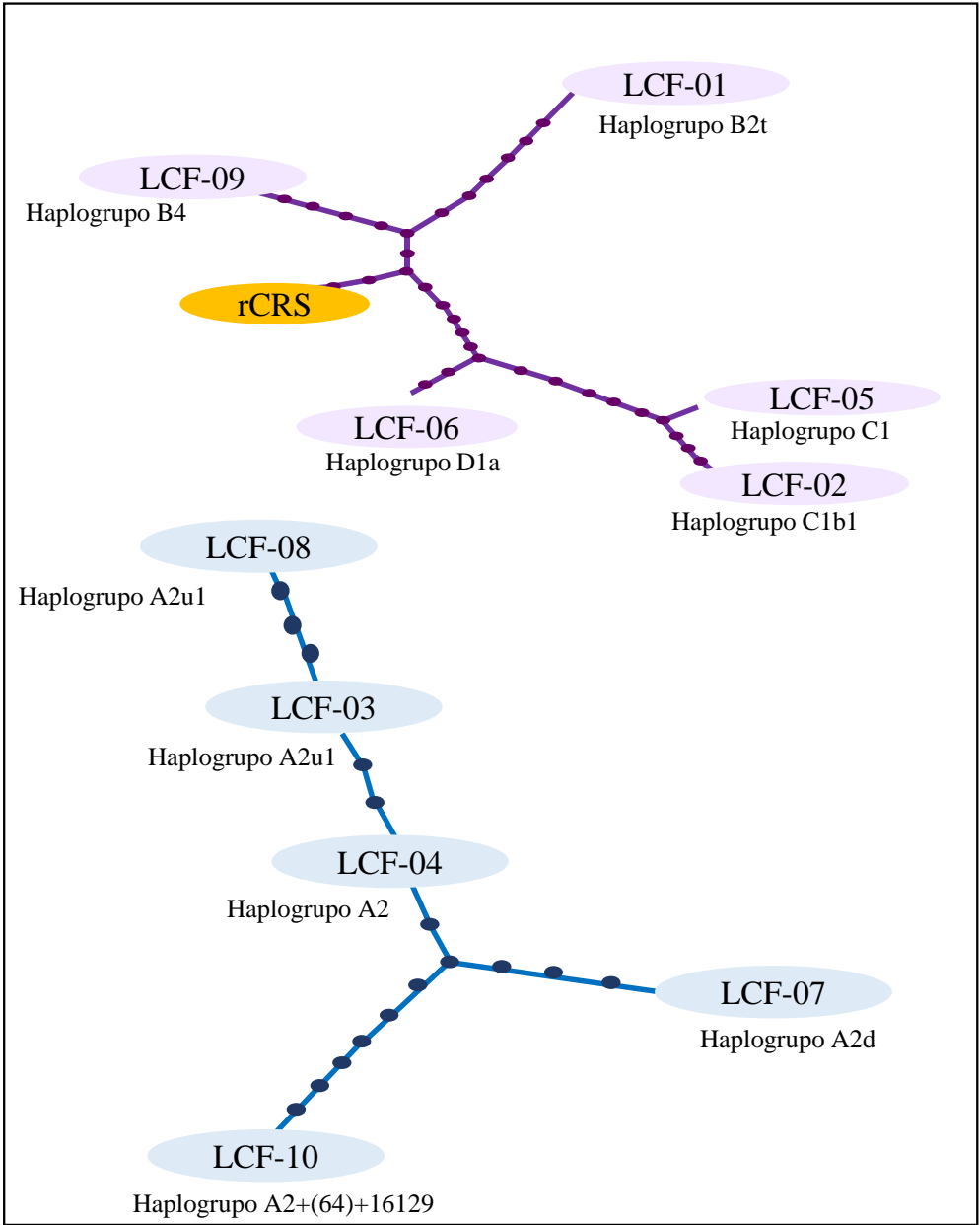


Figura 29. Red de haplotipos. Esta red de haplotipos fue construida a partir de las secuencias de las tres regiones hipervariables de la región control del mtDNA. Los círculos pequeños que se encuentran sobre las líneas que unen a los distintos haplotipos, representan los principales pasos mutacionales que existen entre los polimorfismos que presentó un haplotipo, y aquellos dentro de otro distinto.

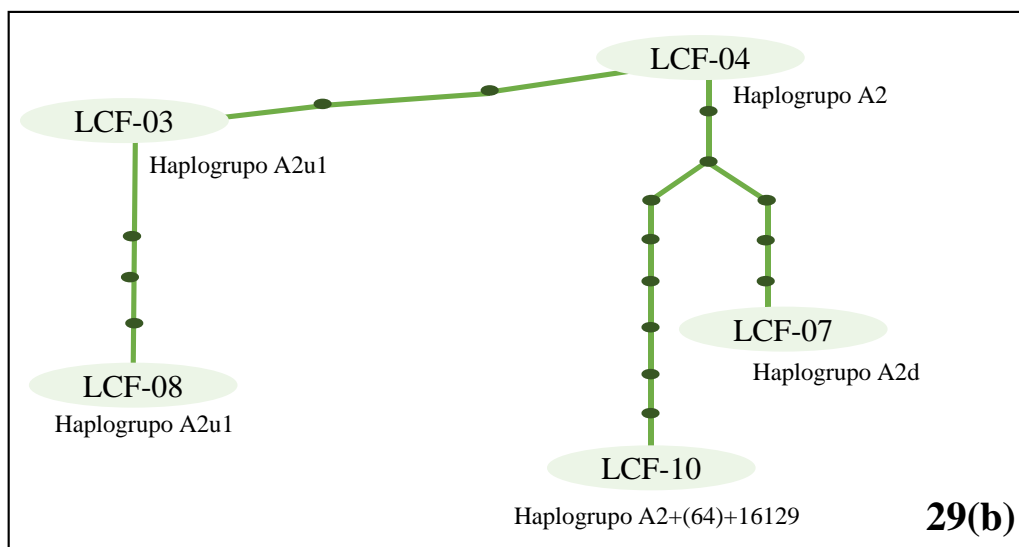


Figura 29(a). Red de haplotipos para el haplogrupo A. Los óvalos que contienen el nombre de las muestras representan el haplotipo correspondiente a cada una de ellas, y cómo se relacionan entre sí. Los círculos pequeños que se encuentran sobre las líneas que unen a los distintos haplotipos, representan los principales pasos mutacionales que existen entre los polimorfismos que presentó un haplotipo, y aquellos dentro de otro distinto.

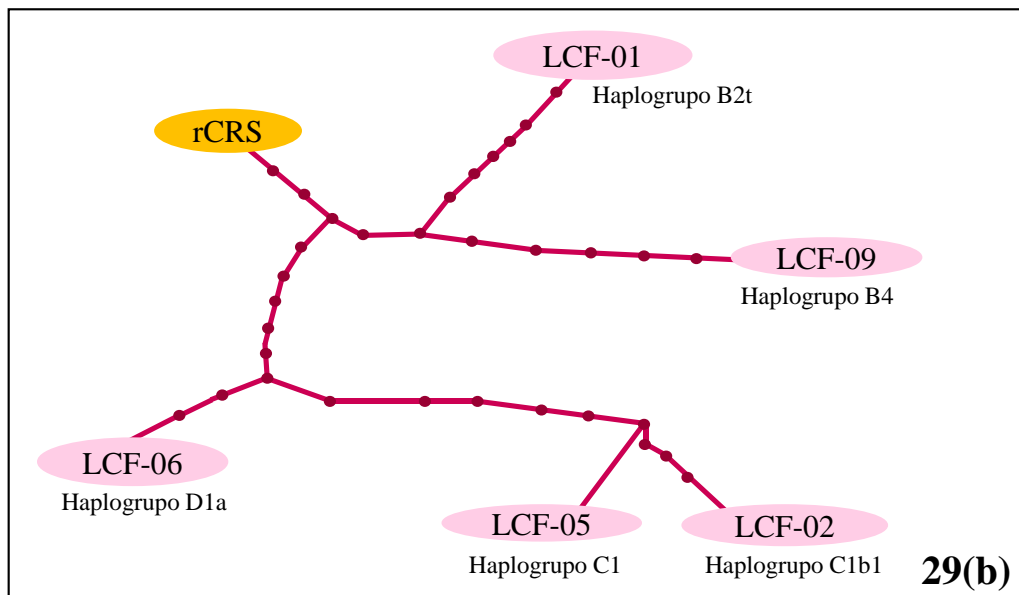


Figura 29(b). Red de haplotipos para los haplogrupos B, C1 y D1. Los círculos pequeños que se encuentran sobre las líneas que unen a los distintos haplotipos, representan los principales pasos mutacionales que existen entre los polimorfismos que presentó un haplotipo, y aquellos dentro de otro distinto.

