



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE

**PROPUESTA METODOLÓGICA PARA EL ANÁLISIS DE LOS
POLIMORFISMOS DE LA HVR I
DE LA REGIÓN CONTROL DEL DNA MITOCONDRIAL EN
MUESTRAS DEGRADADAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN CIENCIA FORENSE**

P R E S E N T A

XIMENA RUIZ SEGAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ MARIANO GUARDADO ESTRADA

CIUDAD DE MÉXICO, 2024

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**Protesta universitaria de integridad y honestidad
académica y profesional
(Titulación o graduación con trabajo escrito)**



De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Propuesta metodológica para el análisis de los polimorfismos de la
HVRI de la región control de DNA mitocondrial para muestras degradadas

que presenté para obtener el título/grado de licenciatura,
es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi entidad académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Ximena Ruiz Segal 17/01/2024 313093412

(Nombre, firma, fecha y número de cuenta de la persona alumna)

Agradecimientos

Agradecimientos personales

Este proyecto de licenciatura no solo representa mi trabajo. En mi vida, he sido absolutamente privilegiada con una gran red de apoyo sin la cual, probablemente, nada sería posible. Por supuesto, quiero empezar agradeciendo a mi mamá y a mi papá, pilares fundamentales en mi desarrollo académico y personal, porque me enseñaron sobre ternura y amor, pero también sobre perseverancia, valentía y resistencia. Siempre han estado ahí, siendo faro, luz, guiando y acompañando. A mi hermana Ta, que ha caminado conmigo durante 24 años y cuyo amor inmenso ha sido siempre alimentado por un cariño infinito lleno de enseñanzas y aprendizajes. A mis abuelos, al presente (Patito Patito), por todos esos desayunos llenos de pláticas conmovedoras, por ser ejemplo de resiliencia, por tanta enseñanza, por construir familia; y a los abuelos ausentes, que a pesar de que ya no están, sus enseñanzas y cariños siguen presentes, por ser ejemplo de revolución y resistencia, pero también de compañerismo, cooperativismo y construcción de colectividad desde la ternura y el acompañamiento. A mis tíos: Palini, Eve, Edith (que ya no está pero dejó mucho), Neto, Carlos y Rafa, y a toda la enorme familia que siempre me ha acompañado y que me han enseñado que otro mundo es posible. También agradezco enormemente a mi familia elegida, con la que he aprendido que no solo la institución familiar es un poderoso vínculo en este mundo, que es posible retejer el tejido social tan dañado y que definitivamente es posible construir comunidad desde el cariño. A Andrés, por ser cálido hogar y compañero de aventuras, aprendizajes y cariños, por ser equipo y construir día con día. A Blanca, por la ternura radical y el cariño tan inmenso, a todas mis amistades en este camino: Fany, Carlos, Aline, Fer, Alexis, Andrea, Regina, Paulina, Columba, Diana, Angélica, Deniss, Renata, Deni, Etzel y Olivia. También a todos los profesores con pasión por la enseñanza con los que he tenido la increíble oportunidad de aprender a lo largo de estos años de licenciatura.

Quiero agradecer también a mi asesor de tesis, a Mariano, por invitarme al mundo de la genética forense, por enseñar, guiar, por la crítica constructiva y también por toda la confianza; a Christian, por siempre apoyarme y estar pendiente de las actividades en el laboratorio y de nuestro bienestar; a Alexa, por toda la apertura y ayuda brindada en clases y en todo este proceso; a Viviana, por tanto apoyo y asesoramiento con cariño; a Mauro, por las aportaciones a este proyecto y a mi futuro en la investigación.

Agradecimientos profesionales:

Al Dr. J. Mariano Guardado, por la apertura, la confianza y la enseñanza.

Al Dr. Christian Cárdenas, por el asesoramiento continuo dentro del laboratorio.

Al jurado que leyó este proyecto y ofreció grandes aportaciones para mi tesis y para mi futuro como investigadora, y que además, me ayudaron para hacerlo en tiempo récord:

Q. Viviana Escobar

Dr. Diego González Halphen

M. en C. Mauro López

Dra. Patricia Orduña

Contenido

Agradecimientos	2
Agradecimientos personales	2
Agradecimientos profesionales:.....	3
Glosario	6
Introducción	8
Marco teórico.....	8
Genética forense	8
Características del ácido desoxirribonucleico	9
DNA mitocondrial	11
Variación genética.....	14
Degradación del DNA	16
Técnicas de la biología molecular	16
Planteamiento del problema	22
Justificación	23
Antecedentes	25
Objetivos	28
Objetivo general.....	28
Objetivos particulares	28
Materiales y métodos	29
Toma de muestra y extracción de DNA en sangre con la técnica de fenol-cloroformo (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)	30
Cuantificación del DNA (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)	35
Diseño de los cebadores	35
Electroforesis en gel de agarosa al 2% (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)	39
Purificación de los productos de PCR (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)	39
Reacción de secuenciación (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)	40
Purificación en columnas	41
Búsqueda de los polimorfismos en EMPOP	41
Resultados y discusión	43
Extracción de DNA.....	43
Cuantificación del DNA.....	43

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
<i>Diseño de cebadores</i>	44
<i>Prueba de temperatura</i>	45
Secuenciación.....	48
DNA _x	48
LCF-10.....	50
LCF-37.....	52
Conclusión	57
Perspectivas	59
Referencias.....	60
Anexo	65
Anexo 1. Tabla con los reactivos y los equipos utilizados para la elaboración del presente proyecto	65
Anexo 2. Tabla de Excel utilizada para facilitar el diseño de los cebadores	67
Anexo 3. Tabla de Excel utilizada para observar los alineamientos.....	78

Glosario

A	Adenin
C	Citosina
c-	Control negativo
Cebador	Sinónimo de oligonucleótido
Oligonucleótidos	Cadena de nucleótidos en donde cada unidad está conformada por una base nitrogenada, un azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Los desoxinucleósidos trifosfato son biomoléculas esenciales para la síntesis de DNA. La polimerasa utiliza dNTPs que va añadiendo como desoxirribonucleótidos a la cadena de DNA
G	Guanina
Haplogrupo	Categorización utilizada en la genética para clasificar secuencias con variaciones polimórficas
HVR I	Región hipervariable I
HVR II	Región hipervariable II
HVR III	Región hipervariable III
Loci	Plural de locus
Locus	Se nombra así a la ubicación específica de un gen o un marcador en un cromosoma
mtDNA	DNA mitocondrial
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés
Pirimidina	Se clasifica así a los nucleótidos que tienen un solo anillo en su estructura, en el caso del DNA son citosina y timina y para el RNA citosina y uracilo
Polinucleótidos	Biomoléculas que se componen de secuencias lineales de nucleótidos

Purina	Se clasifica así a los nucleótidos que tienen dos anillos en su estructura, adenina y guanina
R	Que corresponde a una purina (A ó G)
rCRS	Secuencia revisada de referencia de Cambridge
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico, molécula crucial en la síntesis de proteínas
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia, transporta aminoácidos específicos hacia el ribosoma, crucial en la síntesis de proteínas
T	Timina
Y	Que corresponde a una pirimidina (T ó C)
YSTRs	Marcadores genéticos de repetición corta que se encuentran en el cromosoma Y. Son utilizados para estudiar la variabilidad genética por línea paterna y son también utilizados en pruebas de paternidad

Introducción

La identificación de personas en el contexto forense tiene una enorme relevancia actualmente, sobre todo en un país en donde son más de 110,000 desaparecidos y más de 50,000 cuerpos sin identificar. Existen distintas áreas del conocimiento como la antropología, la odontología, la dactiloscopía, la medicina y la genética que se unen para obtener la mayor cantidad de información de un individuo desconocido, con el objetivo de obtener una ficha de identificación que permita comparar datos ante mórtem y post mórtem.

La intención del presente proyecto de investigación partió de la necesidad de lograr analizar DNA mitocondrial degradado debido a las condiciones en las que se suelen encontrar al analizar muestras de interés forense, por lo que fue necesario diseñar un conjunto de cebadores y ponerlos a prueba utilizando DNA íntegro para poder proponer una metodología que permitiera la amplificación de fragmentos de DNA pequeños en una de las regiones del genoma mitocondrial en la que se encuentran la mayor cantidad de polimorfismos.

Marco teórico

Genética forense

El desarrollo de esta ciencia dentro del contexto legal ha estado íntimamente relacionado con el análisis de la variación genética (Houck, 2015). En 1900 se descubrieron los grupos sanguíneos ABO y se utilizaban con fines de identificación, sin embargo, ofrecían resultados limitados y no permitían identificar con un alto poder discriminativo (Li, 2018). En 1953 se describió al DNA como una molécula formada por una doble hélice y a partir de ahí, la genética como se conocía cambió drásticamente (Li, 2018).

En 1985 Alec Jeffreys describió regiones específicas del DNA llamadas minisatélites, estas son repetitivas y varían en longitud y en algunos de estos minisatélites, identificó una secuencia común que podría jugar un papel importante en la generación de regiones muy variables, proponiendo por primera vez la aplicación de marcadores genéticos en la identificación humana y pruebas de paternidad (Jeffreys et al., 1985). En 1986 la policía de Reino Unido solicitó la ayuda del Dr. Alec Jeffreys para probar la culpabilidad de una persona que era sospechosa de haber cometido dos crímenes de violación y homicidio; sin embargo, gracias a la prueba genética se demostró su inocencia.

El DNA fue aceptado como evidencia en la corte de Estados Unidos por primera vez en 1987; Tommy Lee Andrews fue encontrado culpable de violación gracias a la comparación de la muestra de DNA obtenida de rastros de semen en la víctima con la muestra extraída del sospechoso (Panneerchelvam & Norazmi, 2003).

De esta forma, la genética forense se constituyó como una de las ciencias que coadyuban en un proceso judicial. Es el conjunto de técnicas de la biología molecular enfocado en resolver incógnitas que van desde pruebas de paternidad en el ámbito del derecho familiar y civil, hasta identificaciones humanas en derecho penal.

Características del ácido desoxirribonucleico

Organización

El DNA humano se encuentra almacenado en dos organelos de la célula, el núcleo y la mitocondria. El DNA nuclear se compone de más de 3 mil millones de pares de bases empaquetadas por proteínas; la doble hélice de DNA se enrolla en histonas para formar nucleosomas que, a su vez, dan lugar a la cromatina que conforma a los cromosomas, cada cromosoma tiene una región denominada centrómero y un brazo corto y uno largo. Además, los extremos de los cromosomas están protegidos por estructuras llamadas telómeros, que son secuencias repetidas de DNA que ayudan a prevenir la pérdida de información genética durante la replicación (Annunziato, 2008), los humanos tenemos 44 cromosomas autosómicos y dos sexuales (XX o XY). Del DNA mitocondrial se hablará más adelante.

Estructura

El DNA se compone de dos cadenas de polinucleótidos complementarias y antiparalelas unidas por puentes de hidrógeno que forman una doble hélice (Alberts et al., 2019; Watson et al., 2016). Los nucleótidos son la unidad básica de los ácidos nucleicos (DNA y RNA) y se conforman por una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. Las pentosas son azúcares que tienen cinco átomos de carbono numerados como 1', 2', 3', 4' y 5' y en el caso del DNA, en el carbono 2' tienen un átomo de hidrógeno (2' desoxirribosa), en cambio, en el caso del RNA hay un OH. Por otro lado, las bases nitrogenadas son compuestos heterocíclicos y pueden ser purinas (adenina y guanina) o pirimidinas (timina y citosina), las purinas se componen de dos anillos (uno hexagonal y otro pentagonal) y las pirimidinas sólo de uno (hexagonal) (Alberts et al., 2019; Pierce, 2020). El último componente de un nucleótido es un grupo fosfato que está unido al carbono 5' de la

pentosa y le da el carácter ácido al DNA. Los nucleótidos forman una secuencia al conectarse entre sí mediante un enlace fosfodiéster, que une al hidroxilo 3' de la pentosa de un nucleótido, al grupo fosfato del carbono 5' del siguiente.

Por su parte, las cadenas de polinucleótidos están enlazadas de manera no covalente, la adenina y la timina se conectan a través de dos puentes de hidrógeno, mientras que la guanina y la citosina a través de tres.

La información genética se encuentra codificada en una secuencia lineal conformada por 4 nucleótidos (adenina, timina, guanina y citosina) y gracias a múltiples avances tecnológicos en técnicas de biología molecular se pudo conocer la secuencia del genoma humano, que está codificado en aproximadamente 3.2×10^9 pares de bases; sin embargo, la individualidad que tenemos (es decir, las diferencias en las secuencias de un humano a otro) es de apenas el 0.1% (Pierce, 2020) y a este fenómeno se le conoce como variación genética.

Función

El DNA es una de las macromoléculas más importantes en el estudio de la biología, en ella están contenidas las instrucciones de la vida ya que almacena la información genética codificada en una secuencia de nucleótidos que es diferente en cada individuo (Alberts et al., 2019).

Replicación del DNA

Se denomina replicación al proceso mediante el que el genoma del DNA se copia en las células antes de que se lleve a cabo la división celular; así cada célula hija al finalizar tiene una copia del genoma completo. El proceso comienza en regiones específicas del DNA llamadas orígenes de replicación, las proteínas de iniciación (helicadas) se unen ahí a la cadena y comienzan a desenrollar la doble hélice. A continuación, se forma una burbuja de replicación que avanza de manera bidireccional. Los extremos, denominados horquillas de replicación, van progresando en sentidos opuestos. En cada lado, una de las hebras va a ser polimerizada de forma continua y la otra de manera discontinua por fragmentos llamados de Okazaki, que después serán reunidos; la incorporación de nucleótidos sucede gracias a una enzima conocida como polimerasa, siempre en dirección 3'-5'. Al final, se encontrarán dos horquillas de replicación distintas que avanzaban de manera opuesta y entonces se resuelve

la separación de las cadenas, Esto no ocurre con el DNA de los extremos de los cromosomas, que será recortado (Alberts et al., 2019; Watson et al., 2016).

DNA mitocondrial

La mayoría del DNA humano está contenido en el núcleo de las células, sin embargo, también se puede encontrar en menor cantidad dentro de las mitocondrias, que son organelos de la célula eucarionte ubicados en el citoplasma, donde se produce la mayoría del ATP de las células; tienen una membrana externa y una membrana interna que forman dos compartimentos, la matriz y el espacio intermembranoso (Alberts et al., 2019). En el caso de los humanos, todo el genoma mitocondrial se encuentra en una molécula de DNA circular de doble cadena; cada mitocondria tiene varias copias de genoma mitocondrial y una sola célula puede tener muchas mitocondrias; el DNA mitocondrial representa el 1% del DNA humano total (Habane et al., 2021).

El DNA mitocondrial humano o mtDNA por sus siglas en inglés, está conformado por 16,569 pares de bases (aunque el número preciso de nucleótidos puede variar como consecuencia de inserciones y deleciones), y fue secuenciado por primera vez en 1981; actualmente esa secuencia se conoce como la secuencia de referencia de Cambridge (CRS por sus siglas en inglés), sin embargo, posteriormente y con mayores avances tecnológicos, fue posible revisarla y corregirla y actualmente se utiliza la rCRS (revised Cambridge reference sequence), que se puede encontrar en el siguiente enlace: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/251831106> (Butler, 2005).

El mtDNA no tiene intrones y codifica para 2 rRNAs, 22 tRNAs y 13 proteínas (Butler, 2005); de hecho, los tRNAs de las mitocondrias son inusuales ya que de acuerdo con las reglas generales aplicables al código genético *universal* se requieren al menos 32 moléculas de tRNA para descodificarlo (Watson et al., 2016). Además, tiene una región no codificante denominada D-loop que contiene sitios donde la replicación y la transcripción del mtDNA inician (Habane et al., 2021; Pierce, 2020). La región más utilizada en el campo forense es la *D-loop* también llamada región control (figura 1), ya que no es codificante y por lo tanto varía más entre individuos, es decir que es la región que más polimorfismos tiene. Usualmente se analizan las regiones hipervariables I y II (HV1 y HV2). En la tabla 1 se

muestran las principales diferencias entre el DNA nuclear y el DNA mitocondrial.