Estas redes de haplotipos son una forma de ver que tan bien están clasificados los individuos en los haplogrupos asignados a partir de los polimorfismos observados, así como ver la evolución que tiene cada haplotipo, con respecto a la rCRS. De acuerdo con las Figuras 31, 31(a) y 31(b), así como lo reportado en el Cuadro 6, las 10 muestras se agruparon en los mismos haplogrupos tanto en el alineamiento hecho por ClustalX, como en el software TCS de Clement, por lo que podemos decir que los polimorfismos encontrados en los 10 individuos analizados, corresponden acertadamente a los haplogrupos en los que fueron asignados.

Vale la pena mencionar que en el presente trabajo, el análisis poblacional realizado tuvo un fin exploratorio, pues para poder tener un estimado certero que pueda ser comparable con resultados ya publicados, se necesita un tamaño de muestra mucho más grande.

CONCLUSIONES

Con la presente propuesta de protocolo se pudo amplificar y secuenciar las regiones hipervariables I, II y III del mtDNA. Empleando dicho protocolo se pudo identificar adecuadamente el polimorfismo presente en dichas regiones en 10 muestras seleccionadas de la colección de muestras de mtDNA del Laboratorio de Genética de la Licenciatura en Ciencia Forense.

El diseño y la estandarización del protocolo incluyeron dos cebadores externos específicos para las tres HVR: L-15926 (Guardado-Estrada et al., 2009) y H-727 (Fridman et al., 2014). Estos fueron utilizados para lograr obtener la amplificación de las tres HVR como un solo amplicón. Adicionalmente, se utilizaron dos cebadores internos (L-16410 y H-00015) en conjunto con los dos primeros para realizar el procedimiento de marcaje con terminadores fluorescentes durante la secuenciación.

Las condiciones de la PCR incluyeron una concentración de $MgCl_2$ a 2mM, y una temperatura de alineamiento (T_m) de 60°C. Bajo estas condiciones se pudo amplificar exitosamente las tres regiones, lo cual fue corroborado en 10 muestras de individuos mestizo-mexicanos.

Estos cebadores también pudieron ser utilizados para realizar la reacción de marcaje de los productos de PCR, utilizando los parámetros establecidos por el protocolo de Applied Biosystems® (Applied Biosystems, 2010). Con esto, se obtuvieron las secuencias de las tres HVR del mtDNA en las 10 muestras seleccionadas, tanto de la cadena principal (utilizando los cebadores forward L-15926 y l-00015), como de su complementaria (empleando los cebadores H-16410 y H-727).

En el análisis de las secuencias obtenidas, en todas las muestras se pudieron identificar los polimorfismos presentes en dichas regiones, siendo la muestra LCF-03 en la cual se identificaron el mayor número de variaciones (17 en total), mientras que las muestras LCF-01, LCF-06 y LCF-09 fueron aquellas con menor número de polimorfismos (9 en total).

Del polimorfismo obtenido de las 10 muestras analizadas, se pudo identificar el haplogrupo mitocondrial al que pertenecen estas muestras, los cuales corresponden a haplogrupos mexicanos y/o amerindios (Bodner et al., 2021; Guardado-Estrada et al., 2009).

Aunque en el análisis poblacional exploratorio de estas tres regiones se observó una mayor diversidad genética, para obtener resultados más precisos se requiere incrementar el tamaño de la muestra analizada. Esto a su vez, permitirá tener una mejor resolución en las redes de expansión mínima con ayuda del software TCS Clement.

PERSPECTIVAS

Desde el 15 de marzo de 1964 hasta el 04 de diciembre del 2021, se tiene registro de 95,348 personas reportadas como desaparecidas y no localizadas, siendo el Estado de México la entidad federativa con el mayor índice hasta esa fecha, con 22,878 personas registradas (SEGOB, 2021). Dentro de esta situación que embarga al país, se suma la llamada crisis forense en materia de identificación humana, pues se ha reportado que existen más de 52,000 personas fallecidas sin identificar, encontrándose en fosas comunes dentro de cementerios (60%), instalaciones de servicios forenses (7%), universidades (5%) o centros de resguardo forense (1%), mientras que el 27% restante se desconoce su paradero. (GIZ, 2021).

A pesar de los esfuerzos que se han hecho últimamente para tratar de mitigar la actual crisis (como la creación de Centros Regionales de Identificación o laboratorios especializados para identificación humana), nos encontramos con limitaciones de recursos que no permiten una adecuada participación en esta materia. Además, la falta de expertos con una acertada capacitación en el tema, es un área de oportunidad considerable para poder actuar de manera eficiente ante esta problemática.

Dentro del abanico de especialidades forenses que pueden coadyuvar en la identificación forense de personas, la genética ha sido una de las más socorridas, pues gracias a los avances tecnológicos, es posible obtener información útil que nos permita individualizar a las personas, a través del análisis de STRs autosómicos. Sin embargo, la limitación de estos marcadores genéticos comienza cuando las muestras a estudiar se encuentran degradadas (accidental o intencionalmente) o en muy poca cantidad.

El mtDNA ha sido utilizado en muchas regiones del mundo como una herramienta alternativa para poder orientar las investigaciones que tienen como objetivo conocer la identidad de una persona, como en casos de desastres masivos y eventos que derivan en el ejercicio de una violencia sistemática, sin embargo, en México es un área muy poco explorada. Si bien el análisis del polimorfismo mitocondrial tiene limitaciones, como el

únicamente poder establecer una relación de parentesco por vía materna, su uso rutinario en los laboratorios forenses permitiría establecer una orientación sobre quién podría ser la persona que se busca identificar.

A partir de los resultados obtenidos y los trabajos consultados para población mexicana, nos podemos dar cuenta de la falta de investigaciones sobre el polimorfismo mitocondrial que incluyan la HVR III. Esto, en el ámbito forense, resulta relevante, pues, como también fue revisado en este trabajo, incluir esta tercera región hipervariable, aumenta el poder de discriminación de este marcador, lo que puede favorecer la utilización del polimorfismo mitocondrial con fines de identificación humana.

La conclusión del establecimiento de una relación de parentesco entre los restos analizados y las muestras de referencia con el uso de mtDNA dependerá del investigador de algún hecho delictivo o contextos independientes a ello (como desastres masivos), pues el contexto completo del caso (circunstancias, fechas de desaparición, lugares, etc.) es lo que ayudará a que la interpretación integral que la información mitocondrial establezca, específicamente si existe o no esta relación biológica entre la muestra dubitada y la muestra de referencia, sea utilizada para determinar una posible coincidencia.

Para poder ampliar el poder de discriminación hacia valores significativos, es necesario contar con bases de datos robustas que permitan aumentar la certeza de coincidencia entre una muestra problema y una muestra de referencia. Este protocolo tiene como objetivo sentar las bases del análisis experimental de los polimorfismos de las tres regiones hipervariables de la región control del mtDNA para que éste sea implementado de manera rutinaria en los laboratorios forenses. Una de las perspectivas que actualmente existen sobre el uso del mtDNA para identificación humana, recae en expandir el análisis de polimorfismos hacia todo el genoma mitocondrial (Amorim et al., 2019; Cuenca et al., 2020; Yao et al., 2019), lo cual podría aumentar aún más el poder de discriminación que se tiene, recordando lo idóneo de dicha situación. Por otro lado, la creación de bases de datos específicamente de población mexicana resulta imperativo para utilizar este marcador genético de manera significativa, pues como fue sugerido en la presente investigación, es

necesario contar con un gran número de individuos para poder obtener resultados certeros desde una perspectiva poblacional, la cual puede ser utilizada en parámetros como la probabilidad de coincidencia aleatoria, que es altamente útil en el área forense.

Adicional a la aplicación forense que puede tener el análisis de los polimorfismos presentes en la región control del mtDNA, se han publicado estudios sobre el uso de este marcador genético para el mejor entendimiento de la relación que poseen estas variaciones con las enfermedades cardiovasculares (Umbria et al., 2020); leucemia mieloide aguda (J. Zhou et al., 2017); o en la expresión de complejos mitocondriales y cambios en la forma de la mitocondria al tratarse de tejidos afectados por retinoblastomas (Singh et al., 2014). El análisis de los polimorfismos en la región control del genoma mitocondrial puede ser utilizado también en investigaciones que buscan entender el proceso de evolución humana (Ingman, 2003) y del propio genoma mitocondrial (Elson et al., 2004); e incluso entender su tasa de mutación (Sigurðardóttir et al., 2000).