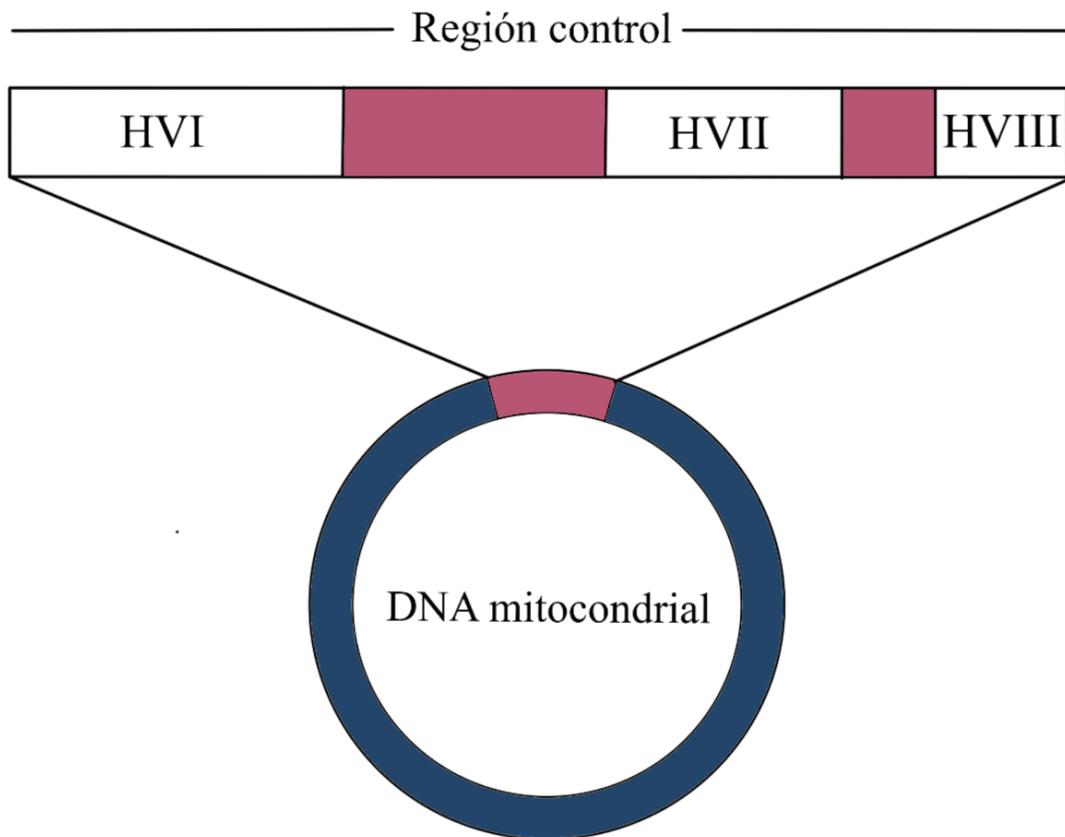


Figura 1. Mapa del DNA mitocondrial, elaboración propia.

Tabla 1. Comparación entre el DNA mitocondrial y el DNA nuclear

	DNA nuclear	DNA mitocondrial
Tamaño	~3.2 mil millones pb	~16569 pb
DNA total humano	99%	1%
DNA total en cada célula	1	~1000
Estructura	Lineal	Circular
Organización	Empaquetado por proteínas	En la matriz de la mitocondria
Heredado de	50% madre, 50% padre	100% madre
Recombinación genética	Sí	No

El análisis del DNA mitocondrial tiene aplicaciones en áreas como la antropología y la arqueología, contextos en los que muchas veces, la extracción, la amplificación y la secuenciación representan todo un desafío (Harney et al., 2021; Hofreiter et al., 2021; Rohland & Hofreiter, 2007).

En cuanto al uso del DNA mitocondrial en la genética forense, es muy importante señalar que debe ser el último recurso cuando se trata de casos de identificación, ya que existen distintas limitaciones que es importante tener en cuenta, entre las que destacan un bajo poder de discriminación y dificultad para identificar heteroplasmias (que consisten en dos secuencias de DNA mitocondrial en un mismo individuo).

En la búsqueda bibliográfica no se encontraron como tal protocolos de extracción de DNA mitocondrial, sin embargo, existen distintas propuestas en las que se sugieren diferentes métodos de extracción de DNA para muestras complejas que van desde hueso hasta DNA antiguo (Gonzalez et al., 2020; Harney et al., 2021; Hofreiter et al., 2021; Rohland & Hofreiter, 2007), por ejemplo, Udogadi et al. (2020) propone de acuerdo con una extensa revisión bibliográfica que los mejores métodos para extraer DNA de hueso consisten en una desmineralización y la utilización de columnas, esto debido a que en estos casos el DNA suele estar degradado y las columnas permiten recuperar fragmentos de hasta 50 pb.

Tradicionalmente los protocolos de amplificación de DNA mitocondrial proponen la amplificación de las regiones hipervariables 1 y 2 en amplicones que van de 300 a 400 pb, sin embargo en el contexto forense el DNA mitocondrial puede encontrarse ya degradado. Por ese motivo, se han realizado distintas propuestas de estrategias para amplificar y secuencias DNA mitocondrial en amplicones de bajo tamaño. Una de las propuestas más utilizadas se denomina Mini-midi-mito propuesta por Berger & Parson (2009), en donde utilizan un conjunto de 5 pares de cebadores, que ofrecen como resultado 5 amplicones que varían entre 280 y 444 pares de bases y que se superponen y permiten secuenciar las regiones hipervariables 1 y 2.

Si bien en este proyecto se aborda el uso del DNA mitocondrial en la genética forense con fines de identificación, tiene también otros usos en el contexto forense; por ejemplo, en delitos contra la libertad sexual, se ha reportado el uso de DNA mitocondrial cuando una sola muestra puede tener más de un contribuyente (Hatsch et al., 2007). Otro ejemplo del uso del

DNA mitocondrial en el contexto forense es el análisis del gen COI (citocromo c oxidasa I) como un código de barras para identificación de especies de animales, con aplicaciones en la entomología y en la veterinaria forense (Dawnay et al., 2007).

Variación genética

Se puede definir como las diferencias en la secuencia del genoma de un individuo con respecto a la población y es la consecuencia de distintos procesos como los descritos a continuación:

Mutaciones: pueden ser espontáneas o inducidas por factores externos, las más comunes alteran un solo nucleótido y se llaman mutaciones puntuales, que son el cambio de una base por otra y ocurre de dos formas, las transiciones que son cambios purina-purina o pirimidina-pirimidina y las transversiones, en donde cambia una purina por una pirimidina o una pirimidina por una purina. Por otro lado, hay mutaciones que consisten en inserciones (se incorpora uno o más nucleótidos a la secuencia) o deleciones (se pierde un nucleótido o más de la secuencia) (Alberts et al., 2019).

Recombinación homóloga: sucede cuando los cromosomas homólogos se aparean antes de la primera división nuclear en la meiosis, provocando un intercambio genético de la secuencia de DNA.

Flujo genético: consiste en el cambio debido al desplazamiento de genes de una población a otra (Slatkin, 1987).

Polimorfismos

La forma más común de variación genética es la denominada SNPs (Single Nucleotide Polymorphism por sus siglas en inglés), que son mutaciones puntuales de un solo nucleótido en un sitio específico entre individuos de la misma especie (Pierce, 2020). Se encuentran tanto en regiones codificantes como en regiones no codificantes del DNA y, en el campo forense, pueden permitir identificar o estimar la identificación (en el caso del DNA mitocondrial del que se hablará después) de un individuo desconocido compararlo con una muestra de referencia (Pierce, 2020). Sin embargo, existe otro tipo de polimorfismo denominado polimorfismo de longitud, por ejemplo, los STRs (Short Tandem Repeats por sus siglas en inglés), también llamados microsátélites, que consisten en repeticiones de 2 a 5 nucleótidos y son muy utilizados en la genética forense ya que tienen un alto poder de

discriminación. La gran variabilidad en estas regiones del DNA se debe a la tasa de mutación que es relativamente alta (figura 2) (Butler, 2005; Udogadi et al., 2020).

SNPs
-----ATTGCAGTATTCAGCGCATAACACA-----
-----ATTGCAGTGTTTCAGCGCATAACACA-----

STRs
ATGATGATGATGATGATG----
ATGATGATGATG----

Figura 2. Ejemplo de SNP arriba y STR abajo.

Haplogrupos mitocondriales

Se denomina así a las categorías genéticas que se han establecido para clasificar las secuencias de DNA mitocondrial cuyas variaciones polimórficas son compartidas por grupos de individuos y permiten establecer relaciones poblacionales a través del linaje materno (Kenney et al., 2013).

El estudio de los haplogrupos mitocondriales juega un papel fundamental en los campos de la genética y de la antropología. De hecho, los haplogrupos más antiguos se han encontrado en África y debido a la migración, se distribuyeron en Europa, Asia y América. En el contexto de la investigación del genoma mitocondrial en México, existe una carencia muy significativa de bases de datos que permitan estudiar y comparar la gran diversidad de haplogrupos mitocondriales en el país.

El nombre de los haplogrupos mitocondriales se designa de acuerdo con un sistema de nomenclatura estandarizado. Cada haplogrupo representa una rama en el árbol filogenético del DNA mitocondrial y está identificado con una letra. Los haplogrupos tienen divisiones llamadas subhaplogrupos que se identifican con un número y hay más subdivisiones representadas por letras minúsculas. De esta forma, cada nivel dentro de las jerarquías representa una subdivisión cada vez más específica (Bandelt et al., 2014)

A pesar de la falta de información, existen estudios en los que se han analizado las regiones hipervariables I y II. En 2009 Guardado-Estrada y colaboradores, compararon 270 muestras de personas pertenecientes a población mexicana que no estuvieran relacionadas con la secuencia de referencia de Cambridge (rCSR por sus siglas en inglés) y encontraron que los haplogrupos más comunes son A2, B2, C1 y D1, con una frecuencia de 51.1, 17.8, 18.5 y 5.9% respectivamente.

Degradación del DNA

En el campo de la genética forense, los fragmentos de DNA *post-mortem* son susceptibles a la degradación como consecuencia de distintos procesos, por un lado, los enzimáticos, que pueden ser endógenos debido a que la muerte celular se asocia con la activación de enzimas intracelulares, como lipasas, proteasas y nucleasas, o exógenos, debido a la interacción con el medio ambiente y los microorganismos del entorno. Por otro lado, también ocurren procesos hidrolíticos que afectan los enlaces glicosídicos entre la desoxirribosa y la base nitrogenada. En el ámbito forense, la degradación del DNA representa un problema debido a que entre más pequeños sean los fragmentos y mayor sea la degradación, más complicado se vuelve el análisis. En esos casos en los que el DNA nuclear se encuentra degradado, es posible encontrar mtDNA en mejores condiciones debido a que en una sola célula existen muchas copias.

Técnicas de la biología molecular

Extracción de DNA

Para poder hacer un análisis adecuado, es necesario separar al DNA de las proteínas y de otros componentes de las células. Existen distintas técnicas que permiten llevar a cabo la extracción, aunque de forma muy general, la mayoría de ellas primero lisan las células para liberar las moléculas de DNA y posteriormente las aíslan de otros componentes indeseables.

La técnica utilizada para este proyecto fue extracción con fenol-cloroformo y se usaron distintos reactivos que se describen a continuación:

Amortiguador de lisis: Rompe los eritrocitos de la sangre para facilitar la extracción.

Proteinasa K: es una enzima que digiere las proteínas.

NaCl: El cloruro de sodio permite que se eleve la concentración iónica y provoca que el DNA se precipite.

Fenol-cloroformo-álcohol-isoamílico: Desnaturaliza proteínas sobrantes y facilita la extracción formando dos fases, la acuosa donde está el DNA y la orgánica, donde se quedan las proteínas y restos de las células.

Etanol al 80%: Precipitación del DNA.

Etanol absoluto: Lavado del DNA precipitado.

Electroforesis

La electroforesis es una técnica utilizada para analizar, separar, identificar y purificar fragmentos de biomoléculas, en este caso de DNA y se lleva a cabo en una matriz tipo gel que puede ser de agarosa o de poliacrilamida. Las moléculas se separan de acuerdo con su tamaño al ser sometidas a un campo eléctrico. El DNA posee una carga negativa y migra a través del gel hacia el polo positivo; durante ese proceso, los poros que hay en el gel tamizan las moléculas de DNA de acuerdo con su tamaño; las moléculas pequeñas migran más rápido que las grandes. Para que las bandas en el gel de agarosa sean visibles, basta con 20 pg de DNA y bajas concentraciones de agentes fluorescentes para visualizarlo, que se intercalan con las bases apiladas (Watson et al., 2016). Esta técnica permite recuperar el DNA de cada banda obtenida (Sambrook, 2001). Los factores determinantes en la migración del DNA a través del gel son los siguientes:

1. El tamaño molecular del DNA.
2. La concentración de agarosa o de poliacrilamida.
3. La conformación del DNA.
4. El agente intercalante utilizado para teñir.
5. El voltaje aplicado.
6. El tipo de agarosa o poliacrilamida.
7. El amortiguador de electroforesis.

Cuantificación

Es un proceso sumamente importante ya que permite conocer la concentración de DNA presente en una muestra, existen distintos métodos de cuantificación como la espectrofotometría UV, la fluorometría, la PCR en tiempo real, entre otros. En el campo de

la genética forense es necesario tener métodos de cuantificación suficientemente precisos que permitan determinar la cantidad de DNA presente en una muestra, ya que la concentración puede influir en la calidad de los perfiles que se obtengan.

En este proyecto se cuantificó mediante fluorometría, que es un método sensible y específico que cuantifica la fluorescencia emitida. Se utilizan colorantes específicos que se unen a la molécula de DNA y la intensidad de la fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad de DNA presente. Además, durante la tinción de la muestra es necesario preparar también un blanco y un estándar para construir una curva de referencia.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés)

Consiste en una reacción bioquímica *in vitro* en la que se utiliza a la DNA polimerasa, por lo que es un proceso enzimático en el que se dirige la síntesis a partir de una hebra molde de DNA para simular el proceso de replicación y así obtener muchas copias de una secuencia específica. Para llevar a cabo la reacción es necesario preparar una solución maestra en la que se agregan los siguientes componentes (Butler, 2005; Sambrook, 2001):

DNA polimerasa termoestable: Cataliza la síntesis del DNA dependiente de la hebra molde; la más utilizada es aislada de *Thermus aquaticus* y se le denomina *Taq DNA polimerasa*.

Desoxirribonucleótidos trifosfatados: Son los bloques de construcción que permiten llevar a cabo la replicación del DNA, a diferencia de los nucleótidos, los dNTPs tienen tres grupos fosfato unidos al azúcar que proporcionan energía durante el proceso. En una reacción de amplificación estándar se utilizan concentraciones equimolares de los dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP).

Cationes divalentes: Las polimerasas termoestables requieren cationes divalentes para activarse, usualmente se utiliza Mg^{2+} como cofactor de la enzima.

Amortiguador: Permite amortiguar el pH de la reacción.

Cationes monovalentes: Facilitan la unión de los cebadores al molde y ayudan a estabilizar la estructura de la doble hélice del DNA, usualmente se utilizan cationes K^+ .

Una vez que se prepara la mezcla maestra, se añade el DNA molde, que contiene la secuencia objetivo que se desea amplificar.

Oligonucleótidos o cebadores sintéticos: Son uno de los componentes más importantes ya que permiten iniciar la síntesis de DNA uniéndose por complementariedad a la cadena molde; el adecuado diseño de los cebadores es fundamental y un paso crítico para obtener como resultado eficiencia y especificidad en la reacción de amplificación. Existen distintos tipos, de acuerdo con las necesidades de este proyecto se diseñaron cebadores degenerados (cabe destacar que el costo aproximado de los cebadores degenerados es similar al de un cebador regular); se le denomina degenerado cuando la secuencia tiene variaciones en alguno de los nucleótidos, en este caso, estas variaciones se determinan de acuerdo con las posiciones donde se espera encontrar variabilidad genética específicamente de población mexicana. El cebador degenerado puede alinearse eficazmente con las secuencias objetivo, aunque sea ligeramente diferente en la composición de nucleótidos.