BIBLIOGRAFÍA

Abrams, D. B., Turner, J. R., Baumann, L. C., Karel, A., Collins, S. E., Witkiewitz, K., Fulmer, T., Tanenbaum, M. L., Commissariat, P., Kupperman, E., Baek, R. N., Gonzalez, J. S., Brandt, N., Flurie, R., Heaney, J., Kline, C., Carroll, L., Upton, J., Buchain, P. C., ... Wiebe, D. J. (2013). Allele. En M. D. Gellman & J. R. Turner (Eds.), *Encyclopedia of Behavioral Medicine* (pp. 66-66). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1005-9_676

Achilli, A., Perego, U. A., Bravi, C. M., Coble, M. D., Kong, Q.-P., Woodward, S. R., Salas, A., Torroni, A., & Bandelt, H.-J. (2008). The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. *PLoS ONE*, 3(3), e1764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001764>

Aguirre, E. (2007). Flujo génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En L. E. Eguarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Universidad Nacional Autónoma de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y la Biodiversidad. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap2.pdf>

Allard, M. W., Polanskey, D., Miller, K., Wilson, M. R., Monson, K. L., & Budowle, B. (2005). Characterization of human control region sequences of the African American SWGDAM forensic mtDNA data set. *Forensic Science International*, 148(2-3), 169-179. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.06.001>

Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*, 7, e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457-465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>

Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M., & Howell, N. (1999). *Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA*. 23, 147. <https://doi.org/10.1038/13779>

Applied Biosystems. (2009). *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis*. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf

Applied Biosystems. (2010). *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*.

Applied Biosystems. (2017). *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup*. ThermoFisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS->

Assets%2F78200b.pdf&title=QnJpZWYgUHJvdG9jb2w6IEV4b1NBUC1JVCBQQ1IgUHJvZHVjdCBDDbGVhbnVwIEJyaWVmIFByb3RvY29s

Arenas, M., Pereira, F., Oliveira, M., Pinto, N., Lopes, A. M., Gomes, V., Carracedo, A., & Amorim, A. (2017). Forensic Genetics and Genomics: Much More than Just a Human Affair. *PLOS Genetics*, *13*(9), e1006960. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006960>

Ballard, D. (2016). Analysis of Mitochondrial Control Region Using Sanger Sequencing. En W. Goodwin (Ed.), *Forensic DNA Typing Protocols* (Vol. 1420, pp. 143-155). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_12

Ballard, D., Winkler-Galicki, J., & Wesoły, J. (2020). Massive parallel sequencing in forensics: Advantages, issues, technicalities, and prospects. *International Journal of Legal Medicine*, *134*(4), 1291-1303. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02294-0>

Bandelt, H.-J., Salas, A., & Bravi, C. M. (2006). What is a ‘novel’ mtDNA mutation – and does ‘novelty’ really matter? *Journal of Human Genetics*, *51*(12), 1073-1082. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0066-5>

Bandelt, H.-J., Salas, A., & Lutz-Bonengel, S. (2004). Artificial recombination in forensic mtDNA population databases. *International Journal of Legal Medicine*, *118*(5), 267-273. <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0455-2>

Bär, W., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Holland, M., Lincoln, P. J., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P. M., Tully, G., & Wilson, M. (2000). Guidelines for Mitochondrial DNA Typing. *Vox Sanguinis*, *79*(2), 121-125. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.2000.7920121.x>

Benavides, F. J., & Guénet, J.-L. (2003a). Glosario y Nomenclatura. En *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (pp. 307-308). Universidad de Alcalá de Henares-SECAL. <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/Anexo-II-GENETICA-Pba2.pdf.pdf>

Benavides, F. J., & Guénet, J.-L. (2003b). Las mutaciones. En *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios básicos y aplicaciones* (pp. 201-227). Universidad de Alcalá de Henares-SECAL. <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/07-GENETICA-Pba-2.pdf.pdf>

Benn Torres, J., Vilar, M. G., Torres, G. A., Gaieski, J. B., Bharath Hernandez, R., Browne, Z. E., Stevenson, M., Walters, W., Schurr, T. G., & The Genographic Consortium. (2015). Genetic Diversity in the Lesser Antilles and Its Implications for the Settlement of the Caribbean Basin. *PLOS ONE*, *10*(10), e0139192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139192>

- Berger, C., Hatzer-Grubwieser, P., Hohoff, C., & Parson, W. (2011). Evaluating sequence-derived mtDNA length heteroplasmy by amplicon size analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 5(2), 142-145. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.002>
- Bodner, M., Perego, U. A., Gomez, J. E., Cerda-Flores, R. M., Rambaldi Migliore, N., Woodward, S. R., Parson, W., & Achilli, A. (2021). The Mitochondrial DNA Landscape of Modern Mexico. *Genes*, 12(9), 1453. <https://doi.org/10.3390/genes12091453>
- Bonilla, A. M., & González, D. A. (2015). *Análisis de la fragmentación del ADN en personal de laboratorio de docencia e investigación expuesto a mutágenos químicos en la ciudad de Quito* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9410/1/UPS-QT07131.pdf>
- Brownlee, G. G., & Sanger, F. (1967). Nucleotide sequences from the low molecular weight ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 23(3), 337-IN9. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(67\)80109-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(67)80109-8)
- Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., & Chakraborty, R. (2003). Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates and Foundations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4(1), 119-141. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.4.070802.110352>
- Budowle, B., DiZinno, J., & Wilson, M. R. (2000). *Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Sequencing*. <https://www.promega.ro/~media/files/resources/conference%20proceedings/ishi%2010/ora%20presentations/37budowle.pdf>
- Burks, A. W., Bacharier, L. B., Holgate, S. T., Hershey, G. K. K., O'Hehir, R. E., Broide, D. H., & Stokes Peebles, R. (Eds.). (2020). *Middleton's allergy: Principles and practice*. Elsevier.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR markers* (2nd ed). Elsevier Academic Press.
- Butler, J. M. (2012). Mitochondrial DNA Analysis. En *Advanced topics in forensic DNA typing: Methodology* (1.^a ed.). Elsevier/Academic Press.
- Cai, X., Wang, X., Li, S., Qian, J., Qian, D., Chen, F., Yang, Y., Yuan, Z., Xu, J., Bai, Y., Yu, S., & Jin, L. (2009). Association of Mitochondrial DNA Haplogroups with Exceptional Longevity in a Chinese Population. *PLoS ONE*, 4(7), e6423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006423>
- Calloway, C. D., Reynolds, R. L., Herrin, G. L., & Anderson, W. W. (2000). The Frequency of Heteroplasmy in the HVII Region of mtDNA Differs across Tissue Types and Increases with Age. *The American Journal of Human Genetics*, 66(4), 1384-1397. <https://doi.org/10.1086/302844>

- Campo, O., Rojas, W., Bravi, C., Duque, C. E., Ibarra, A. A., Bedoya, G., & Ruiz, A. (2010). *Diversidad genética de la región control del ADN mitocondrial humano en poblaciones colombianas*. 23(4-S). <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/issue/view/852>
- Cardoş, G., Rodewald, A., & Soficaru, A. D. (2008). *Ancient DNA study on human fossil found Costişa, Romania, dating from de Bronze Age*. 52, 55-67.
- Carracedo, A. (2015). Forensic Genetics: History. En M. M. Houck (Ed.), *Forensic Biology* (pp. 19-22). Academic Press.
- Carracedo, A., Bär, W., Lincoln, P., Mayr, W., Morling, N., Olaisen, B., Schneider, P., Budowle, B., Brinkmann, B., Gill, P., Holland, M., Tully, G., & Wilson, M. (2000). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International*, 110(2), 79-85. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00161-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00161-4)
- Carroll, D. (2013). Genetic Recombination. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (pp. 277-280). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00627-6>
- Castaño, L., Bilbao, J. R., & Urrutia, I. (1996). *Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (2): Purificación de ácidos nucleicos*. 45(5), 542-546.
- Checa, M. A. (2007). *Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones*. 20(3), 213-221.
- Chinnery, P. F., & Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *British Medical Bulletin*, 106(1), 135-159. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldt017>
- Chung, U., Lee, H. Y., Yoo, J.-E., Park, M. J., & Shin, K.-J. (2005). Mitochondrial DNA CA dinucleotide repeats in Koreans: The presence of length heteroplasmy. *International Journal of Legal Medicine*, 119(1), 50-53. <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0487-7>
- Clark, A. G. (2002). Population Genetics. En S. Brenner, J. H. Miller, & W. Broughton (Eds.), *Encyclopedia of genetics*. Academic Press.
- Claros, G., Saladrigas, V., & González, D. (2004). *Vocabulario Inglés Español de Bioquímica y Biología Molecular*. 23(1), 42-54.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657-1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Coble, M. D., Just, R. S., O'Callaghan, J. E., Letmanyi, I. H., Peterson, C. T., Irwin, J. A., & Parsons, T. J. (2004). Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *International Journal of Legal Medicine*, 118(3), 137-146. <https://doi.org/10.1007/s00414-004-0427-6>