La PCR es un proceso que consiste en una serie de ciclos de temperaturas (figura 3); se deben tener en cuenta las siguientes condiciones (Sambrook & Green, 2001):

Desnaturalización: las hebras del DNA se separan a una temperatura elevada. En una PCR común, este proceso se lleva a cabo a alrededor de 94 °C debido a que es la temperatura más alta que la enzima puede resistir durante 30 ciclos sin dañarse. Se realiza una desnaturalización inicial del DNA al comenzar la reacción y posteriormente se desnaturaliza una vez por cada ciclo.

Hibridación o alineamiento de los cebadores al DNA molde: depende de la secuencia y de la cantidad de A, T, G y C que contenga el cebador, esta se expresa como T_m y se calcula de la siguiente forma

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Extensión o elongación: en este paso, la *Taq DNA polimerasa* empieza a incorporar nucleótidos a partir de los cebadores previamente alineados, la temperatura óptima de actividad de la enzima es de 72 °C, un valor intermedio entre el alineamiento de los cebadores y la desnaturalización de la doble cadena.

Número de ciclos: Son las veces que se repite la desnaturalización, el alineamiento y la elongación durante la reacción y usualmente se usan de 25 a 30 ciclos, menos ciclos podrían tener como consecuencia un bajo rendimiento y más ciclos, una amplificación inespecífica.

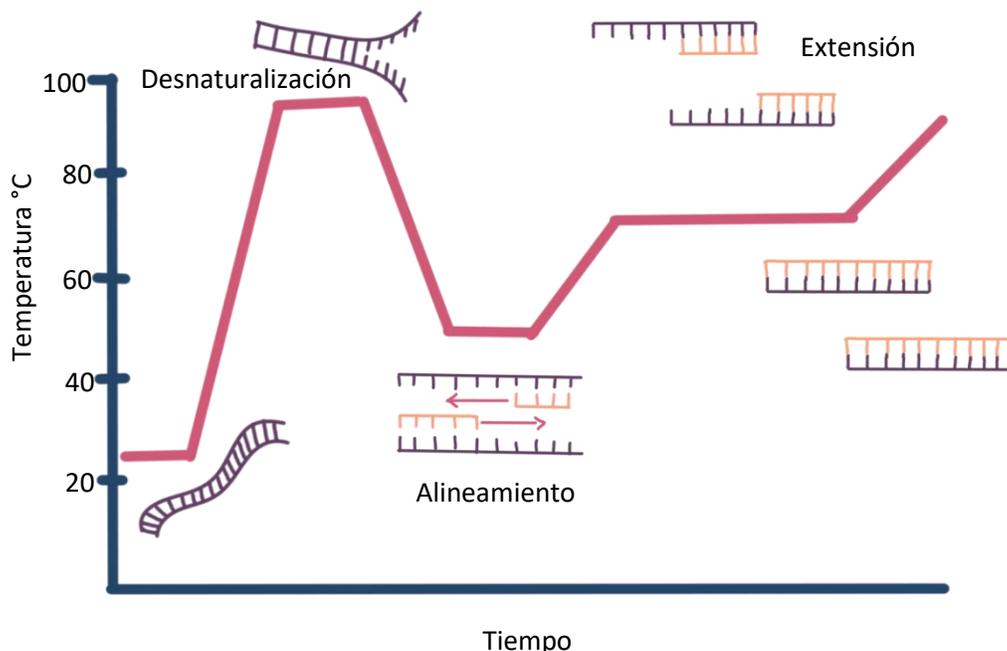


Figura 3. Condiciones en la PCR

Secuenciación del DNA

En 2001 se publicó la versión preliminar y en 2003, la versión completa de los más de 3 mil millones de nucleótidos que conforman al genoma humano. Hoy en día se han desarrollado distintos métodos que permiten conocer la secuencia exacta de nucleótidos en una molécula de DNA.

Para este trabajo se utilizó y se secuenció por el método de Sanger. Esta técnica, también denominada como secuenciación de terminación de cadena, comienza con la reacción de secuenciación que empieza con la desnaturalización de las cadenas de DNA, una vez que se tiene una cadena sencilla se alinean los oligonucleótidos y se empiezan a alargar tomando nucleótidos de una mezcla de dNTPs y de ddNTPs (terminadores de cadena). De esta forma, la secuencia se extiende con dNTPs hasta que toca un ddNTP. Es importante destacar que cada ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP) tiene un marcaje fluorescente, por convención se ha decidido que la A será indicada con fluorescencia que se detecta en la longitud de onda que corresponde al verde, la C con azul, la G con negro y la T con rojo. A continuación se separan los fragmentos de DNA en una electroforesis capilar y finalmente

un escáner de láser detecta los fluoróforos incorporados en los fragmentos separados. Este método presenta algunas limitaciones, por ejemplo, dependiendo de la cantidad de bases que se requieren secuenciar puede resultar más tardado y costoso; sin embargo, tiene una alta precisión y fiabilidad (Deng et al., 2015; Gomes & Korf, 2018).

Planteamiento del problema

Uno de los objetivos dentro del campo de la genética forense es realizar identificaciones humanas a través del análisis de marcadores genéticos (Amorim et al., 2019). El perfil genético de un individuo es la descripción de caracteres de un grupo de loci genómicos. De acuerdo con recomendaciones internacionales acerca de construcciones de bases de datos genéticas como el CODIS (por las siglas en inglés de Combined DNA Index System, sistema de índice combinado de DNA en español) y el STDNAAP (por las siglas en inglés de Standardization of DNA Profiling Techniques in the European Union, estandarización de técnicas de perfilación de la Unión Europea), los perfiles genéticos se deben obtener de los STRs debido a que son secuencias con un alto grado de polimorfismo (Criminal Justice Information Services, 2017) (Andersen et al., 1996).

Sin embargo, en muchos contextos forenses no se encuentra material suficiente para obtener perfiles genéticos de STRs que permitan hacer una comparación con muestras de referencia. Esto es debido a que, como consecuencia del proceso de descomposición cadavérica, el tejido se daña y el DNA se fragmenta y se degrada. De esta forma, la aproximación que puede permitir determinar una probable identificación a través del estudio de relaciones de parentesco es la secuenciación del DNA mitocondrial (mtDNA), que si bien no permite determinar la identidad de un individuo, sí permite comparar el linaje materno en un grupo de personas (Amorim, et al., 2019). Otra ventaja es que es posible obtener secuencias de mtDNA en muestras biológicas provenientes de huesos, dientes y cabello, evidencias encontradas con mayor frecuencia, lo cual le confiere una ventaja en el ámbito forense (Parsons & Coble, 2001). La mayor virtud de analizar el DNA mitocondrial en casos forenses es que, aunque cada organelo contiene una o pocas moléculas de este genoma, dentro de cada célula humana existen cientos de mitocondrias. Dicha característica proporciona mayor probabilidad de que, a diferencia del DNA nuclear, el DNA mitocondrial se pueda extraer en mejores condiciones de integridad y abundancia. Además, como se mencionó previamente, el DNA mitocondrial se hereda únicamente por vía materna, por lo que se puede incluir como referencia a familiares que compartan el mismo linaje materno (Amorim et al., 2019).

Justificación

Actualmente, México está enfrentando una de las mayores crisis humanitarias a nivel internacional. A inicios del año 2023 tuve la oportunidad de realizar mi servicio social en la Comisión Nacional de Búsqueda y la situación es clara, hay muchas cosas por hacer, mucha gente con la voluntad y la imperativa necesidad de cambiar un poco aunque sea el panorama actual en el que vivimos; sin embargo, también hay pocos recursos. Es necesario hablar de un Estado que ejerce el monopolio de la violencia de forma fallida y que además, no tiene la capacidad de realizar las más de 110,000 investigaciones en busca de personas desaparecidas que hay hasta la fecha.

De acuerdo con el subsecretario de Derechos Humanos, Alejandro Encinas Nájera, “México se ha convertido en una enorme fosa clandestina” (Nájar, 2019; Zavala, 2019).

En Latinoamérica, la desaparición sistemática de personas ha estado asociada a las dictaduras militares de la extrema derecha, sin embargo, el caso de México es diferente, existió una política de exterminio, pero fue una estrategia contra la insurgencia bastante ambigua y las cifras oficiales aún esconden una enorme cifra negra.

Posteriormente, hubo un incremento notable de personas desaparecidas a partir del año 2006, cuando el presidente en turno, Felipe Calderón Hinojosa, declaró la guerra contra el narcotráfico (Nájar, 2019). Durante el gobierno de Felipe Calderón desaparecieron seis personas al día, de las que el 60% eran hombres (Campa, 2018). Más tarde, en 2013 volvió a haber un incremento en el gobierno de Enrique Peña Nieto y en 2014 desaparecieron 13 al día y uno de cada 10 desaparecidos era un niño de entre 0 y 4 años (Campa, 2018).

De acuerdo con el Registro Nacional de Personas Desaparecidas y no Localizadas (Comisión Nacional de Búsqueda, 2023), se estima que en 2023 son más de 110,000 personas desaparecidas y según datos recopilados por el “Movimiento por nuestros desaparecidos en México”, más de 50,000 cuerpos sin identificar (Movimiento por nuestros desaparecidos en México, 2020). ¿Quiénes son las personas que buscan a los desaparecidos? Si bien hay cada vez más hombres (principalmente padres de familia) involucrados, quienes encabezan y lideran los procesos de búsqueda en colectivos y grupos de búsqueda son sobre todo mujeres, madres que buscan a sus hijxs desaparecidxs, a este fenómeno se le ha denominado *feminización de la búsqueda* (Carrasco, 2021). Por esto, es urgente contar con protocolos que

permitan hacer planes de búsqueda y con protocolos interdisciplinarios que, de forma eficiente, ayuden a generar fichas de identificación homologadas en toda la república.

Una ficha de identificación debe contener el perfil genético del individuo y este último debe ser comparable con las muestras de referencia que idealmente, deberían estar almacenadas en un banco de datos único.

En el presente trabajo, se desarrolló la primera parte de una propuesta de análisis de DNA para el caso de aquellas muestras complicadas y que se extraen ya degradadas. Actualmente existen propuestas de oligonucleótidos que permiten analizar el mtDNA. Sin embargo, los que existen pueden tener grandes limitaciones teniendo en cuenta la diversidad genética específica en México. En 2004 se publicaron los oligos propuestos y estudiados por AFDIL (Armed Forces DNA Identification Laboratory por sus siglas en inglés), la limitación de ese trabajo consiste en que no se considera información específica poblacional, es decir, que los cebadores fueron diseñados con base en la secuencia de referencia de Cambridge y sin tener en cuenta los polimorfismos de cada población. El primer trabajo en donde se analizaron las regiones hipervariables I y II de población amerindia en México, fue publicado en 2009 por Guardado-Estrada y colaboradores, en este estudio utilizaron 3 pares de oligonucleótidos para amplificar y secuenciar fragmentos de más de 1000 pares de bases. Si bien los oligonucleótidos propuestos pueden ser utilizados en población mexicana, no funcionarán si el DNA se encuentra degradado (fenómeno muy común en el área forense), solamente se encontrarán fragmentos de no más de 300 pb. En 2018 Young Lee y colaboradores, propusieron un set de *minicebadores* para analizar muestras forenses altamente degradadas, no obstante, los cebadores que proponen están en regiones polimórficas y podrían no alinearse efectivamente al secuenciar y/o amplificar los haplogrupos que abundan en México.

Antecedentes

A nivel internacional, se han hecho análisis de mtDNA para resolver distintas incógnitas a lo largo de la historia; por ejemplo el caso de la familia Romanov, que fue ejecutada como consecuencia de la Revolución Rusa en 1918 y cuyos restos fueron recuperados en 1991. No fue hasta 1998 que se llevaron a cabo comparaciones de DNA, desde STRs hasta análisis de YSTRs y de mtDNA y se confirmó la identidad de los integrantes de la familia imperial. Más tarde, en el año 2000 se utilizó el análisis de mtDNA para identificar un corazón almacenado en un recipiente con alcohol en 1795 que se presumía que pertenecía a Louis-Charles, hijo de Luis XVI y María Antonieta; las pruebas de mtDNA arrojaron una identificación positiva con respecto al linaje materno y confirmaron la identidad del pequeño.

Históricamente, América Latina ha sido azotada una y otra vez por numerosas experiencias de aniquilamiento en masa de población, particularmente durante la segunda mitad del siglo XX como consecuencia de la Doctrina de Seguridad Nacional en la que se proponía una “visión del conflicto centrada en el enemigo político interno” (Feierstein, 2009). Como consecuencia, miles de personas fueron víctimas de crueles violaciones a los derechos humanos, entre las que destacaron la tortura y la desaparición forzada. En países como Argentina, los militares desaparecieron a más de 30,000 personas (Chiaramoni, 2022) de todas las edades y cientos de bebés fueron secuestrados o nacieron mientras sus padres se encontraban en centros de detención. Es este el contexto de uno de los antecedentes más conmovedores de la genética forense con fines de identificación en América Latina, las Abuelas de la Plaza de Mayo. Se trata de una organización no gubernamental consolidada en 1977 durante la dictadura militar en Argentina que tuvo y tiene como objetivo localizar y devolver tanto a los nietos como a los bisnietos a quienes, como a sus padres, les vulneraron el derecho a la identidad (Abuelas de Plaza Mayo, 2013) -un derecho fundamental que establece que todo niño al nacer tiene derecho a saber el nombre de su familia, la fecha de su nacimiento y su nacionalidad (UNICEF, 2008)-. Juntas, las Abuelas de la Plaza de Mayo buscaron la ayuda de los científicos y así, en 1984 se utilizó por primera vez el “índice de abuelidad” y en 1987 se creó el Banco Nacional de Datos Genéticos que se “encarga de resolver la filiación de niñas y niños apropiados durante la dictadura” (Abuelas de Plaza Mayo, 2013). El “índice de abuelidad” fue una fórmula elaborada por Víctor Penchaszadeh (entre otros), cuya intención era establecer relaciones de parentesco, en esos años ya se

contaba con la tecnología necesaria para hacer pruebas de paternidad, sin embargo, en el caso de la necesidad social de la Argentina de esos años, hizo falta una generación para poder implementar las pruebas ya conocidas, por lo que fue necesario hacer modificaciones hasta conseguirlo. Más tarde, hubo otros científicos involucrados, como Mary-Claire King, que se ha dedicado principalmente a estudiar el cáncer de mama y que tiene un interés especial en la ciencia y los derechos humanos; ella participó en la elaboración de un protocolo de análisis de DNA mitocondrial que permitiera establecer las relaciones de parentesco entre las abuelas y los nietos sustraídos. Además, formó parte de las labores que se han hecho para dar con el paradero de las más de 13 mil personas desaparecidas en Yugoslavia. En 1992, Mary-Claire King junto con dos investigadores más, publicaron un artículo en el que describen la identificación de un individuo que había sido víctima de homicidio y que estuvo enterrado 10 meses, a través de la secuenciación de las regiones hipervariables 1 y 2 del DNA mitocondrial (Ginther et al., 1992).

En México existen pocos antecedentes del uso de mtDNA con fines de identificación. Uno de los más importantes fue la supuesta identificación de los restos de Lucio Cabañas, símbolo de la resistencia popular en el periodo de la Guerra Sucia. Fue un maestro egresado de la Escuela Normal Rural de Ayotzinapa y líder del movimiento estudiantil de las Juventudes del Partido Comunista. Durante la madrugada del 2 de diciembre de 1974 Lucio Cabañas fue torturado, asesinado y desaparecido durante un enfrentamiento contra las fuerzas armadas del Estado Mexicano. Pasaron 27 años para que por fin, sus restos fueran exhumados y presuntamente identificados, sin embargo, la realidad es que los análisis no fueron concluyentes (Comisión Nacional de Derechos Humanos, 2018; La Redacción, 2002).