Coble, M. D., Vallone, P. M., Just, R. S., Diegoli, T. M., Smith, B. C., & Parsons, T. J. (2006). Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *International Journal of Legal Medicine*, 120(1), 27-32. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0044-z>

Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., & Rocha, M. G. (Eds.). (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1°). INECC-SEMARNAT. [https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

Corvalán, A. (2002). *Biología molecular en Infectología Parte I: Desarrollo y metodologías*. 19(1), 14-24.

Crespo, J. (2010). *Introducción a la genética clínica*. 33(Espec Congr 1), 1-9.

Cuenca, D., Battaglia, J., Halsing, M., & Sheehan, S. (2020). Mitochondrial Sequencing of Missing Persons DNA Casework by Implementing Thermo Fisher's Precision ID mtDNA Whole Genome Assay. *Genes*, 11(11), 1303. <https://doi.org/10.3390/genes11111303>

Dames, S., Eilbeck, K., & Mao, R. (2015). A High-Throughput Next-Generation Sequencing Assay for the Mitochondrial Genome. En V. Weissig & M. Edeas (Eds.), *Mitochondrial Medicine* (Vol. 1264, pp. 77-88). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2257-4_8

Deng, Y.-J., Li, Y.-Z., Yu, X.-G., Li, L., Wu, D.-Y., Zhou, J., Man, T.-Y., Yang, G., Yan, J.-W., Cai, D.-Q., Wang, J., Yang, H.-M., Li, S.-B., & Yu, J. (2005). Preliminary DNA Identification for the Tsunami Victims in Thailand. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 3(3), 143-157. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(05\)03020-2](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(05)03020-2)

Department of Justice. (2019). *Uniform language for testimony and reports for forensic mitochondrial DNA examinations*. <https://www.justice.gov/olp/page/file/1095966/download>

Der Sarkissian, C., Brotherton, P., Balanovsky, O., Templeton, J. E. L., Llamas, B., Soubrier, J., Moiseyev, V., Khartanovich, V., Cooper, A., Haak, W., & The Genographic Consortium. (2014). Mitochondrial Genome Sequencing in Mesolithic North East Europe Unearths a New Sub-Clade within the Broadly Distributed Human Haplogroup C1. *PLoS ONE*, 9(2), e87612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087612>

Duarte, J. L. (2018). *Diferenciación genética y demografía histórica de la salamandra microendémica Pseudoeurycea robertsi Taylor, 1939 (Caudata: Plethodontidae) usando DNA mitocondrial* [Universidad Autónoma del Estado de México]. https://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/105774/Tesis_LuisDuarteJ.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ebenesersdóttir, S. S., Sigurðsson, Á., Sánchez-Quinto, F., Lalueza-Fox, C., Stefánsson, K., & Helgason, A. (2011). A new subclade of mtDNA haplogroup C1 found in icelanders: Evidence of pre-columbian contact? *American Journal of Physical Anthropology*, 144(1), 92-99. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21419>

Eguiarte, L. E., Aguirre, J. A., Jardón, L., Aguirre, E., & Souza, V. (2013). *Genómica de poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución*. 16(1), 42-56.

Elson, J. L., Turnbull, D. M., & Howell, N. (2004). Comparative Genomics and the Evolution of Human Mitochondrial DNA: Assessing the Effects of Selection. *The American Journal of Human Genetics*, 74(2), 229-238. <https://doi.org/10.1086/381505>

EMPOP. (2019). *EMPOP: updates*. <https://empop.online/updates>

Equipo Argentino de Antropología Forense. (2016). *Dictamen sobre el Basurero de Cocula*. <https://centroprodh.org.mx/wp-content/uploads/2017/12/Dictamen-Basurero-Cocula-pdf.pdf>

Erber, W. (2010). *Diagnostic techniques in hematological malignancies* (1a ed.). Cambridge University Press.

Farag, M. R., Bohi, K. M. E., Khalil, S. R., Alagawany, M., Arain, M. A., Sharun, K., Tiwari, R., & Dhama, K. (2020). Forensic Applications of Mitochondrial Cytochrome B Gene in the Identification of Domestic and Wild Animal Species. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 8(1), 1-8. [https://doi.org/10.18006/2020.8\(1\).1.8](https://doi.org/10.18006/2020.8(1).1.8)

Fierro, F. (2014). Electroforesis de ADN. En *Herramientas moleculares aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1º, pp. 27-51). INECC-SEMARNAT. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/electroforesis.pdf>

França, L. T. C., Carrilho, E., & Kist, T. B. L. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(2), 169-200. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003797>

Fridman, C., Gonzalez, R. S., Pereira, A. C., & Cardena, M. M. S. G. (2014). Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region in a population of southeastern Brazil. *International Journal of Legal Medicine*, 128(4), 589-593. <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1023-z>

Gariyban, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>

Ghosh, S., & Sinha, J. K. (2017). Intron. En J. Vonk & T. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1-5). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_70-1

Gilbert, M. T. P., Kivisild, T., Grønnow, B., Andersen, P. K., Metspalu, E., Reidla, M., Tamm, E., Axelsson, E., Götherström, A., Campos, P. F., Rasmussen, M., Metspalu, M., Higham, T. F. G., Schwenninger, J.-L., Nathan, R., De Hoog, C.-J., Koch, A., Møller, L. N., Andreasen, C., ... Willerslev, E. (2008). Paleo-Eskimo mtDNA Genome Reveals Matrilineal Discontinuity in Greenland. *Science*, 320(5884), 1787-1789. <https://doi.org/10.1126/science.1159750>

Gill, P., Brenner, C. H., Buckleton, J. S., Carracedo, A., Krawczak, M., Mayr, W. R., Morling, N., Prinz, M., Schneider, P. M., & Weir, B. S. (2006). DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International*, 160(2-3), 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.04.009>

GIZ. (2021, agosto 26). La Crisis Forense en México. Más de 52.000 personas fallecidas sin identificar. *Identificación Humana*. <https://www.identificacionhumana.mx/la-crisis-forense-en-mexico-mas-de-52-000-personas-fallecidas-sin-identificar/>

González Olivier, A., Garfias Morales, E., Romero García, E., de la Cruz Laina, M. I., Acuña Alonzo, A. P., Pérez Martínez, M., Sánchez Solís, F., Corona Comunidad, B. C., Glenn Smith, D., & Torre Blanco, A. (2013). *Análisis del DNA mitocondrial antiguo y contemporáneo: Un acercamiento a las relaciones genéticas en las poblaciones indígenas de Mesoamérica*. 20(58), 153-171.

González-Oliver, A., Garfias-Morales, E., Glenn, D., & Quinto-Sánchez, M. (2017). Mitochondrial DNA Analysis of Mazahua and Otomi Indigenous Populations from Estado de México Suggests a Distant Common Ancestry. *Human Biology*, 89(3), 195. <https://doi.org/10.13110/humanbiology.89.3.03>

González-Sobrino, B. Z., Pintado-Cortina, A. P., Sebastián-Medina, L., Morales-Mandujano, F., Contreras, A. V., Aguilar, Y. E., Chávez-Benavides, J., Carrillo-Rodríguez, A., Silva-Zolezzi, I., & Medrano-González, L. (2016). Genetic Diversity and Differentiation in Urban and Indigenous Populations of Mexico: Patterns of Mitochondrial DNA and Y-Chromosome Lineages. *Biodemography and Social Biology*, 62(1), 53-72. <https://doi.org/10.1080/19485565.2015.1117938>

Goodwin, C., Higgins, D., Tobe, S. S., Austin, J., Wotherspoon, A., Gahan, M. E., & McNevin, D. (2018). Singleplex quantitative real-time PCR for the assessment of human mitochondrial DNA quantity and quality. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 14(1), 70-75. <https://doi.org/10.1007/s12024-017-9944-8>

Goodwin, W., Linacre, A., & Hadi, S. (2011). *An Introduction to Forensic Genetics* (2nd ed). Wiley-Blackwell.

Guardado-Estrada, M., Juarez-Torres, E., Medina-Martinez, I., Wegier, A., Macías, A., Gomez, G., Cruz-Talonia, F., Roman-Bassaure, E., Piñero, D., Kofman-Alfaro, S., & Berumen, J. (2009). A great diversity of Amerindian mitochondrial DNA ancestry is present in the Mexican mestizo population. 54, 12, 695-705. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.98>

Guinaldo, M. S. (2016). *Genética de los flujos poblacionales en el territorio que conformaba el reino de Granada* [Universidad de Granada]. <https://hera.ugr.es/tesisugr/26127970.pdf>

Guo, Z., Yang, H., Wang, C., & Liu, S. (2012). Mitochondrial DNA haplogroup M is associated with late onset of hepatocellular carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 3(3), 499-502. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.434>

Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18

Hall, T. (2004). *BioEdit version 7.0.0*.

Haplogrep. (s. f.). *Haplogrep | mtDNA haplogroup classification*. Recuperado 22 de noviembre de 2021, de <https://haplogrep.i-med.ac.at/>

Haplogroup. (2013). *B2t* – *Haplogroup*. <https://haplogroup.org/mtdna/rsrs/1123456/123456/12346/1346/134/13/n/r/b45/b4/b4bdej/b4b/b2/b2t/>

Haplotype. (2021). *Ancient DNA map*. https://haplotype.info/maps/ancient_dna/slideshow_samples.php?searchcolumn=MeanYBP&searchfor=4575&ybp=500000,0

Hardison, R. C. (2008a). Mutation and repair of DNA. En *Working with Molecular Genetics*. Self-published. <https://www.bx.psu.edu/~ross/workmg/WorkingWithMolecularGeneticsRCHwCover.pdf>

Hardison, R. C. (2008b). Transposition of DNA. En *Working with Molecular Genetics*. Self-published. <https://www.bx.psu.edu/~ross/workmg/WorkingWithMolecularGeneticsRCHwCover.pdf>

Hares, D. R. (2015). Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Science International: Genetics*, 17, 33-34. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.006>

Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The History of Sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>

Hernández, A. W., & Trejo, F. D. M. (2014). Estudio Genético Poblacional de Frecuencias Alélicas para 15 marcadores STR presentes en la Población del Estado de Zacatecas Aplicado a la Práctica Forense. *Archivos de Medicina*, 10(1), 1-24.

Hernández, C. L., Dugoujon, J. M., Novelletto, A., Rodríguez, J. N., Cuesta, P., & Calderón, R. (2017). The distribution of mitochondrial DNA haplogroup H in southern Iberia indicates ancient human genetic exchanges along the western edge of the Mediterranean. *18*, 1(46). <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0514-6>

Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., & Zamir, A. (1965). Structure of a Ribonucleic Acid. *Science*, *147*(3664), 1462-1465. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1462>

Holt, C. L., Stephens, K. M., Walichiewicz, P., Fleming, K. D., Forouzmand, E., & Wu, S.-F. (2021). Human Mitochondrial Control Region and mtGenome: Design and Forensic Validation of NGS Multiplexes, Sequencing and Analytical Software. *Genes*, *12*(4), 599. <https://doi.org/10.3390/genes12040599>

Hong, S. B., Kim, K. C., & Kim, W. (2015). Population and forensic genetic analyses of mitochondrial DNA control region variation from six major provinces in the Korean population. *Forensic Science International: Genetics*, *17*, 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.03.017>

Hu, Z., Wang, Z., Zhang, S., Bian, Y., & Li, C. (2015). Species identification through pyrosequencing 12S rRNA gene. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, *5*, e561-e563. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2015.09.222>

Huang, T. (2011). Next Generation Sequencing to Characterize Mitochondrial Genomic DNA Heteroplasmy. En J. L. Haines, B. R. Korf, C. C. Morton, C. E. Seidman, J. G. Seidman, & D. R. Smith (Eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (p. hg1908s71). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1908s71>

Hutchison, C. A. (2007). DNA sequencing: Bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, *35*(18), 6227-6237. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm688>

Ingman, M. (2003). *Mitochondria and Human Evolution* [Uppsala]. <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:163329/FULLTEXT01.pdf>

International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome. *Nature*, *431*(7011), 931-945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>

Irwin, J. A., Parson, W., Coble, M. D., & Just, R. S. (2011). MtGenome reference population databases and the future of forensic mtDNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*, *5*(3), 222-225. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.008>

Irwin, J. A., Saunier, J. L., Niederstätter, H., Strouss, K. M., Sturk, K. A., Diegoli, T. M., Brandstätter, A., Parson, W., & Parsons, T. J. (2009). Investigation of Heteroplasmy in the Human Mitochondrial DNA Control Region: A Synthesis of Observations from More Than 5000 Global Population Samples. *Journal of Molecular Evolution*, *68*(5), 516-527. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9227-4>

ISFG. (1992). Recommendations of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. *Forensic Science International*, *55*(1), 1-3. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90088-E](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90088-E)

- Izagirre, N., Alzualde, A., Alonso, S., Paz, L., Alonso, A., & de la Rúa, C. (2005). Rare haplotypes in mtDna: Applications in the analysis of biosocial aspects of past human populations. *4*, 4, 43-56. <https://doi.org/10.1353/hub.2005.0064>
- Jobling, M. A., & Gill, P. (2004). Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis. *Nature Reviews Genetics*, *5*(10), 739-751. <https://doi.org/10.1038/nrg1455>
- Johnson, D. C., Shrestha, S., Wiener, H. W., Makowsky, R., Kurundkar, A., Wilson, C. M., & Aissani, B. (2015). Mitochondrial DNA diversity in the African American population. *Mitochondrial DNA*, *26*(3), 445-451. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.840591>
- Johnston, M. O. (2006). Mutations and New Variation: Overview. En John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *ELS* (1.^a ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0004165>
- Just, R. S., Irwin, J. A., & Parson, W. (2015). Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Science International: Genetics*, *18*, 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.003>
- Just, R. S., Scheible, M. K., Fast, S. A., Sturk-Andreaggi, K., Röck, A. W., Bush, J. M., Higginbotham, J. L., Peck, M. A., Ring, J. D., Huber, G. E., Xavier, C., Strobl, C., Lyons, E. A., Diegoli, T. M., Bodner, M., Fendt, L., Kralj, P., Nagl, S., Niederwieser, D., ... Irwin, J. A. (2015). Full mtGenome reference data: Development and characterization of 588 forensic-quality haplotypes representing three U.S. populations. *Forensic Science International: Genetics*, *14*, 141-155. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.021>
- Karger, B. L., & Guttman, A. (2009). DNA sequencing by CE. *ELECTROPHORESIS*, *30*(S1), S196-S202. <https://doi.org/10.1002/elps.200900218>
- Kivisild, T. (2015). Maternal ancestry and population history from whole mitochondrial genomes. *Investigative Genetics*, *6*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13323-015-0022-2>
- Laird, J., & Blackmore, V. (2009). *Forensic DNA Analysis: Strengths and Limitations*. Wyndham Forensic Group INC. https://wyndhamforensic.ca/wp-content/uploads/2016/01/WyndhamForensic_Presentation_DNAAnalysis.pdf
- Lander, N., Rojas, M. G., Chiurillo, M. A., & Ramírez, J. L. (2008). Haplotype diversity in human mitochondrial DNA hypervariable regions I–III in the city of Caracas (Venezuela). *Forensic Science International: Genetics*, *2*(4), e61-e64. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.12.009>
- Lee, J. C.-I., Tsai, L.-C., Yu, Y.-J., Lin, C.-Y., Linacre, A., & Hsieh, H.-M. (2016). Investigation into length heteroplasmy in the mitochondrial DNA control region after treatment with bisulfite. *Journal of the Formosan Medical Association*, *115*(4), 284-287. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.11.005>

León, C. (2020). *Análisis de DNA mitocondrial en la población mestiza de la Ciudad de México*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Liou, C.-W., Chen, J.-B., Tiao, M.-M., Weng, S.-W., Huang, T.-L., Chuang, J.-H., Chen, S.-D., Chuang, Y.-C., Lee, W.-C., Lin, T.-K., & Wang, P.-W. (2012). Mitochondrial DNA Coding and Control Region Variants as Genetic Risk Factors for Type 2 Diabetes. *Diabetes*, *61*(10), 2642-2651. <https://doi.org/10.2337/db11-1369>

López, M., López, A. U., Sainz, T. D. R., & Rosales, A. M. (2005). *¿Qué sabe usted acerca de... Genómica?* *36*(1), 42-44.