Otro caso sumamente controversial que aún no ha sido completamente resuelto es la desaparición de los 43 jóvenes normalistas de Ayotzinapa. La noche del 26 de septiembre del 2014, en Iguala, Guerrero, un grupo de estudiantes de la Escuela Normal Rural Raúl Isidro Burgos intentaron “tomar” unos autobuses para poder ir a la Ciudad de México a la conmemoración de la matanza del 2 de octubre de 1968 a manos de Díaz Ordaz. A pesar de que era común que los estudiantes se organizaran y tomaran los autobuses, esta vez fue diferente; policías municipales abrieron fuego contra los estudiantes para evitar que se llevaran los camiones, el resultado de la respuesta estatal fueron 43 estudiantes

desaparecidos. Inmediatamente los familiares, víctimas secundarias de la desaparición, iniciaron el proceso de búsqueda de la verdad, pero las autoridades obstruyeron el proceso. Años de búsqueda después, se recuperaron alrededor de 180 fragmentos óseos en un basurero en Cocula, de los que sólo se pudieron analizar 16 en Innsbruck, Austria. Los primeros análisis que se pudieron hacer fueron de mtDNA, no obstante los resultados no fueron ni concluyentes ni individualizantes. Más tarde fue posible hacer análisis de DNA nuclear, se analizó un fragmento lumbar que tuvo un resultado que ofrecía 99.99% de certeza de que pertenecía a Jhosivani Guerrero de la Cruz (Castillo, 2021; Centro Prodh, 2023).

Así, dentro de la investigación forense, existen diversas situaciones en las que se debe de *echar mano* de las diferentes tecnologías descritas, de manera que, por ejemplo, a veces conviene más realizar un análisis con los SNPs más que con STRs, si los amplicones producto de la PCR son de menos de 100 pb, como en el caso de muestras de DNA degradado.

Objetivos

Objetivo general

Elaborar un protocolo que permita identificar los polimorfismos de un individuo perteneciente a la población mexicana, mediante un análisis de la región hipervariable I de la región control del DNA mitocondrial en muestras con distintos haplogrupos.

Objetivos particulares

- Realizar una extracción de DNA íntegro obtenida de sangre.
- Cuantificar la concentración de DNA obtenida.
- Diseñar un conjunto de cebadores que permitan la amplificación y secuenciación de la región HPV I de la región control del DNA mitocondrial de población mexicana y que los amplicones obtenidos sean de máximo 300 pb.
- Evaluación de la reacción en cadena de la polimerasa y del proceso de secuenciación, utilizando los cebadores diseñados.
- Confirmar la eficacia de los cebadores propuestos mediante la prueba en muestras previamente analizadas con haplogrupos conocidos.
- Hacer un ensayo utilizando la metodología propuesta en muestras intencionalmente degradadas.
- Llevar a cabo la búsqueda de los polimorfismos en EMPOP para identificar los haplogrupos mitocondriales.

Materiales y métodos

A continuación se presenta un diagrama con el flujo de trabajo que se siguió en general (figura 4).

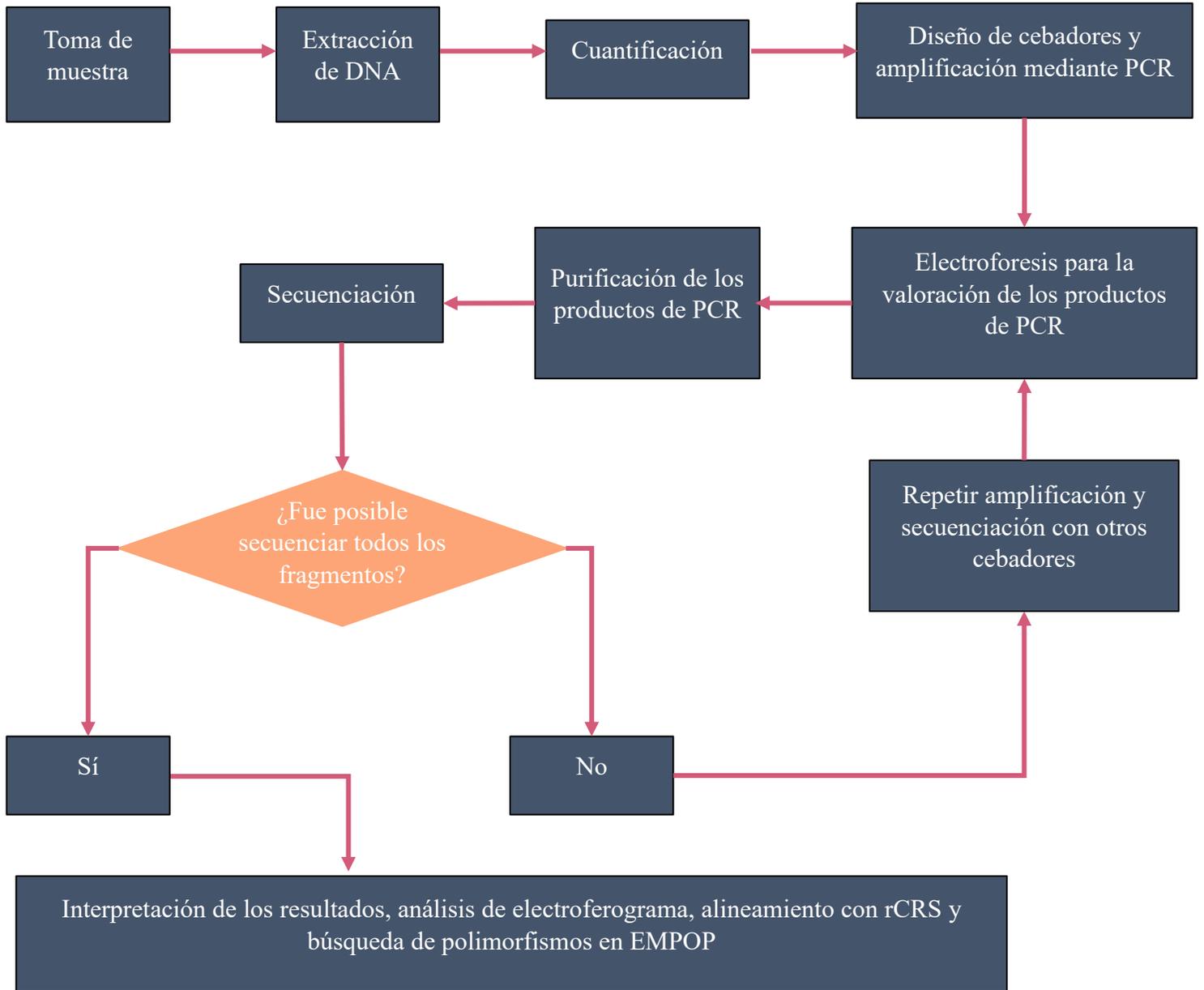


Figura 4. Diagrama del flujo de trabajo seguido en este proyecto.

El Laboratorio de genética Forense de la ENaCiF cuenta con distintas áreas para poder llevar a cabo cada parte del proceso. Las áreas se denominan de la siguiente forma:

Toma de muestra: en esta área se llevan a cabo extracciones de sangre y de saliva principalmente.

Extracción de DNA: Este sitio es únicamente para realizar extracciones y de acuerdo con los protocolos del laboratorio, está prohibido ingresar ahí con reactivos y/o productos de PCR.

Electroforesis: Es un cuarto pequeño y oscuro en donde se encuentra la fuente de poder, las cámaras y la computadora con el transiluminador marca ENDURO.

PCR: Consiste en una habitación con una cabina para preparar la solución maestra que se utiliza en la PCR; con el objetivo de evitar contaminación y de acuerdo con los protocolos de uso en el laboratorio, está prohibido meter DNA dentro de la cabina, además la cabina debe ser limpiada con cloro y etanol y posteriormente debe ser sometida a un baño de luz UV.

PCR 2: En esta habitación se encuentran los termocicladores.

PCR 3: En esta habitación se llevan a cabo las reacciones de secuenciación.

Cabe destacar que además de que se trabajó en las áreas asignadas para cada procedimiento, durante la realización de toda la parte experimental de este proyecto se utilizó bata, guantes de nitrilo y cubrebocas, utilizando un par de guantes nuevos en cada proceso.

Toma de muestra y extracción de DNA en sangre con la técnica de fenol-cloroformo (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)

Si bien, la técnica de fenol-cloroformo tiene bajo rendimiento en comparación con otras técnicas de extracción, se optó por esta técnica teniendo en cuenta que es la técnica estandarizada en el Laboratorio de Genética Forense de la ENaCiF. Si bien, en un contexto forense es muy difícil encontrar tanta sangre en condiciones óptimas, con el objetivo de probar si el conjunto de cebadores funcionaba se optó por utilizar DNA íntegro extraído de sangre.

1. Se recolectaron muestras de sangre de un solo sujeto, en tubos con EDTA (tubos BD Vacutainer con EDTA K₂) (figura 5), en el Laboratorio de Genética Forense de la ENaCiF, UNAM.

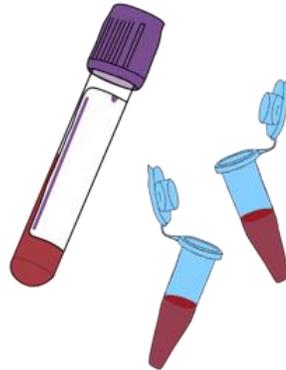


Figura 5. Sangre en tubo con EDTA

2. La muestra de sangre se dividió en tubos de 2 mL, cada tubo con 1 mL de sangre.
3. Se adicionó un volumen de amortiguador de lisis de eritrocitos RBCL (Red Blood Cells Lysis por sus siglas en inglés) (figura 6).

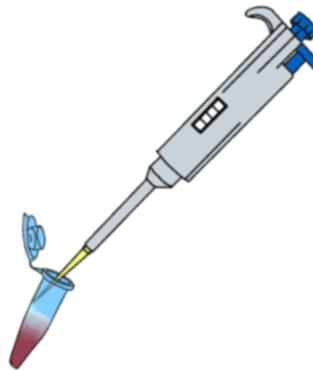


Figura 6. Adición de amortiguador

4. Se homogeneizó el contenido de los tubos en el vórtex (3-5 pulsos) (figura 7).

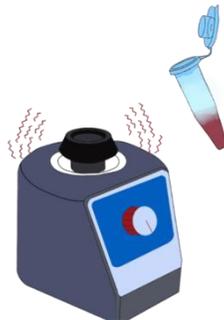


Figura 7. Agitación en vórtex

5. Se centrifugó a 3,500 rpm, a temperatura ambiente durante 15 minutos (figura 8).



Figura 8. Centrifugado

6. Se decantó el sobrenadante (figura 9).

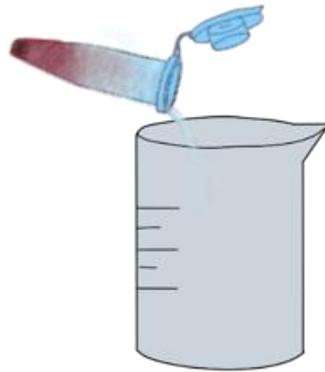


Figura 9. Decantación del sobrenadante

7. Se lavó con 1 mL de amortiguador de lisis de eritrocitos.
8. Se homogeneizó el contenido de los tubos en el vórtex (3-5 pulsos).
9. Se centrifugó a 3,500 rpm, a temperatura ambiente durante 15 minutos.
10. Se decantó el sobrenadante.
11. Se añadieron 490 μ L de amortiguador de lisis (STET) y 10 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y se homogeneizó la solución en el vórtex (3-5 pulsos).
12. Se incubó la solución durante 20 minutos en agitación continua a 55 °C (figura 10).

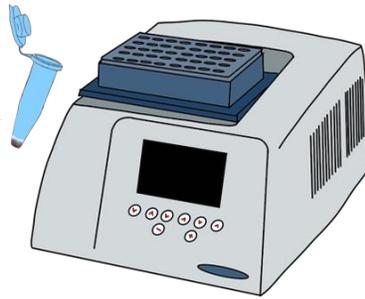


Figura 10. Incubación de las muestras en presencia de proteinasa K.

13. En la campana de extracción, se agregaron 500 μ L de una mezcla de fenol/cloroformo/isoamílico 25:24:1 (figura 11) y se agitó el tubo por inversión de manera vigorosa.



Figura 11. Adición de fenol/cloroformo/isoamílico 25:24:1

14. Se centrifugó el tubo a 2500 rpm durante 2 minutos, a temperatura ambiente y se verificó que se hayan formado dos fases en el lisado.
15. En la campana de extracción, se transfirió únicamente la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo de 1.5 mL.
16. Se añadió de nuevo un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico, se agitó por inversión de manera vigorosa.
17. Se centrifugó el tubo a 2500 rpm durante 2 minutos, a temperatura ambiente y se verificó que se hayan formado dos fases en el lisado.

18. En la campana de extracción, se transfirió únicamente la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo de 1.5 mL (figura 12).

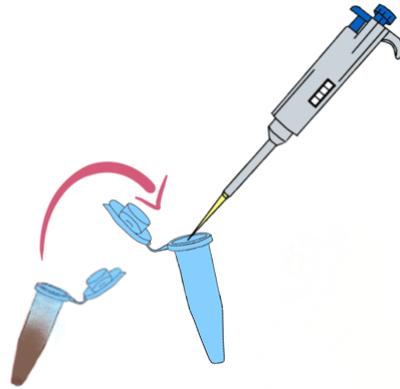


Figura 12. Extracción y transferencia de la fase acuosa a un tubo nuevo

19. Se añadió un volumen de etanol absoluto y 20 μ L de NaCl 5 M (figura 13) y posteriormente se agitó el tubo de manera suave por inversión hasta que se formara una pastilla de DNA precipitado.



Figura 13. Precipitación del DNA, posterior a la adición de etanol y NaCl 5M

20. Se centrifugó a velocidad máxima a temperatura ambiente durante un minuto, y se decantó el sobrenadante.
21. Se añadieron 500 μ L de etanol al 80% y se agitó por inversión.
22. Se centrifugó a velocidad máxima a temperatura ambiente durante un minuto y se decantó de nuevo el sobrenadante.

23. Se removió cuidadosamente el resto del sobrenadante y se liofilizó en un concentrador *Vacuifuge* plus marca Eppendorf, durante 30 minutos, a 45 °C, en condiciones de vacío.
24. Se resuspendió la pastilla de DNA con 100 µL de agua grado biología molecular (figura 14).



Figura 14.
Resuspensión del DNA

Cuantificación del DNA (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)

Para llevar a cabo la cuantificación se utilizó un fluorómetro de la marca Promega *QuantusTM fluorometer*.

Se siguieron las instrucciones del fabricante de acuerdo al protocolo del equipo.

Diseño de los cebadores

Para diseñar los cebadores fue necesario seguir algunos estándares que se describen a continuación (Chuang et al., 2013):

1. La secuencia debe estar conformada por entre 16 y 28 nucleótidos, aunque, por ejemplo, en la página de *Thermo Fisher Scientific* hay un apartado de *Primer design tools* en el que refieren que pueden ser hasta 30 nucleótidos.
2. El contenido de G y C debe de encontrarse en un rango de entre 40 y 60%; esto está directamente relacionado con lo siguiente.
3. La temperatura de alineamiento debe encontrarse entre 50 y 62 °C y esta se calcula de la siguiente forma: $T_m=4(G+C)+2(A+T)$.
4. La composición en el extremo 3' preferentemente debe tener G o C debido a que son bases con uniones más termoestables que A y T.

5. Se debe de evitar diseñar cebadores que puedan alinearse el uno con el otro para no obtener como resultado dímeros de cebadores.
6. No diseñar cebadores que puedan unirse a sí mismos, cuando un cebador se autohibrida, se forma una estructura que se denomina horquilla.
7. Finalmente, es necesario revisar la especificidad de los cebadores con el objetivo de evitar que se alineen en lugares no deseados. Existen programas como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, en el sitio del National Center for Biotechnology Information, NCBI por sus siglas en inglés) que permiten hacer una búsqueda de regiones similares entre las secuencias descritas y almacenadas en la base de datos.

Aunado a lo anterior, para diseñar cebadores degenerados es importante tener en cuenta lo siguiente:

1. Se debe evitar que en el extremo 3' del *cebador* haya degeneraciones.
2. Para diseñarlos se debe tomar en cuenta la nomenclatura de la IUPAC que establece los códigos descritos en la tabla 2:

Tabla 2. Iniciales establecidas por la IUPAC

Símbolo	Qué representa
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo
R	A ó G (purina)
Y	C ó T (pirimidina)
M	A ó C
K	G ó T/U

S	C ó G (enlace fuerte)
W	A ó T/U (enlace débil)
H	Todos menos G
B	Todos menos A
V	Todos menos T/U
D	Todos menos C
N	A, C, G ó T

Elaborada con información obtenida de Johnson, 2010.