Lyons, E. A., Scheible, M. K., Sturk-Andreaggi, K., Irwin, J. A., & Just, R. S. (2013). A high-throughput Sanger strategy for human mitochondrial genome sequencing. *BMC Genomics*, *14*(1), 881. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-881>

Márquez, L. M., Serrato, A., & Cerritos, R. (2014). Secuenciación de Fragmentos de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. G. Rocha, *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos* (1a ed., p. 275). INECC-SEMARNAT. https://www.researchgate.net/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis

Martínez, M. L. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, *36*(5), 273-277. <https://doi.org/10.1016/j.semerng.2009.12.014>

Martínez-Cortés, G., Salazar-Flores, J., Haro-Guerrero, J., Rubi-Castellanos, R., Velarde-Félix, J. S., Muñoz-Valle, J. F., López-Casamichana, M., Carrillo-Tapia, E., Canseco-Avila, L. M., Bravi, C. M., López-Armenta, M., & Rangel-Villalobos, H. (2013). Maternal admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on mtDNA haplogroups: Maternal admixture and structure in Mexican-Mestizos. *American Journal of Physical Anthropology*, *151*(4), 526-537. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22293>

Marwal, A., & Gaur, R. K. (2020). Molecular markers: Tool for genetic analysis. En *Animal Biotechnology* (pp. 353-372). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00016-1>

Melton, T., & Holland, C. (2007). Routine Forensic Use of the Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Gene for Species Identification. *Journal of Forensic Sciences*, *0*(0), 070917231752003-??? <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00553.x>

Mishra, A. (2018). Mitochondrial DNA. En J. Vonk & T. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1-4). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_162-1

Mita, Y., Fukagawa, T., Watahiki, H., Kitayama, T., Fujii, K., Mizuno, N., & Sekiguchi, K. (2020). Developmental validation for Sanger sequencing of HV1 and HV2 in mitochondrial

DNA. *Forensic Science International: Reports*, 2, 100159. <https://doi.org/10.1016/j.fsir.2020.100159>

Mitchell, S. L., Goodloe, R., Brown-Gentry, K., Pendergrass, S. A., Murdock, D. G., & Crawford, D. C. (2014). Characterization of Mitochondrial Haplogroups in a Large Population-based Sample from the United States. *Human Genetics*, 133(7), 861-868. <https://doi.org/10.1007/s00439-014-1421-9>

Mizuno, F., Gojobori, J., Wang, L., Onishi, K., Sugiyama, S., Granados, J., Gomez-Trejo, C., Acuña-Alonzo, V., & Ueda, S. (2014). Complete mitogenome analysis of indigenous populations in Mexico: Its relevance for the origin of Mesoamericans. *Journal of Human Genetics*, 59(7), 359-367. <https://doi.org/10.1038/jhg.2014.35>

Montalvo, C. A., & Lugo, M. A. (2016). *Electroforésis: Fundamentos, avances y aplicaciones*. <https://epistemus.unison.mx/index.php/epistemus/article/download/96/70/149#:~:text=La%20electrofor%C3%A9sis%20es%20una%20t%C3%A9cnica,de%20la%20biomol%C3%A9cula%20a%20analizar>.

Morling, N. (2009). PCR in forensic genetics. *Biochemical Society Transactions*, 37(2), 438-440. <https://doi.org/10.1042/BST0370438>

Naga, K., Meganathan, P. R., Dubey, B., & Haque, I. (2013). Mitochondrial 16S ribosomal RNA gene for forensic identification of crocodile species. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(4), 334-338. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2012.09.018>

National Institute of Justice. (2015, noviembre 17). *Forensic DNA Research and Development*. National Institute of Justice. <https://nij.ojp.gov/topics/articles/forensic-dna-research-and-development>

National Institute of Standards and Technology. (2015). *Core STR Loci Used in Human Identity Testing*. <https://strbase.nist.gov/coreSTRs.htm>

Neparáczi, E., Kocsy, K., Tóth, G. E., Maróti, Z., Kalmár, T., Bihari, P., Nagy, I., Pálfi, G., Molnár, E., Raskó, I., & Török, T. (2017). Revising mtDNA haplotypes of the ancient Hungarian conquerors with next generation sequencing. *PLOS ONE*, 12(4), e0174886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174886>

NHGRI. (1999). *Human Genetic Variation* (3ra edición). BSCS and Videodiscovery, Inc.

Noguera-Santamaría, M. C., Anderson, C. E., Uriceochea, D., Durán, C., Briceño-Balcázar, I., & Bernal-Villegas, J. (2015). Mitochondrial DNA analysis suggests a Chibchan migration into Colombia. *Universitas Scientiarum*, 20(2), 261. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-2.mdas>

Norrsgård, K. (2008). Forensics, DNA Fingerprinting, and CODIS | Learn Science at Scitable. *Nature Education*, 1(35). <https://www.nature.com/scitable/topicpage/forensics-dna-fingerprinting-and-codis-736/>

Núñez Domingo, C. (2011). *Análisis de ADN mitocondrial y de polimorfismos genéticos de los cromosomas autosómicos y sexuales en la población mestiza de Nicaragua* [Universidad de Zaragoza]. <https://zguan.unizar.es/record/7014/files/TESIS-2012-014.pdf>

Oliveira, M. T., Pontes, C. de B., & Ciesielski, G. L. (2020). Roles of the mitochondrial replisome in mitochondrial DNA deletion formation. *Genetics and Molecular Biology*, 43(1 suppl 1), e20190069. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2019-0069>

O.M. Al-Dahmoshi, H., & J. Al-Nayili, H. (2021). Mitochondrial 16S rRNA Gene-Dependent Blood Typing as a Forensic Tool. En I. Freckelton (Ed.), *Forensic Analysis—Scientific and Medical Techniques and Evidence under the Microscope*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98248>

Osatinsky, R. (2007). *¿Qué es la electroforesis capilar?* 71(2), 60-66.

Palencia-Madrid, L., Cardoso, S., Keyser, C., López-Quintana, J. C., Guenaga-Lizasu, A., & de Pancorbo, M. M. (2017). Ancient mitochondrial lineages support the prehistoric maternal root of Basques in Northern Iberian Peninsula. *European Journal of Human Genetics*, 25(5), 631-636. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.24>

Parakatselaki, M.-E., & Ladoukakis, E. D. (2021). mtDNA Heteroplasmy: Origin, Detection, Significance, and Evolutionary Consequences. *Life*, 11(7), 633. <https://doi.org/10.3390/life11070633>

Parson, W., & Dür, A. (2007). EMPOP—A forensic mtDNA database. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 88-92. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.018>

Parson, W., Gusmão, L., Hares, D. R., Irwin, J. A., Mayr, W. R., Morling, N., Pokorak, E., Prinz, M., Salas, A., Schneider, P. M., & Parsons, T. J. (2014). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and Extended Guidelines for Mitochondrial DNA Typing. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.07.010>

Parsons, T. J., Muniec, D. S., Sullivan, K., Woodyatt, N., Alliston-Greiner, R., Wilson, M. R., Berry, D. L., Holland, K. A., Weedn, V. W., Gill, P., & Holland, M. M. (1997). A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nature Genetics*, 15(4), 363-368. <https://doi.org/10.1038/ng0497-363>

Pauro, M., García, A., Bravi, C. M., & Demarchi, D. A. (2010). Distribución de haplogrupos mitocondriales aloctonos en poblaciones rurales de Córdoba y San Luis. 1, 12, 47-55.

Peñaloza, R. I., Arenas, D., Cerda, R. M., Buentello, L., González, G., Torres, J., Álvarez, B., Mendoza, I., Flores, M., Sandoval, L., Loeza, F., Ramos, I., Muñoz, L., & Salamanca, F. (2014). *Characterization of mtDNA Haplogroups in 14 Mexican Indigenous Populations*. 79(3), 313-320.