Las bases degeneradas en los cebadores fueron descritas de acuerdo con la nomenclatura establecida por la IUPAC que es también utilizada en la página del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con el objetivo de solicitarlos a dicha institución. De acuerdo con esa nomenclatura se debe entender lo siguiente:

R: Purina (A ó G)

Y: Pirimidina (C ó T)

Para diseñar los cebadores para población mexicana, se consideraron los haplogrupos y los polimorfismos reportados por Guardado-Estrada et al., 2009 y se registraron en un documento de Excel que se puede encontrar en el anexo 1; el diseño se realizó manualmente, no se utilizó ningún tipo de software.

Una vez diseñados los cebadores, para la estandarización del ensayo de la PCR, se utilizaron los reactivos que se muestran en la tabla 3 (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas).

Tabla 3. Reactivos y las concentraciones deseadas para la amplificación de la HVR I.

V _f de la reacción: 25 µL			
Reactivo	[] Solución madre	[] 1x	Vol. x1
dNTP's	2000 µM	200 µM	2.5 µL

Amortiguador	10x	1x	2.5 μ L
MgCl₂	50 mM	2mM	1 μ L
Taq. Polimerasa	1 U/ μ L	0.1 U	0.1 μ L
Cebador forward	10 μ M	1 μ M	2 μ L
Cebador reverse	10 μ M	1 μ M	2 μ L
H₂O	-	-	12.9 μ L
DNA	0.5 ng/ μ L	1 ng	2 μ L

Para cada par de cebadores se llevó a cabo una estimación de la temperatura adecuada para el alineamiento, considerando la T_m más alta y la más baja, teniendo en cuenta las condiciones listadas en la tabla 4:

Tabla 4. Condiciones de la PCR para la curva de los juegos 1, 2 y 3 de cebadores

		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		94	2 minutos
30 ciclos	Desnaturalización	94	15 segundos
	Alineamiento	60/64.6*	30 segundos
	Elongación	72	15 segundos
Elongación final		72	7 minutos
-		4	∞

Con el objetivo de corroborar el buen funcionamiento de los cebadores, se trabajaron 3 muestras pertenecientes a tres haplogrupos diferentes con el objetivo de evaluar los cebadores en secuencias con distintos polimorfismos, todas las muestras analizadas fueron DNA íntegro extraído de sangre. (tabla 5). Los haplogrupos analizados fueron elegidos de acuerdo con los que se tenían previamente almacenados y analizados en el Laboratorio de Genética de la ENaCiF y que fueron utilizados en el proyecto de Vázquez (2022). Dos de los haplogrupos seleccionados, coinciden con dos de tres de los haplogrupos más comunes

reportados en la población mexicana que son A1, B2 y C1 (Bodner et al., 2021a; Guardado-Estrada et al., 2009). No se especifican criterios de inclusión o exclusión para este proyecto.

Tabla 5. Haplogrupos analizados

Muestra	Obtención y análisis	Haplogrupo
DNA _x	Este trabajo.	Se abordará más adelante en resultados.
LCF-10	Obtenida por Guardado-Estrada, M., analizada y secuenciada por Vázquez, S. en su proyecto de titulación (Vázquez, 2022).	A2
LCF-37	Obtenida y analizada por Guardado-Estrada y colaboradores.	H2

Electroforesis en gel de agarosa al 2% (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)

Con el fin verificar el resultado de la amplificación, se prepararon 50 mL de un gel utilizando 1 g de agarosa y 50 mL de amortiguador TBE 0.5X. Las muestras se prepararon añadiendo 2 µL de amortiguador de carga previamente mezclado con *gel red* y 3 µL de muestra; una vez que se observaba una solución homogénea se procedió a cargar 3 µL en cada pozo y 2 µL de un marcador de peso molecular de 1 Kpb (HyperLadder).

El gel se sometió a electroforesis durante 50 minutos a 120 V y 500 A.

Purificación de los productos de PCR (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)

Para purificar los productos de PCR, se llevó a cabo el siguiente protocolo, estandarizado previamente en el Laboratorio de Genética Forense de la ENaCiF:

1. En un tubo de 600 µL colocar 1 µL de la enzima Exo-SapIT y 2.5 µL del producto obtenido de la PCR (Esta reacción se llevó a cabo a ½, de acuerdo con lo estandarizado por el fabricante).

2. Incubar durante 15 minutos a 37 °C para activar a la enzima y degradar productos de PCR inespecíficos, así como restos de dNTPs.
3. Incubar 15 minutos a 80 °C para inactivar a la enzima.
4. Almacenar en hielo.

Reacción de secuenciación (ver anexo 1 con tabla de reactivos, equipos y guías utilizadas)

Se llevó a cabo el siguiente protocolo, estandarizado previamente en el Laboratorio de Genética Forense de la ENaCiF:

1. Agitar en vórtex los tubos con 2 a 3 pulsaciones y centrifugar para colectar el contenido en el fondo.
2. En un tubo para PCR añadir los siguientes reactivos:

2 µL de BigDye

1 µL de cebador (forward o reverse)

2 µL de DNA molde previamente purificado con ExoSapIT

Esta reacción se llevó a cabo a ¼ de acuerdo con estandarizaciones previas realizadas en el Laboratorio de Genética Forense de la ENaCiF.

3. Colocar los tubos en el termociclador teniendo en cuenta las condiciones descritas en la tabla 6:

Tabla 6. Condiciones para llevar a cabo la reacción de secuenciación

		Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		96	2 minutos
25 ciclos	Desnaturalización	96	15 segundos
	Alineamiento	50	5 segundos
	Elongación	60	15 segundos
-		4	∞

Purificación en columnas

Se utilizaron columnas CENTRI-SEP (Princeton Separations, E.U.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Añadir a la columna 800 μL de agua grado biología molecular y agitar en vórtex con el objetivo de mezclar y deshacer las burbujas que se hayan formado y dejar reposar al menos 30 minutos.
2. Colocar en un tubo colector y centrifugar durante 2 minutos a 2800 rpm a una temperatura de 4 °C con la pestaña del tubo hacia afuera, teniendo en cuenta la inclinación final de la resina, esto con el objetivo de quitar el agua restante.
3. Reconstituir el volumen final de los productos de la secuenciación a 20 μL , es decir, es necesario añadir 15 μL de agua grado biología molecular.
4. Colocar la columna en un tubo de 1.5 μL y añadir en la columna los 20 μL finales a la resina, procurando hacerlo en el centro y cuidando que la punta de la micropipeta no haga contacto con la resina.
5. Centrifugar 2 minutos a 2800 rpm a 4 °C.
6. Secar las muestras en centrífuga de vacío durante 40 minutos.

Finalmente, las muestras fueron llevadas al Instituto de Ciencias Forenses de la Ciudad de México donde se llevó a cabo la secuenciación por el método de Sanger, con un analizador genético de la serie 3500 de Applied Biosystems, Thermo Scientific, con arreglo de 8 capilares y POP-7. Las muestras fueron analizadas con el software Data Collection Version 3.1. y posteriormente fueron leídas en BioEdit, que es un programa que permite leer los electroferogramas y hacer alineamientos de secuencias para identificar los polimorfismos.

Búsqueda de los polimorfismos en EMPOP

Se ingresó al siguiente enlace: <https://empop.online/> (Parson et al., 2014). Para utilizar EMPOP, es necesario registrarse y crear un usuario.

A continuación, se da click en la pestaña QUERY y se llena el formulario con la información solicitada

Sample id: Permite nombrar la muestra cuyos polimorfismos serán buscados.

Ranges: Se deben describir los rangos de posiciones entre los cuales se buscan los polimorfismos.

Profile: En esta sección se vacían los polimorfismos encontrados empezando por la posición y después el nucleótido que varía.

Finalmente, la herramienta muestra como resultado el número de coincidencias en la base de datos, el número de coincidencias ordenadas por origen geográfico y el número de coincidencias por afiliación a metapoblaciones.

Resultados y discusión

Extracción de DNA

Para la elaboración del presente trabajo, se usó DNA genómico extraído de sangre. Se hizo una mezcla de las muestras contenidas en los cuatro tubos diferentes procesados a la vez.

Cuantificación del DNA

Posteriormente, se cuantificó la concentración de la mezcla y se obtuvo el siguiente valor: 19 ng/ μ L.

Se llevó a cabo una dilución con el fin de tener una concentración de 0.5 ng/ μ L y así, poder llevar a cabo la PCR con 2 μ L que correspondieran a 1 ng de DNA total.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados se describen en la tabla 7, fueron diseñados de acuerdo con los polimorfismos identificados por en un estudio que incluye a 270 individuos nacidos en el centro de México (Guardado-Estrada et al., 2009):

Tabla 7. Cebadores utilizados para la elaboración del proyecto

Juego	Nombre	Posiciones	Tm	Tamaño del amplicón	Secuencia	Forward/Reverse
1	F16000	16000-16023	59.5/ 60°C	115 pb	5'(GATTCTAATTTAAACTATTCTCTG)3'	F
	R16118	16118-16096	65.1/ 66°C		5'(CATGGTGRCTGGCARTAAATGTAC)3'	R
2	F16053	16053-16073	64.9/ 62°C	159 pb	5'(CACCCAAGTATTGACTYACCC)3'	F
	R16212	16212-16193	54/ 59.7°C		5'(TGTACTTG YTTGTAAGCATG)3'	R
3	F16193	16193-16212	54/ 59.7°C	221 pb	5'(CATGCTTACAARCAAGTACA)3'	F
	H-16410*	16414-16395	64°C		5'(CACGGAGGATGGTGGTCAAG)3'	R
4	F16096	16096-16116	60/ 64.8°C	164 pb	5'(GTACATTACTGCCAGYCACC)3'	F
	R16260	16260-16240	60/ 64.8°C		5'(GGTRGCTTTGGAGTTGCAGT)3'	R
5	F16150	16150-16172	58/ 60.4°C	172 pb	5'(CCTRTAGTACATAAAAACCCAA)3'	F
	R16322	16322-16300	58/ 60.4°C		5'(TGGYTTTATGTRCTATG TACTG)3'	R

*Todos los cebadores fueron diseñados para este trabajo, a excepción del señalado que fue recuperado de los utilizados por Guardado-Estrada et al., 2009. Se consideraron dos temperaturas para cada cebador.

R: Purina (A ó G)

Y: Pirimidina (C ó T)

A continuación se presenta un mapa (figura 15) de las regiones abarcadas dentro de la región control del mtDNA.

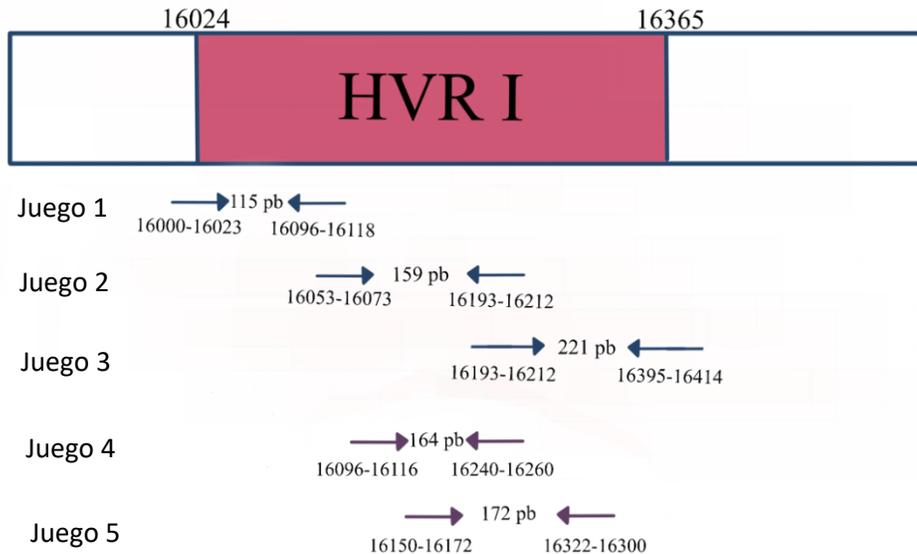


Figura 15. Mapeo de los cebadores en la región hipervariable I.

Prueba de temperatura

Se realizó una PCR con la temperatura máxima y mínima para el alineamiento de los cebadores con DNA genómico íntegro extraído en el laboratorio, considerando la temperatura mínima y máxima óptima para el alineamiento y se observaron los resultados en una electroforesis en gel de agarosa. Las imágenes se muestran en las figuras 16, 17 y 18:

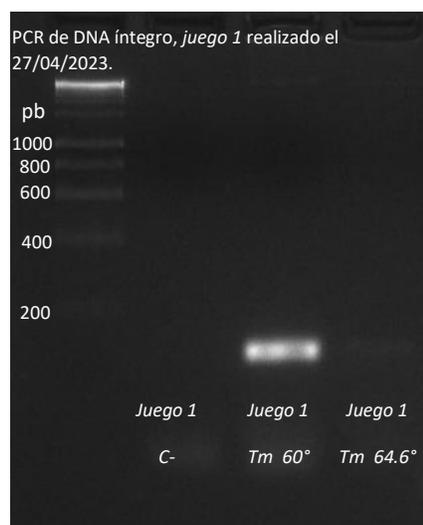


Figura 16. PCR de DNA íntegro; prueba de temperatura para establecer la temperatura de alineamiento.

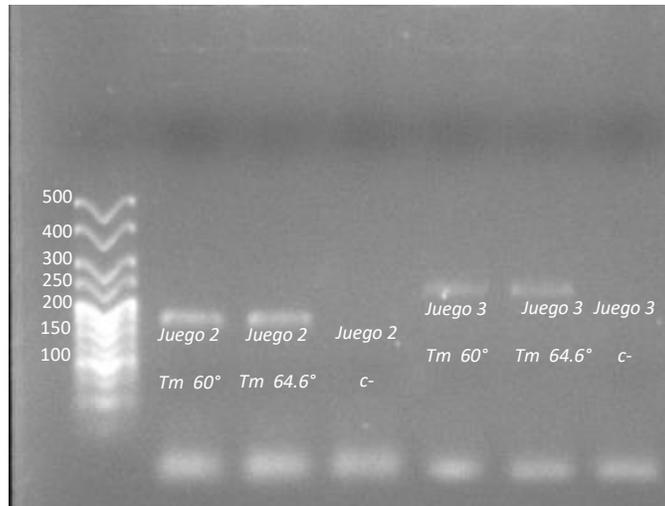


Figura 17. PCR de la muestra DNAX; prueba de temperatura para establecer la temperatura de alineamiento. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular

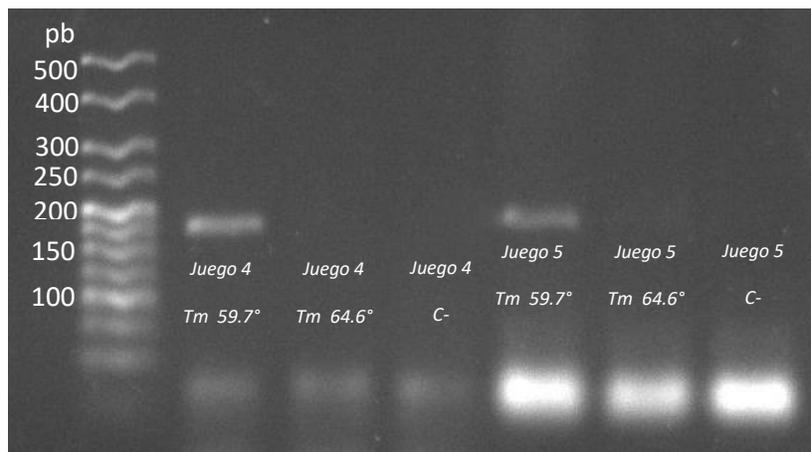


Figura 18. PCR de DNA íntegro; prueba de temperatura para establecer la temperatura de alineamiento.

Teniendo en cuenta la intensidad de las bandas obtenidas, se determinó que para todos los cebadores, la temperatura óptima de alineamiento es de 60 °C.

A continuación se procedió a amplificar otras dos muestras con los 3 pares de cebadores, en las figuras 19 y 20 se observan los resultados de las PCRs en una electroforesis.