Perego, U. A., Angerhofer, N., Pala, M., Olivieri, A., Lancioni, H., Kashani, B. H., Carossa, V., Ekins, J. E., Gómez-Carballa, A., Huber, G., Zimmermann, B., Corach, D., Babudri, N., Panara, F., Myres, N. M., Parson, W., Semino, O., Salas, A., Woodward, S. R., ... Torroni, A. (2010). The initial peopling of the Americas: A growing number of founding mitochondrial genomes from Beringia. *Genome Research*, 20(9), 1174-1179. <https://doi.org/10.1101/gr.109231.110>

Pereira, F., Carneiro, J., & van Asch, B. (2010). *A Guide for Mitochondrial DNA Analysis in Non-Human Forensic Investigations*. 3, 33-44.

PGR, & Institut für Gerichtliche Medizin der Medizinischen Universität Innsbruck. (2016). *Dictamen en la especialidad de Traducción*. <https://www.cndh.org.mx/sites/default/files/doc/CasoIguala/REC15VG/APARTADO19/EVIDENCIA201.PDF>

Piccinini, A., Coco, S., Parson, W., Cattaneo, C., Gaudio, D., Barbazza, R., & Galassi, A. (2010). World War One Italian and Austrian soldier identification project: DNA results of the first case. *Forensic Science International: Genetics*, 4(5), 329-333. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.10.005>

Porta, A. R., & Enners, E. (2012). Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction. *The American Biology Teacher*, 74(4), 256-260. <https://doi.org/10.1525/abt.2012.74.4.9>

Princeton Separations. (s. f.). *Centri-sep columns: Protocol*.

Princeton Separations. (Inglés). *Centri-sepTM Centri-spinTM*.

QIAGEN. (2016). *QIAmp[®] DNA Mini and Blood Mini Handbook*.

Quintero Ferrer, J. M., Pardo Govea, T. C., & Borjas Fuentes, L. B. (2019). Frecuencia de heteroplasma en las regiones hipervariables HVI y HVII del ADN Mitocondrial en una muestra de la población de Maracaibo, Venezuela. *Revista de Ciencias Forenses de Honduras*, 5(2), 14-24. <https://doi.org/10.5377/rcfh.v5i2.8885>

Rajesh Kumar Sharma, M. N., & Choudhary, M. (2017). An Overview on Molecular Basis of Genetic Recombination. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 1154-1167. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.142>

Rakha, A., Peng, M.-S., Bi, R., Song, J.-J., Salahudin, Z., Adan, A., Israr, M., & Yao, Y.-G. (2016). EMPOP-quality mtDNA control region sequences from Kashmiri of Azad Jammu &

Kashmir, Pakistan. *Forensic Science International: Genetics*, 25, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.08.009>

Ramos, A., Santos, C., Mateiu, L., Gonzalez, M. del M., Alvarez, L., Azevedo, L., Amorim, A., & Aluja, M. P. (2013). Frequency and Pattern of Heteroplasmy in the Complete Human Mitochondrial Genome. *PLoS ONE*, 8(10), e74636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074636>

Ranjan, S., & Gautam, A. (2018). Gene Frequency. En J. Vonk & T. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1-3). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_31-1

República del Perú. (2009). *Resolución de la Fiscalía de la Nación*. <https://www.mpf.n.gob.pe/Docs/iml/files/guia21.pdf>

Ritu, & Mohapatra, B. (2018). Genetic Variation. En J. Vonk & T. Shackelford (Eds.), *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior* (pp. 1-6). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_20-1

Robin, E. D., & Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, 136(3), 507-513. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041360316>

Röck, A. W., Dür, A., van Oven, M., & Parson, W. (2013). Concept for estimating mitochondrial DNA haplogroups using a maximum likelihood approach (EMMA). *Forensic Science International: Genetics*, 7(6), 601-609. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.07.005>

Rodríguez, L., & Raventós, H. (2009). *Identificación de genes causales y de susceptibilidad para enfermedades de herencia Mendeliana y compleja*. 51(1), 10-15.

Røyrvik, E. C., Burgstaller, J. P., & Johnston, I. G. (2016). MtDNA Diversity in Human Populations Highlights the Merit of Haplotype Matching in Gene Therapies. *Molecular Human Reproduction*, 22(11), 809-817. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw062>

Ruiz-Pesini, E., Lott, M. T., Procaccio, V., Poole, J. C., Brandon, M. C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., & Wallace, D. C. (2007). An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research*, 35(Database), D823-D828. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl927>

Saitoh, T. (2021). High variation of mitochondrial DNA diversity as compared to nuclear microsatellites in mammalian populations. *Ecological Research*, 36(2), 206-220. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12190>

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sánchez, E., & Rangel, C. E. G. (2019). Forced disappearance and forensic anthropology in Mexico. En S. Dutrénit (Ed.), *Forensic anthropology teams in Latin America* (1.^a ed., p. 210). Routledge.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687-695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>
- Sanger, F., Brownlee, G. G., & Barrell, B. G. (1965). A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 13(2), 373-IN4. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80104-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80104-8)
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441-448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sans, M., Figueiro, G., Hughes, C. E., Lindo, J., Hidalgo, P. C., & Malhi, R. S. (2015). A South American Prehistoric Mitogenome: Context, Continuity, and the Origin of Haplogroup C1d. *PLOS ONE*, 10(10), e0141808. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141808>
- Santos, C., Montiel, R., Arruda, A., Alvarez, L., Aluja, M., & Lima, M. (2008). Mutation patterns of mtDNA: Empirical inferences for the coding region. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 167. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-167>
- Schleif, R. F. (1993). *Genetics and molecular biology* (2nd ed). Johns Hopkins University Press.
- Schneider, P. M. (2007). Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International*, 165(2-3), 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.06.067>
- Schneider, P. M. (2009). *Expansion of the European Standard Set of DNA Database Loci—The Current Situation*. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/profiles-in-dna/1201/expansion-of-the-european-standard-set.pdf?la=en>
- Secretaría de Gobernación. (s. f.). *Búsqueda e Identificación de Personas Desaparecidas (cierre al 30 de septiembre del 2020)*. Secretaría de Gobernación. Recuperado 2 de febrero de 2021, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/586166/B_squeda_e_Identificaci_n_7_de_Octubre_2020.pdf
- SEGOB. (2021, diciembre 4). *Contexto general—Dashboard CNB*. RNPDNO, contexto general. <https://versionpublicarnpdno.segob.gob.mx/Dashboard/ContextoGeneral>
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (1.^a ed., p. 274). INECC-SEMARNAT.

[https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](https://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)

Sigurðardóttir, S., Helgason, A., Gulcher, J. R., Stefansson, K., & Donnelly, P. (2000). The Mutation Rate in the Human mtDNA Control Region. *The American Journal of Human Genetics*, 66(5), 1599-1609. <https://doi.org/10.1086/302902>

Simion, T. (2018). DNA Replication. *Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences*, 16(4). <https://doi.org/10.19080/CTBEB.2018.16.555942>

Singh, L., Kashyap, S., Saini, N., Pushker, N., Sen, S., Tapas, C. N., Sharma, A., Bakhshi, S., Chawla, B., & Kaur, J. (2014). *Analysis of Mitochondrial DNA Mutations and Altered Protein Expression in Human Retinoblastoma*. 55(13), 3077.

Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H., & Hood, L. E. (1986). *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. 321(6071), 674-679. <https://doi.org/10.1038/321674a0>

Snow, M. H., Durand, K. R., & Smith, D. G. (2010). Ancestral Puebloan mtDNA in context of the greater southwest. *Journal of Archaeological Science*, 37(7), 1635-1645. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.01.024>

Starikovskaya, Y. B., Sukernik, R. I., Schurr, T. G., Kogelnik, A. M., & Wallace, D. C. (1998). mtDNA Diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implications for the Genetic History of Ancient Beringia and the Peopling of the New World. *The American Journal of Human Genetics*, 63(5), 1473-1491. <https://doi.org/10.1086/302087>

Stewart, J. B., & Chinnery, P. F. (2021). Extreme heterogeneity of human mitochondrial DNA from organelles to populations. *Nature Reviews Genetics*, 22(2), 106-118. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00284-x>

Stoneking, M., Hedgecock, D., Higuchi, R. G., Vigilant, L., & Erlich, H. A. (1991). *Population Variation of Human mtDNA Control Region Sequences Detected by Enzymatic Amplification and Sequence-specific Oligonucleotide Probes*. 48, 370-382.