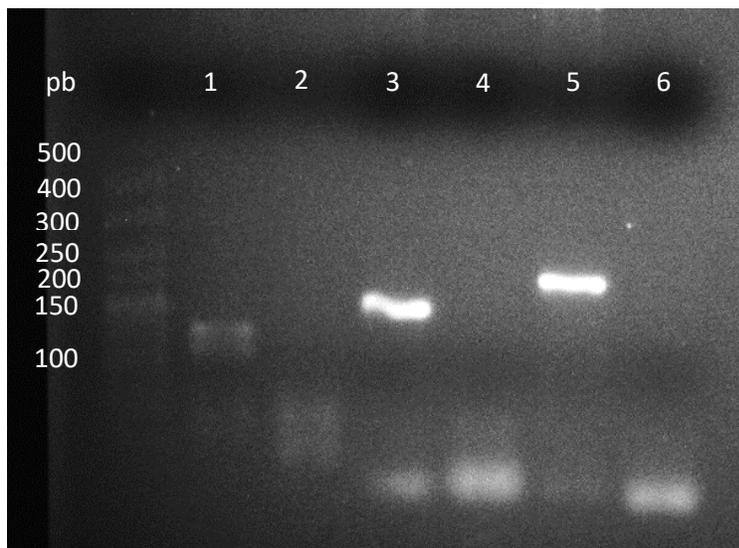


Figura 19. Amplificación de la muestra LCF 10 utilizando los tres juegos de cebadores diseñados. 1. LCF 10 juego 1, 2. LCF 10 juego 1 c-, 3. LCF 10 juego 2, 4. LCF 10 juego 2 c-, 5. LCF 10 juego 3, 6. LCF 10 juego 3 c-

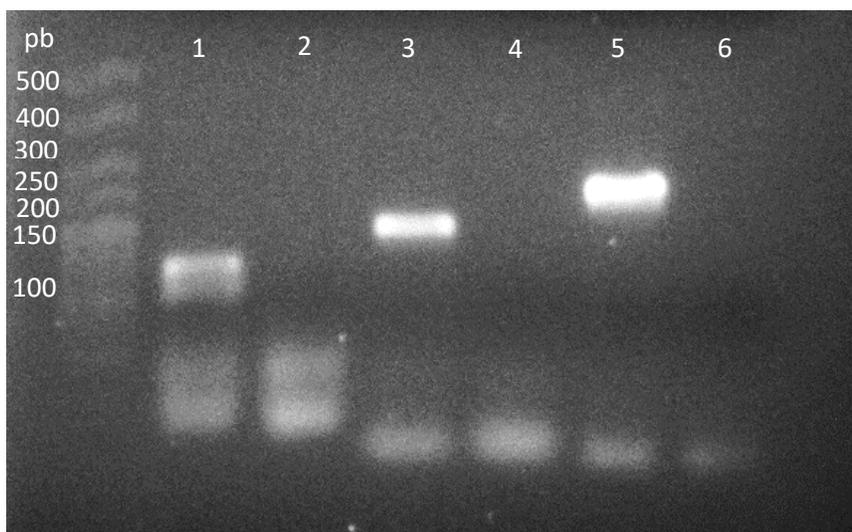


Figura 20. Amplificación de la muestra LCF 37 utilizando los tres juegos de cebadores diseñados. 1. LCF 37 juego 1, 2. LCF 37 juego 1 c-, 3. LCF 37 juego 2, 4. LCF 37 juego 2 c-, 5. LCF 37 juego 3, 6. LCF 37 juego 3 c-

Secuenciación

Se llevó a cabo la secuenciación por cada par de cebadores de las tres muestras con diferentes haplogrupos y se obtuvieron los siguientes resultados:

DNA_x

Para poder hacer la secuenciación de la muestra DNA_x, se requirió el diseño de nuevos cebadores (F16096, R16260, F16150 y R16322). La necesidad surgió teniendo en cuenta que los cebadores R16212 y F16193 coincidían con una región de poli C's comúnmente encontrada en el haplogrupo B2 y según la información consultada en la literatura (Ballard et al., 2020), en la técnica de secuenciación de Sanger las regiones que contienen repeticiones de nucleótidos así, representan una limitante significativa debido a la pérdida de señal. El diseño y la implementación de los nuevos cebadores permitió superar dicha limitación y facilitó la obtención de la información deseada. En el anexo 2 se puede observar una tabla de Excel en la que se fueron registrando las secuencias obtenidas de esta muestra.

En las figuras 21, 22 y 23 se señalan los polimorfismos encontrados en tres amplicones de la región hipervariable I en un recuadro color rosa y en la tabla 8 se presenta un registro de los 5 polimorfismos encontrados.

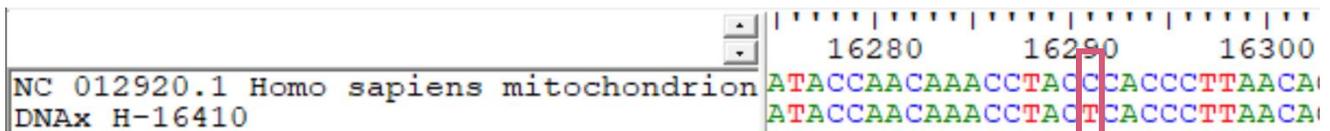


Figura 22. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra DNA_x, utilizando el cebador H-16410; de color rosa se señalan los SNP's encontrados.

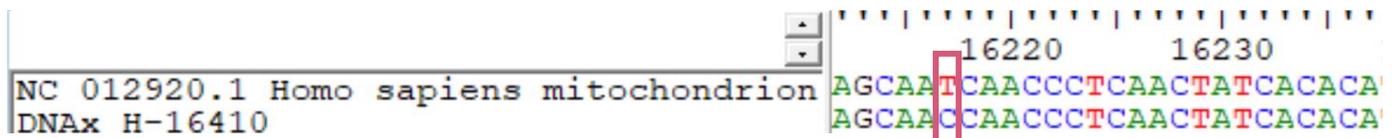


Figura 21. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra DNA_x, utilizando el cebador H-16410; de color rosa se señalan los SNP's encontrados.

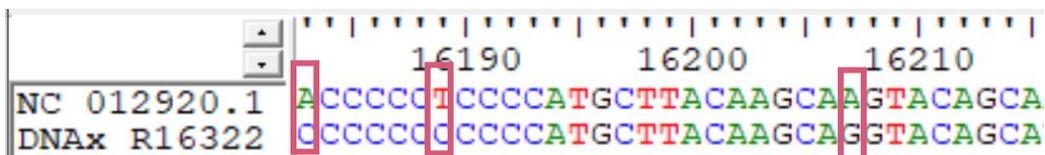


Figura 23. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra DNAX, utilizando el cebador F16322; de color rosa se señalan los SNP's encontrados.

Tabla 8. Resumen de los polimorfismos encontrados en la muestra DNAX

Posición	Polimorfismo
16183	C
16189	C
16207	G
16217	C
16291	T

Con la información recopilada y de acuerdo con lo que se observa en la figura 11, es posible inferir que el individuo en cuestión pertenece al haplogrupo B2 (figura 24).

Haplogrouping

Rank 1: MRCA: **B2i2a1** 0.00

Source	Haplogroup	Range	Diagnostic Mutations	Cost	Transcript	Missing Mutations	Extra Mutations
PT17	B2i2a1	16024-16365	16182M 16183M 16189C 16207G 16217C 16291T	0.00	[M16182A(0.000)] [M16183C(0.000)]	(none)	(none)

Figura 24. Captura de pantalla del resultado de realizar la búsqueda de los polimorfismos de la muestra DNAX en EMPOP.

Antes de llevar a cabo este proyecto, se secuenciaron las regiones hipervariables I y II de una muestra de referencia. Al comparar ambas secuencias se obtuvo una coincidencia

exacta. Esta concordancia se ve respaldada por la comparación de los polimorfismos encontrados en la base de datos de EMPOP y la revisión de diversos estudios, entre ellos los de Guardado-Estrada et al. (2009, 2012), Parson et al. (2004), Wood et al. (2019), y Vázquez, S. (2022) que respaldan la asignación del haplogrupo B2 a través de los polimorfismos identificados (Guardado-Estrada et al., 2009, 2012; Parson et al., 2004; Vázquez, 2022; Wood et al., 2019).

LCF-10

En las figuras 25, 26, 27, 28 y 29 se señalan todos los polimorfismos de la región hipervariable I de la muestra LCF-10 en un recuadro color rosa y en la tabla 9 se presenta un registro de los 6 polimorfismos encontrados.

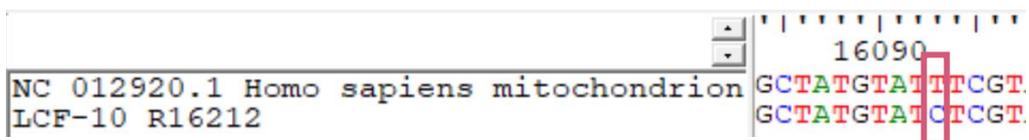


Figura 25. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-10, utilizando el cebador R16212; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

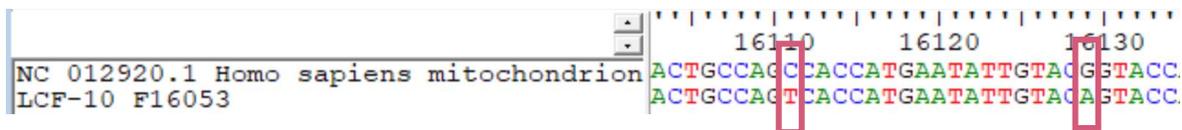


Figura 26. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-10, utilizando el cebador F16053; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

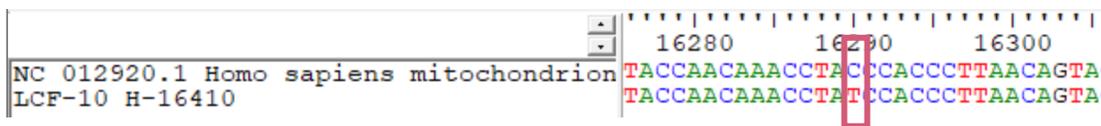


Figura 27. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-10, utilizando el cebador H-16410; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

```

NC 012920.1 Homo sapiens mitochondrion TACATAAAGCCATTTACCGTACA
LCF-10 F16193 TACATAAAGCCATTTACCGTACA

```

Figura 28. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-10, utilizando el cebador F16193; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

```

NC 012920.1 Homo sapiens mitochondrion CCTTCTCCATCCCCATGGATG
LCF-10 F16193 CCTTCTCCATCCCCATGGATG

```

Figura 29. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-10, utilizando el cebador F16193; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

Tabla 9. Resumen de los polimorfismos encontrados en la muestra LCF-10

Posición	Polimorfismo
16093	C
16111	T
16129	A
16290	T
16319	A
16362	C

Una vez que se identificaron los polimorfismos, se procedió a realizar la búsqueda en EMPOP y el resultado se observa en la figura 30.

Haplogrouping

Rank 1: MRCA: **A2+(64)+16129** 1.15

Source	Haplogroup	Range	Diagnostic Mutations	Cost	Transcript	Missing Mutations	Extra Mutations
PT17	A2+(64)+16129	16024-16365	16111T 16129A 16192Y 16223T 16290T 16319A 16362C	1.15	T16093C(0.459) [Y16192C(0.000)] T16223C(0.695)	16223T	16093C

Figura 30. Captura de pantalla del resultado de realizar la búsqueda de los polimorfismos de la muestra LCF-10 en EMPOP.

Una vez que se buscaron los polimorfismos en EMPOP, es posible inferir que el individuo que proporcionó la muestra LCF-10 pertenece al haplogrupo A2 (figura 30) que, de acuerdo con la literatura consultada, es el haplogrupo más frecuente en población mexicana (Bodner et al., 2021b; Guardado-Estrada et al., 2009).

LCF-37

En las figuras 31, 32, 33 y 34 se señalan todos los polimorfismos de la región hipervariable I de la muestra LCF-37 en un recuadro color rosa y en la tabla 10 se presenta un registro de los 4 polimorfismos encontrados.

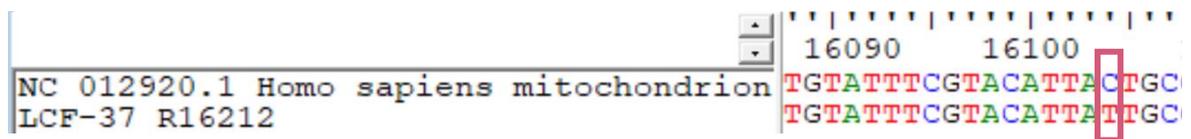


Figura 31. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-37, utilizando el cebador R16212; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

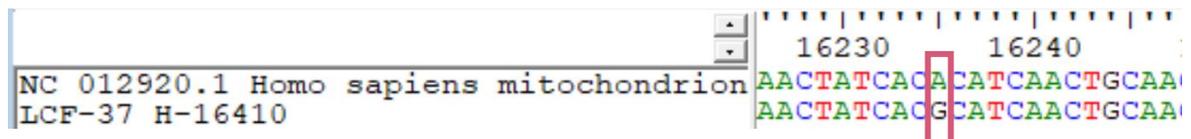


Figura 32. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-37, utilizando el cebador H-16410; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

NC 012920.1 Homo sapiens mitochondrion AACCTACCCACCCTTAACAG
 LCF-37 F16193 AACCTACTCACCCTTAACAG

Figura 33. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-37, utilizando el cebador F16193; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

NC 012920.1 Homo sapiens mitochondrion TCAAATCCCTTCTCGTCCCCA
 LCF-37 H-16410 TCAAATCCCTCCTCGTCCCCA

Figura 34. Alineamiento de la secuencia de referencia de Cambridge con la muestra LCF-37, utilizando el cebador H-16410; de color rosa se señalan los SNPs encontrados.

Tabla 10. Resumen de los polimorfismos encontrados en la muestra LCF-37

Posición	Polimorfismo
16104	T
16235	G
16291	T
16357	C

Haplogrouping

Rank 1: MRCA: **H2a2b** 1.65

Source	Haplogroup	Range	Diagnostic Mutations	Cost	Transcript	Missing Mutations	Extra Mutations
PT17	H2a2b	16024-16365	16235R 16291T	1.65	C16104T(0.833) [R16235G(0.000)] T16357C(0.813)	(none)	16104T 16357C

Figura 35. Captura de pantalla del resultado de realizar la búsqueda de los polimorfismos de la muestra LCF-37 en EMPOP.

Los polimorfismos encontrados en la muestra LCF-37 son consistentes con los polimorfismos asociados al haplogrupo H2 (figura 35); dicha caracterización se encuentra reportada por distintas fuentes bibliográficas en las que se menciona también que el

haplogrupo H es dominante en población caucásica, principalmente en Europa occidental (Brotherton et al., 2013; Grignani et al., 2006; Guardado-Estrada et al., 2009; Medeiros et al., 2008).

En este trabajo se reportó el diseño de cebadores específicos para la amplificación del mtDNA de la región hipervariable 1 del DNA mitocondrial. La metodología propuesta permite amplificar y secuenciar exitosamente desde 1 ng de DNA.

La información disponible sobre el DNA mitocondrial de población amerindia es escasa. En 2009 se recopilaron 5,140 genomas mitocondriales de GenBank utilizando la herramienta mtDNA-GeneSyn y se observó que las secuencias de población de Eurasia Occidental y Eurasia Oriental conforman el 80% de la base de datos, mientras que solo hay un 18% de población de África y 2% de otros lugares (Pereira et al., 2009). Por otro lado, en 2013 Ramos y colaboradores analizaron un total de 101 muestras provenientes de población del oeste de Europa y encontraron predominantemente individuos pertenecientes al haplogrupo H (Ramos et al., 2013).

En el 2020 se analizó el genoma mitocondrial de 1928 individuos de población japonesa y se encontró que las proporciones de los haplogrupos predominantes variaban en cada región, sin embargo eran casi los mismos, con presencia de los haplogrupos A, B, D, M y N (Yamamoto et al., 2020).

Hasta donde he podido explorar, en las bases de datos que existen no hay suficiente representación de la población amerindia, con la que se trabajó en el presente proyecto y por lo tanto hay pocos estudios en los que se reportan los polimorfismos y los haplogrupos asociados a esta región. Uno de ellos es el de Guardado-Estrada, en el que analizaron los polimorfismos de 270 individuos no relacionados, pertenecientes al centro de México y los haplogrupos más observados fueron A2, B2, C1 Y D1, lo que sugiere una presencia importante de ascendencia indígena.

En trabajos previos se propusieron un conjunto de mini cebadores para amplificar y secuenciar la HVR I de la región control de DNA mitocondrial (Eichmann & Parson, 2008; Gabriel et al., 2001). Sin embargo, los que fueron elaborados para este proyecto permiten amplificar y secuenciar la región hipervariable I teniendo en cuenta algunos de los

polimorfismos que se han reportado en población mestiza mexicana (Guardado-Estrada et al., 2009). Adicionalmente, estos cebadores presentan la ventaja de que permiten amplificar fragmentos de mtDNA pequeños, ya que el DNA mitocondrial en el contexto forense suele estar degradado, y con la metodología aquí propuesta se pueden amplificar fragmentos de < 300 pb.

En los reportes de investigaciones de genética forense con fines de identificación humana, no se suelen encontrar trabajos y/o propuestas metodológicas en las que se utilicen cebadores degenerados. Es probable que esto se deba a que una alta degeneración en los cebadores puede tener consecuencias como una baja especificidad –ya que se podrían amplificar secuencias no deseadas– y un bajo rendimiento en la PCR (Linhart & Shamir, 2005). Tomando en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo se utilizaron cebadores con un máximo de dos nucleótidos degenerados, resultando en un buen rendimiento durante la amplificación y una alta especificidad, ya que todas las secuencias, incluyendo las que tenían nucleótidos degenerados, fueron analizadas mediante alineamientos con el algoritmo de *Blast* y las secuencias recuperadas fueron las esperadas, por lo que se validó el diseño y uso de los cebadores aquí propuestos.

La intención original del presente proyecto consistía en trabajar con muestras de DNA degradado, sin embargo fue necesario primero diseñar y poner a prueba los cebadores en condiciones ideales, es decir, utilizando DNA total e íntegro y de esta manera proponer una metodología adecuada para analizar mtDNA de condiciones forenses. Si bien no se alcanzó esta fase del proyecto, el haber estandarizado la metodología para la prueba era un paso previo indispensable para arriesgarse a trabajar con muestras de entorno forense.

Finalmente, es necesario considerar que el DNA mitocondrial debe ser utilizado como último recurso sólo en los casos en los que no es posible extraer DNA nuclear, ya que el uso de DNA mitocondrial cuenta con algunas limitaciones que son necesarias de contemplar y de atender; algunas de ellas son (Kowalczyk et al., 2021):

1. El mtDNA tiene un menor poder de discriminación en comparación con el DNA nuclear.

2. Las heteroplasmas (que consisten en la presencia de dos secuencias de mtDNA diferentes en una misma célula) pueden dificultar el análisis y la interpretación de resultados.
3. El mtDNA no permite hacer individualizaciones entre personas que compartan la herencia matrilineal y por lo tanto no es adecuado en todos los casos ya que muchas veces se requieren identificaciones precisas.

Conclusión

No todos los objetivos de este proyecto se cumplieron ya que el set de cebadores no ha sido probado en muestras de DNA degradado. Por otro lado, fue necesario diseñar dos pares más de cebadores que permitieran secuenciar la región de poli Cs del haplogrupo B2 que se encuentra entre la posición 16183 y la posición 16193. La metodología fue ajustada para abordar de manera específica las características genéticas y la gran diversidad de la población mexicana, garantizando además una mayor precisión para los análisis forenses, sin embargo aún hacen falta más procesos de validación y estandarización.

El conjunto de cebadores propuesto puede ser implementado en muestras forenses reales, sin embargo, es importante llevar a cabo una validación en muestras forenses, de preferencia que provengan de distintas regiones del país, abarcando tanto zonas rurales como urbanas, teniendo en cuenta que los fenómenos de variabilidad genética son diferentes en cada región. Incluso, de ser posible, muestras de distintos grupos étnicos.

Aún son necesarios nuevos proyectos de investigación que aborden de la misma forma la HVR II y la HVR III. Si bien ya existían algunas propuestas que tenían como objetivo secuenciar y analizar las regiones hipervariables del mtDNA (Gabriel et al., 2001; Holt et al., 2021; Parson et al., 2014), el proyecto presente se enfocó en que fuera posible teniendo en cuenta el ámbito forense y los polimorfismos de la población mexicana. La eficacia de los cebadores propuestos fue confirmada en tres haplogrupos, sin embargo, es importante señalar que para poder concluir sobre la existencia de una relación por línea materna entre dos individuos, aún se requiere la implementación de un proyecto similar centrado específicamente en las regiones hipervariables II y III del mtDNA. La información obtenida exclusivamente con los polimorfismos que existan en la región hipervariable I resulta insuficiente para establecer un parentesco matrilineal. Por lo tanto, se sugiere una continuación de este trabajo, que aborde estas otras regiones con el fin de fortalecer y ampliar la metodología.

Una importante limitación del presente proyecto, consiste en que se utilizó el DNA de la persona que llevó a cabo la experimentación, por este motivo sería difícil identificar una contaminación proveniente del mismo experimentador.

Es de suma importancia adaptar los análisis y las metodologías que existen en genética forense a la población de interés donde se aplicará. Por cuestiones de tiempo, en este proyecto se trabajó únicamente con la HVR I, idealmente es necesaria una continuación del proyecto, con las regiones hipervariables II y III.

Perspectivas

En México la crisis forense y humanitaria persiste, son más de 110,000 personas desaparecidas y más de 52,000 cuerpos sin identificar en las morgues alrededor de todo el país. La genética forense es crucial para la identificación (junto con otras ramas como la antropología y la odontología). Sin embargo, existe una carencia significativa de herramientas que permitan que la genética forense se siga desarrollando. Para desarrollar este trabajo, fue más que evidente que aún hace falta mucha información y, sobre todo, bases de datos de población mexicana mediante proyectos a los que todos podamos contribuir, en las que se registre y se reporte la enorme variabilidad de un país que fue colonizado y que constantemente tiene enormes olas de personas migrantes que provienen generalmente de Centroamérica y en menor cantidad, de Sudamérica y África. Además de lo mencionado sobre la necesidad de diseñar otros conjuntos de cebadores que permitan secuenciar las dos regiones hipervariables adicionales, hace falta probar y estandarizar el protocolo propuesto con muestras degradadas y posteriormente con muestras forenses reales.

Referencias

- Abuelas de Plaza Mayo. (2013). *Abuelas de Plaza Mayo*. Las abuelas y la genética.
- Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Keith Roberts, & Walter Peter. (2019). *Introducción a la Biología Celular* (B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, N. Roberts, & P. Walters, Eds.; 5ta ed.). W. W. Norton and Company.
- Amorim, A., Fernandes, T., & Taveira, N. (2019). Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*, 7, e7314. <https://doi.org/10.7717/peerj.7314>
- Andersen, J., Martin, P., Carracedo, A., Dobosz, M., Eriksen, B., Johnsson, V., Kimpton, C., Kloosterman, A., Konialis, C., Kratzer, A., Phillips, P., Mevåg, B., Pfitzinger, H., Rand, S., Rosén, B., Schmitter, H., Schneider, P., & Vide, M. (1996). Report on the third EDNAP collaborative STR exercise. European DNA Profiling Group. *Forensic science international*, 78(2), 83–93. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(95\)01871-9](https://doi.org/10.1016/0379-0738(95)01871-9)
- Annunziato, A. (2008). DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin. *Nature Education*.
- Ballard, D., Winkler-Galicki, J., & Wesoly, 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., Kloss-Brandstätter, A., Richards, M. B., Yao, Y.-G., & Logan, I. (2014). The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies. *Journal of Human Genetics*, 59(2), 66–77. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.120>
- Berger, C., & Parson, W. (2009). Mini-midi-mito: Adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples. *Forensic Science International: Genetics*, 3(3), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.01.011>
- Bodner, M., Perego, U. A., Gomez, J. E., Cerda-Flores, R. M., Rambaldi Migliore, N., Woodward, S. R., Parson, W., & Achilli, A. (2021a). The Mitochondrial DNA Landscape of Modern Mexico. *Genes*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/genes12091453>
- Bodner, M., Perego, U. A., Gomez, J. E., Cerda-Flores, R. M., Rambaldi Migliore, N., Woodward, S. R., Parson, W., & Achilli, A. (2021b). The Mitochondrial DNA Landscape of Modern Mexico. *Genes*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/genes12091453>
- Brotherton, P., Haak, W., Templeton, J., Brandt, G., Soubrier, J., Jane Adler, C., Richards, S. M., Sarkissian, C. Der, Ganslmeier, R., Friederich, S., Dresely, V., van Oven, M., Kenyon, R., Van der Hoek, M. B., Korfach, J., Luong, K., Ho, S. Y. W., Quintana-Murci, L., Behar, D. M., ... Ziegler, J. S. (2013). Neolithic mitochondrial haplogroup H genomes and the genetic origins of Europeans. *Nature Communications*, 4(1), 1764. <https://doi.org/10.1038/ncomms2656>
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers* (M. Listewnik, J. Soucy, P. Chester, C. Nolin, & E. DeCicco, Eds.; 2nd ed.). Elsevier.

- Campa, H. (2018, febrero 12). México: “El país de las y los desaparecidos”. Informe de la revista Proceso. *Resumen Latinoamericano*.
- Carrasco, L. (2021). La feminización de la búsqueda de desaparecidos en América Latina. Los comités de madres de Argentina y México frente a la represión, el autoritarismo y la dictadura militar. *Internaciones*, 21, 135–154. <https://doi.org/10.32870/in.vi21.7184>
- Castillo, G. (2021). Confirman identificación de otro de los 43 normalistas. *La Jornada*.
- Centro Prodh. (2023). *Ayotzinapa*.
- Chiarmoni, N. (2022). Genética forense: la receta amorosa de las abuelas. *Agencia de noticias científicas*.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Comisión Nacional de Derechos Humanos. (2018). *Aniversario luctuoso de Lucio Cabañas, profesor y guerrillero*.
- Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R., & Thorpe, R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International*, 173(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.09.013>
- Deng, Y.-M., Spirason, N., Iannello, P., Jelley, L., Lau, H., & Barr, I. G. (2015). A simplified Sanger sequencing method for full genome sequencing of multiple subtypes of human influenza A viruses. *Journal of Clinical Virology*, 68, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.019>
- Eichmann, C., & Parson, W. (2008). ‘Mitominis’: multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. *International Journal of Legal Medicine*, 122(5), 385–388. <https://doi.org/10.1007/s00414-008-0227-5>
- Feierstein, D. (2009). *Terrorismo de Estado y genocidio en América Latina* (1a ed.). Prometeo Libros.
- Gabriel, M., Huffine, E., Ryan, J., Holland, M., & Parsons, T. (2001). Improved MtDNA Sequence Analysis of Forensic Remains Using a “Mini-Primer Set” Amplification Strategy. *Journal of Forensic Sciences*, 46(2), 247–253. <https://doi.org/10.1520/JFS14957J>
- Ginther, C., Issel-Tarver, L., & King, M.-C. (1992). Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nature Genetics*, 2(2), 135–138. <https://doi.org/10.1038/ng1092-135>
- Gomes, A., & Korf, B. (2018). Genetic Testing Techniques. En *Pediatric Cancer Genetics* (pp. 47–64). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>
- Gonzalez, A., Cannet, C., Zvénirosky, V., Geraut, A., Koch, G., Delabarde, T., Ludes, B., Raul, J.-S., & Keyser, C. (2020). The petrous bone: Ideal substrate in legal medicine? *Forensic Science International: Genetics*, 47, 102305. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2020.102305>

- Grignani, P., Peloso, G., Achilli, A., Turchi, C., Tagliabracci, A., Alù, M., Beduschi, G., Ricci, U., Giunti, L., Robino, C., Gino, S., & Previderè, C. (2006). Subtyping mtDNA haplogroup H by SNaPshot minisequencing and its application in forensic individual identification. *International Journal of Legal Medicine*, *120*(3), 151–156. <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0059-5>
- Guardado-Estrada, M., Juárez-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. *Journal of Human Genetics*, *54*(12), 695–705. <https://doi.org/10.1038/jhg.2009.98>
- Guardado-Estrada, M., Medina-Martínez, I., Juárez-Torres, E., Roman-Bassaure, E., Macías, L., Alfaro, A., Alcántara-Vázquez, A., Alonso, P., Gomez, G., Cruz-Talonia, F., Serna, L., Muñoz-Cortez, S., Borges-Ibañez, M., Espinosa, A., Kofman, S., & Berumen, J. (2012). The Amerindian mtDNA haplogroup B2 enhances the risk of HPV for cervical cancer: de-regulation of mitochondrial genes may be involved. *Journal of Human Genetics*, *57*(4), 269–276. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.17>
- Habbane, M., Montoya, J., Rhouda, T., Sbaoui, Y., Radallah, D., & Emperador, S. (2021). Human Mitochondrial DNA: Particularities and Diseases. *Biomedicines*, *9*(10). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101364>
- Harney, É., Cheronet, O., Fernandes, D. M., Sirak, K., Mah, M., Bernardos, R., Adamski, N., Broomandkhoshbacht, N., Callan, K., Lawson, A. M., Oppenheimer, J., Stewardson, K., Zalzal, F., Anders, A., Candilio, F., Constantinescu, M., Coppa, A., Ciobanu, I., Dani, J., ... Pinhasi, R. (2021). A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. *Genome Research*, *31*(3), 472–483. <https://doi.org/10.1101/gr.267534.120>
- Hatsch, D., Amory, S., Keyser, C., Hienne, R., & Bertrand, L. (2007). A Rape Case Solved by Mitochondrial DNA Mixture Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, *52*(4), 891–894. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00473.x>
- Hofreiter, M., Sneberger, J., Pospisek, M., & Vanek, D. (2021). Progress in forensic bone DNA analysis: Lessons learned from ancient DNA. *Forensic Science International: Genetics*, *54*, 102538. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2021.102538>
- Holt, C. L., Stephens, K. M., Walichewicz, 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>
- Houck, M. (2015). *Forensic Biology* (M. Houck, Ed.; 2016a ed.). Elsevier.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V., & Thein, S. L. (1985). Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. *Nature*, *316*(6023), 76–79. <https://doi.org/10.1038/316076a0>
- Johnson, A. D. (2010). An extended IUPAC nomenclature code for polymorphic nucleic acids. *Bioinformatics*, *26*(10), 1386–1389. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq098>

- Kenney, M. C., Ferrington, D. A., & Udar, N. (2013). Mitochondrial Genetics of Retinal Disease. En *Retina* (pp. 635–641). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0737-9.00032-1>
- Kowalczyk, M., Staniszewski, A., Kamińska, K., Domaradzki, P., & Horecka, B. (2021). Advantages, Possibilities, and Limitations of Mitochondrial DNA Analysis in Molecular Identification. *Folia Biologica (Kraków)*, 69(3), 101–111. https://doi.org/https://doi.org/10.3409/fb_69-3.12
- La Redacción. (2002). Identifican restos de Lucio Cabañas. *Proceso*.
- Li, C. (2018). Forensic genetics. *Forensic Sciences Research*, 3(2), 103–104. <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1489445>
- Linhart, C., & Shamir, R. (2005). The Degenerate Primer Design Problem: Theory and Applications. *Journal of Computational Biology*, 12(4), 431–456. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.431>
- Medeiros, S., Sucena, A., Ribeiro, T., Espinheira, R., & Geada, H. (2008). Haplogroup H sub-lineages with mitochondrial SNPs. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 285–286. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2007.10.002>
- Panneerchelvam, S., & Norazmi, M. N. (2003). Forensic DNA profiling and database. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 10(2), 20–26.
- Parson, W., Brandstätter, A., Alonso, A., Brandt, N., Brinkmann, B., Carracedo, A., Corach, D., Froment, O., Furac, I., Grzybowski, T., Hedberg, K., Keyser-Tracqui, C., Kupiec, T., Lutz-Bonengel, S., Mevag, B., Ploski, R., Schmitter, H., Schneider, P., Syndercombe-Court, D., ... Scheithauer, R. (2004). The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives. *Forensic Science International*, 139(2–3), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2003.11.008>
- 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., & Coble, M. D. (2001). Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croatian medical journal*, 42(3), 304–309.
- Pierce, B. (2020). *Genetics, A Conceptual Approach* (D. Fox, S. Lindelof, W. Moore, L. Samols, M. Lokshin, J. Hollis, A. Thorne, C. Korsvik, H. Held, A. Jonker, C. Blanchard, A. Newton, & M. Inskeep, Eds.; 7th ed.). Macmillan Learning.
- Rohland, N., & Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756–1762. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.247>
- Sambrook, J., & Green, M. R. (2001). *Molecular Cloning, a laboratory manual* (J. Argentine, N. Irwin, & K. Janssen, Eds.; 4ta ed., Vol. 1). Cold Spring Harcor Laboratory Press.