Suárez, C., Garrido, N., & Guevara, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. *ICIDCA*, 50(1), 8.

Sullivan, K. M., Hopgood, R., & Gill, P. (1992). Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *International Journal Of Legal Medicine*, 105(2), 83-86. <https://doi.org/10.1007/BF02340829>

Sultana, G. N. N., & Sultan, M. Z. (2018). Mitochondrial DNA and Methods for Forensic Identification. *Journal of Forensic Sciences and Criminal Investigation*, 9(1), 1-5. <https://doi.org/10.19080/JFSCI.2018.09.555755>

Sundquist, T., & Bessetti, J. (2005, septiembre). Identifying and Preventing DN Contamination in a DNA-Typing Laboratory. *Profiles in DNA*, 3.

SWGDM. (2003). Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation. *Forensic Science Communications*, 5(2). <https://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/april2003/swgdammitodna.htm>

SWGDM. (2019). *Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Analysis by Forensic DNA Testing Laboratories*. https://1ecb9588-ea6f-4feb-971a-73265dbf079c.filesusr.com/ugd/4344b0_f61de6abf3b94c52b28139bff600ae98.pdf

Sylvester, C., Krishna, M. S., Rao, J. S., & Chandrasekar, A. (2018). Allele frequencies of mitochondrial DNA HVR III 514–524 (CA)_n dinucleotide repeats in the Urali Kuruman tribal population of South India. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 8(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s41935-018-0083-5>

Taanman, J.-W. (1999). The Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1410(2), 103-123. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3)

Tadeo, M. A. (2013). *La genética forense en México su aplicación legal y el banco de datos Genéticos* [Universidad Nacional Autónoma de México]. https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_tadeo_rangel.pdf

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. 2(2), 70-78.

Tamm, E., Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, M., Smith, D. G., Mulligan, C. J., Bravi, C. M., Rickards, O., Martinez-Labarga, C., Khusnutdinova, E. K., Fedorova, S. A., Golubenko, M. V., Stepanov, V. A., Gubina, M. A., Zhadanov, S. I., Ossipova, L. P., Damba, L., Voevoda, M. I., Dipierri, J. E., ... Malhi, R. S. (2007). Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *PLoS ONE*, 2(9), e829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000829>

Teama, S. (2018). DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. En Y. Liu (Ed.), *Genetic Diversity and Disease Susceptibility*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79517>

Terreros, G. A. (2010). *Determinación de la variación de las secuencias de las regiones HVI y HVII de la región control del DNA mitocondrial en una muestra de la población caribe colombiana* [Magister en Ciencias Biológicas con Énfasis en Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/831/cien32.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Thongngam, P., Leewattanapasuk, W., Bhoopat, T., & Sangthong, P. (2016). Nucleotide sequence analysis of the hypervariable region III of mitochondrial DNA in Thais. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 41, 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2016.04.001>

Tillmar, A. (2010). *Populations and Statistics in Forensic Genetics* [Linköping University]. <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:309703/FULLTEXT01.pdf>

Trejo, N. I., & Sánchez, D. J. (2012). *Biología Celular y Molecular*. Editorial Alfil, S.A. de C.V. <https://library.biblioboard.com/content/9c403008-9442-477a-9a93-acef21651096>

Tzuc, E., & Turati, M. (2020, septiembre 22). *Un país rebasado por sus muertos—Crisis Forense*. 5°ELEMENTO. <https://quintoelab.org/crisisforense/un-pais-rebasado-por-sus-muertos/>

Umbria, M., Ramos, A., Aluja, M. P., & Santos, C. (2020). The role of control region mitochondrial DNA mutations in cardiovascular disease: Stroke and myocardial infarction. *Scientific Reports*, 10(1), 2766. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59631-x>

Vázquez, J. (2016). Reparación del ADN: Un asunto de vida...y de Premios Nobel. *Educación Química*, 27(2), 93-96. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.02.002>

Vázquez, S., & Guardado, M. (2021, febrero 23). El ADN mitocondrial: Una alternativa útil para la identificación forense. *Identificación Humana*. <https://www.identificacionhumana.mx/el-adn-mitocondrial-una-alternativa-util-para-la-identificacion-forense/>

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., ... Zhu, X. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, 291(5507), 1304-1351. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>

Verma, K., Sharma, S., Sharma, A., Dalal, J., & Bhardwaj, T. (2018). Data on haplotype diversity in the hypervariable region I, II and III of mtDNA amongst the Brahmin population of Haryana. *Data in Brief*, 17, 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.01.011>

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312-328. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>

Villarroel, W. S. (2011). *Distribución de haplotipos de la región hipervariable mitocondrial de las poblaciones indígenas originarias Uru y Ayorea de Bolivia* [Universidad Mayor de San Andrés]. <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/3585/T-1812.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Wang, Z., Ying, Z., Bosy-Westphal, A., Zhang, J., Schautz, B., Later, W., Heymsfield, S. B., & Müller, M. J. (2010). Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: Evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(6), 1369-1377. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29885>
- Wilson, M. R., DiZinno, J. A., Polansky, D., Replogle, J., & Budowle, B. (1995). Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 108(2), 68-74. <https://doi.org/10.1007/BF01369907>
- Winters-Miner, L. A. (2015). *Practical predictive analytics and decisioning systems for medicine: Informatics accuracy and cost-effectiveness for healthcare administration and delivery including medical research*. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Wu, R., & Kaiser, A. D. (1968). Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology*, 35(3), 523-537. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(68\)80012-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(68)80012-9)
- Yang, Y., Shou, Z., Zhang, P., He, Q., Xiao, H., Xu, Y., Li, C., & Chen, J. (2008). Mitochondrial DNA haplogroup R predicts survival advantage in severe sepsis in the Han population. *Genetics in Medicine*, 10(3), 187-192. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e318163c343>
- Yao, Y., Nishimura, M., Murayama, K., Kuranobu, N., Tojo, S., Beppu, M., Ishige, T., Itoga, S., Tsuchida, S., Mori, M., Takayanagi, M., Yokoyama, M., Yamagata, K., Kishita, Y., Okazaki, Y., Nomura, F., Matsushita, K., & Tanaka, T. (2019). A simple method for sequencing the whole human mitochondrial genome directly from samples and its application to genetic testing. *Scientific Reports*, 9(1), 17411. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53449-y>
- Zavala, E. I., Rajagopal, S., Perry, G. H., Kruzic, I., Bašić, Ž., Parsons, T. J., & Holland, M. M. (2019). Impact of DNA degradation on massively parallel sequencing-based autosomal STR, iiSNP, and mitochondrial DNA typing systems. *International Journal of Legal Medicine*, 133(5), 1369-1380. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02110-4>
- Zhang, D.-X., & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: Practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3), 563-584. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01773.x>
- Zhang, Y., Xu, Q., Cui, H., Cui, Y., Lin, H., Kim, K., & Lee, J. (2005). Haplotype diversity in mitochondrial DNA hypervariable region I, II and III in a Korean ethnic group from northeast China. *Forensic Science International*, 151(2-3), 299-301. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.02.002>
- Zhao, H., Shen, J., Medico, L., Platek, M., & Ambrosone, C. B. (2010). Length heteroplasmies in human mitochondrial DNA control regions and breast cancer risk. 1(3), 184-192.

Zhou, J., Gou, H., Ye, Y., Zhou, Y., Lu, X., & Ying, B. (2017). Sequence variations of mitochondrial DNA D-loop region in patients with acute myeloid leukemia. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6988>

Zhou, Q., Li, H., Li, H., Nakagawa, A., Lin, J. L. J., Lee, E.-S., Harry, B. L., Skeen-Gaar, R. R., Suehiro, Y., William, D., Mitani, S., Yuan, H. S., Kang, B.-H., & Xue, D. (2016). Mitochondrial Endonuclease G Mediates Breakdown of Paternal Mitochondria upon Fertilization. *Science*, 353(6297), 394-399. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4777>

Zillges, H. (2013). *The Genetic History of the Otomi in the Central Mexican Valley* [Universidad de Pennsylvania]. https://repository.upenn.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1044&context=anthro_seniortheses

Zimmermann, B., Röck, A., Huber, G., Krämer, T., Schneider, P. M., & Parson, W. (2011). Application of a west Eurasian-specific filter for quasi-median network analysis: Sharpening the blade for mtDNA error detection. *Forensic Science International: Genetics*, 5(2), 133-137. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.10.003>