- Slatkin, M. (1987). Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science*, 236(4803), 787–792. <https://doi.org/10.1126/science.3576198>
- Udogadi, N. S., Abdullahi, M. K., Bukola, A. T., Imose, O. P., & Esewi, A. D. (2020). Forensic DNA Profiling: Autosomal Short Tandem Repeat as a Prominent Marker in Crime Investigation. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 27(4), 22–35. <https://doi.org/10.21315/mjms2020.27.4.3>
- UNICEF. (2008). *Convención sobre los derechos del niño*.
- Vázquez, S. (2022). *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*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losik, R. (2016). *Biología Molecular del Gen* (J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, & R. Losick, Eds.; 7ma ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Wood, M. R., Sturk-Andreaggi, K., Ring, J. D., Huber, N., Bodner, M., Crawford, M. H., Parson, W., & Marshall, C. (2019). Resolving mitochondrial haplogroups B2 and B4 with next-generation mitogenome sequencing to distinguish Native American from Asian haplotypes. *Forensic Science International: Genetics*, 43, 102143. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102143>

Anexo

Anexo 1. Tabla con los reactivos y los equipos utilizados para la elaboración del presente proyecto

Proceso	Equipo/Reactivo	Descripción	Guía
Extracción	RBCL (Red blood cell lysis)	Obtenido de Sambrook & Green (2001)	(Sambrook & Green, 2001)
	Centrífuga	Eppendorf Centrifuge 5420	N/A
	Amortiguador de lisis	Obtenido de Sambrook & Green (2001)	(Sambrook & Green, 2001)
	Agitador	VORTEX-GENIE 2 Scientific industries	N/A
	Proteinasa K	CHRIS	
	Baño de temperatura	AccuTherm Labnet	N/A
	Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1	Sigma Aldrich	N/A
	Concentrador	Vacufuge plus Eppendorf	N/A
Cuantificación	Fluorómetro	Quantus Promega Fluorometer	https://worldwide.promega.com/es-es/resources/protocols/technical-manuals/101/quantus-fluorometer-operating-manual-protocol/
Amplificación	dNTPs	dNTP 10mM Bioline	https://www.bioline.com/mwdownloads/download/link/id/2704//p/i/pi-50070_dntp_mix_v7.pdf
	Buffer	Taq Buffer 10X sin detergente Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/B55?SID=srch-srp-B55
	MgCl ₂	MgCl ₂ (cloruro de magnesio) (25 mM) Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0971?SID=srch-srp-R0971
	Taq. Polimerasa		
	Termociclador	QIAmplifier 96	N/A

		QIAGEN	
Electroforesis	Agarosa	Sigma Aldrich	https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/roche/agrmsro?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=8809292844&utm_content=87619049414&gclid=Cj0KCQjwncWvBhD_ARIsAEb2HW9qqYsehYhrNDRuHIz2QLknBx_r_xeFiR-HX3gcTWpmRJJ4COyBYVE4aAupaEALw_wcB
	Amortiguador TBE 5X	Obtenido de Sambrook & Green (2001)	(Sambrook & Green, 2001)
	Amortiguador de carga	Colorante de carga de gel de ADN (6X)	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0611
	Marcador de peso molecular	HyperLadder 25 bp Bioline	https://www.bioline.com/hyperladder-25bp.html
	GelRed	Biotium concentración 1000x	https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/
Secuenciación	ExoSAPit	ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/75001.40.UL?gclid=Cj0KCQjwncWvBhD_ARIsAEb2HW8MiFQ5V_f6CJ5tdvTuFjD1LCvYrJjA2PLFKrR74kTDtOUAkjEMKvcaAuCbEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjwncWvBhD_ARIsAEb2HW8MiFQ5V_f6CJ5tdvTuFjD1LCvYrJjA2PLFKrR74kTDtOUAkjEMKvcaAuCbEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!606515189508!!!g!!!16893189581!143415109412&cid=bid_sap_rst_r01_co_cp0000_pjt0000_bid00000_0se

			gaw_dy_awa_con&gad_source=1
	Big Dye	BigDye Terminator v3.1 Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/mx/es/4337457
	Termociclador	QIAmplifier 96 QIAGEN	N/A
	Columnas de Sephadex G50	CENTRI-SEP COLUMNS Princeton separations	https://www.prinsep.com/sites/prinsep.rpdesign.com/files/Centri-Sep%20Procedure_0.pdf
	Secuenciador	Analizador genético serie 3500 de Applied Biosystems, Thermo Scientific. Con arreglo de 8 capilares y POP-7. Las muestras fueron analizadas con el software Data Collection Version 3.1.	N/A

Anexo 2. Tabla de Excel utilizada para facilitar el diseño de los cebadores

Secuencia	Posiciones	Cebadores
G	16000	Polimorfismos
A	16001	
T	16002	
T	16003	
C	16004	
T	16005	
A	16006	
A	16007	
T	16008	
T	16009	
T	16010	
A	16011	
A	16012	
A	16013	
C	16014	
T	16015	

A	16016
T	16017
T	16018
C	16019
T	16020
C	16021
T	16022
G	16023
T	16024
T	16025
C	16026
T	16027
T	16028
T	16029
C	16030
A	16031
T	16032
G	16033
G	16034
G	16035
G	16036
A	16037
A	16038
G	16039
C	16040
A	16041
G	16042
A	16043
T	16044
T	16045
T	16046
G	16047
G	16048
G	16049
T	16050
A	16051
C	16052
C	16053
A	16054
C	16055
C	16056
C	16057
A	16058

A	16059
G	16060
T	16061
A	16062
T	16063
T	16064
G	16065
A	16066
C	16067
T	16068
C	16069
A	16070
C	16071
C	16072
C	16073
A	16074
T	16075
C	16076
A	16077
A	16078
C	16079
A	16080
A	16081
C	16082
C	16083
G	16084
C	16085
T	16086
A	16087
T	16088
G	16089
T	16090
A	16091
T	16092
T	16093
T	16094
C	16095
G	16096
T	16097
A	16098
C	16099
A	16100
T	16101

T	16102
A	16103
C	16104
T	16105
G	16106
C	16107
C	16108
A	16109
G	16110
C	16111
C	16112
A	16113
C	16114
C	16115
A	16116
T	16117
G	16118
A	16119
A	16120
T	16121
A	16122
T	16123
T	16124
G	16125
T	16126
A	16127
C	16128
G	16129
G	16130
T	16131
A	16132
C	16133
C	16134
A	16135
T	16136
A	16137
A	16138
A	16139
T	16140
A	16141
C	16142
T	16143
T	16144

G	16145
A	16146
C	16147
C	16148
A	16149
C	16150
C	16151
T	16152
G	16153
T	16154
A	16155
G	16156
T	16157
A	16158
C	16159
A	16160
T	16161
A	16162
A	16163
A	16164
A	16165
A	16166
C	16167
C	16168
C	16169
A	16170
A	16171
T	16172
C	16173
C	16174
A	16175
C	16176
A	16177
T	16178
C	16179
A	16180
A	16181
A	16182
A	16183
C	16184
C	16185
C	16186
C	16187

C	16188
T	16189
C	16190
C	16191
C	16192
C	16193
A	16194
T	16195
G	16196
C	16197
T	16198
T	16199
A	16200
C	16201
A	16202
A	16203
G	16204
C	16205
A	16206
A	16207
G	16208
T	16209
A	16210
C	16211
A	16212
G	16213
C	16214
A	16215
A	16216
T	16217
C	16218
A	16219
A	16220
C	16221
C	16222
C	16223
T	16224
C	16225
A	16226
A	16227
C	16228
T	16229
A	16230

T	16231
C	16232
A	16233
C	16234
A	16235
C	16236
A	16237
T	16238
C	16239
A	16240
A	16241
C	16242
T	16243
G	16244
C	16245
A	16246
A	16247
C	16248
T	16249
C	16250
C	16251
A	16252
A	16253
A	16254
G	16255
C	16256
C	16257
A	16258
C	16259
C	16260
C	16261
C	16262
T	16263
C	16264
A	16265
C	16266
C	16267
C	16268
A	16269
C	16270
T	16271
A	16272
G	16273

G	16274
A	16275
T	16276
A	16277
C	16278
C	16279
A	16280
A	16281
C	16282
A	16283
A	16284
A	16285
C	16286
C	16287
T	16288
A	16289
C	16290
C	16291
C	16292
A	16293
C	16294
C	16295
C	16296
T	16297
T	16298
A	16299
A	16300
C	16301
A	16302
G	16303
T	16304
A	16305
C	16306
A	16307
T	16308
A	16309
G	16310
T	16311
A	16312
C	16313
A	16314
T	16315
A	16316

A	16317
A	16318
G	16319
C	16320
C	16321
A	16322
T	16323
T	16324
T	16325
A	16326
C	16327
C	16328
G	16329
T	16330
A	16331
C	16332
A	16333
T	16334
A	16335
G	16336
C	16337
A	16338
C	16339
A	16340
T	16341
T	16342
A	16343
C	16344
A	16345
G	16346
T	16347
C	16348
A	16349
A	16350
A	16351
T	16352
C	16353
C	16354
C	16355
T	16356
T	16357
C	16358
T	16359

C	16360
G	16361
T	16362
C	16363
C	16364
C	16365
C	16366
A	16367
T	16368
G	16369
G	16370
A	16371
T	16372
G	16373
A	16374
C	16375
C	16376
C	16377
C	16378
C	16379
C	16380
T	16381
C	16382
A	16383
G	16384
A	16385
T	16386
A	16387
G	16388
G	16389
G	16390
G	16391
T	16392
C	16393
C	16394
C	16395
T	16396
T	16397
G	16398
A	16399
C	16400
C	16401
A	16402

C	16403
C	16404
A	16405
T	16406
C	16407
C	16408
T	16409
C	16410
C	16411
G	16412
T	16413
G	16414

Anexo 3. Tabla de Excel utilizada para observar los alineamientos

Posiciones	rCRS	Juego 1 OF	Juego 1 R	Juego 2 F	Juego 3 F	Juego 3 F	Juego 3 R	Juego 5 R
16000	G		G					
16001	A		A					
16002	T		T					
16003	T		T					
16004	C		C					
16005	T		T					
16006	A		A					
16007	A		A					
16008	T		T					
16009	T		T					
16010	T		T					
16011	A		A					
16012	A		A					
16013	A		A					
16014	C		C					
16015	T		T					
16016	A		A					
16017	T		T					
16018	T		T					
16019	C		C					
16020	T		T					
16021	C		C					
16022	T		T					
16023	G		G					
16024	T		T					
16025	T		T					
16026	C		C					
16027	T		T					
16028	T		T					
16029	T		T					
16030	C		C					
16031	A		A					
16032	T		T					
16033	G		G					
16034	G		G					
16035	G		G					
16036	G		G					
16037	A		A					
16038	A		A					
16039	G		G					

16040	C		C					
16041	A		A					
16042	G		G					
16043	A	A	A					
16044	T	T	T					
16045	T	T	T					
16046	T	T	T					
16047	G	G	G					
16048	G	G	G					
16049	G	G	G					
16050	T	T	T					
16051	A	A	A					
16052	C	C	C					
16053	C	C	C					
16054	A	A	A					
16055	C	C	C					
16056	C	C	C					
16057	C	C	C					
16058	A	A	A					
16059	A	A	A					
16060	G	G	G					
16061	T	T	T					
16062	A	A	A					
16063	T	T	T					
16064	T	T	T					
16065	G	G	G					
16066	A	A	A					
16067	C	C	C					
16068	T	T	T					
16069	C	C	C					
16070	A	A	A					
16071	C	C	C					
16072	C	C	C					
16073	C	C						
16074	A	A						
16075	T	T						
16076	C	C						
16077	A	A						
16078	A	A						
16079	C	S						
16080	A	A						
16081	A	A						
16082	C	C						

16083	C	C						
16084	G	G						
16085	C	C						
16086	T	T						
16087	A	A						
16088	T	T						
16089	G	G						
16090	T	T						
16091	A	A						
16092	T	T						
16093	T	T						
16094	T	T						
16095	C	C						
16096	G	G						
16097	T	T						
16098	A	A						
16099	C	C						
16100	A	A						
16101	T	T		T				
16102	T	T		T				
16103	A	A		A				
16104	C	Y		C				
16105	T	T		T				
16106	G	G		G				
16107	C	C		C				
16108	C	C		C				
16109	A	A		A				
16110	G	G		G				
16111	C	C		C				
16112	C	C		C				
16113	A	A		A				
16114	C	C		C				
16115	C	C		C				
16116	A	A		A				
16117	T	T		T				
16118	G	G		G				
16119	A	A		A				
16120	A			A				
16121	T			T				
16122	A			A				
16123	T			T				
16124	T			T				
16125	G			G				

16126	T			T				
16127	A			A				
16128	C			C				
16129	G			G				
16130	G			G				
16131	T			T				
16132	A			A				
16133	C			C				
16134	C			C				
16135	A			A				
16136	T			T				
16137	A			A				
16138	A			A				
16139	A			A				
16140	T			T				
16141	A			A				
16142	C			C				
16143	T			T				
16144	T			T				
16145	G			G				
16146	A			A				
16147	C			C				
16148	C			C				
16149	A			A				
16150	C			C				
16151	C			C				
16152	T			T				
16153	G			G				
16154	T			T				
16155	A			A				
16156	G			G				
16157	T			T				
16158	A			A				
16159	C			C				
16160	A			A				
16161	T			T				
16162	A			A				
16163	A			A				
16164	A			A				
16165	A			A				
16166	A			A				
16167	C			C				
16168	C			C				

16169	C			C				
16170	A			A				
16171	A			A				
16172	T			T				
16173	C			C				
16174	C			C				
16175	A			A				
16176	C			C				
16177	A			A				
16178	T			T				
16179	C			C				
16180	A			A				
16181	A			A				
16182	A			A				
16183	A			C				C
16184	C			C				C
16185	C			C				C
16186	C			C				C
16187	C			C				C
16188	C			C				C
16189	T			C				C
16190	C			C				C
16191	C			C				C
16192	C			C			T	C
16193	C			C			C	C
16194	A						A	A
16195	T						T	T
16196	G						G	G
16197	C						C	C
16198	T			T			T	T
16199	T			T			T	T
16200	A						Y	A
16201	C						C	C
16202	A						A	A
16203	A						A	A
16204	G						G	G
16205	C						C	C
16206	A						A	A
16207	A						A	G
16208	G						G	G
16209	T						T	T
16210	A						A	A
16211	C						C	C

16212	A						A	A
16213	G						G	G
16214	C						C	C
16215	A						A	A
16216	A						A	A
16217	T						C	C
16218	C						C	C
16219	A						A	A
16220	A						A	A
16221	C						C	
16222	C						C	
16223	C						C	
16224	T						T	
16225	C						C	
16226	A						A	
16227	A						A	
16228	C						C	
16229	T						T	
16230	A						A	
16231	T						T	
16232	C						C	
16233	A						A	
16234	C						C	
16235	A						A	
16236	C						C	
16237	A						A	
16238	T						T	
16239	C						C	
16240	A						A	
16241	A						A	
16242	C						C	
16243	T						T	
16244	G					G	G	
16245	C					C	C	
16246	A					A	A	
16247	A				A	A	A	
16248	C				C	C	C	
16249	T				T	T	T	
16250	C				C	C	C	
16251	C				C	C	C	
16252	A				A	A	A	
16253	A				A	A	A	
16254	A					A	A	

16255	G				G	G	G	
16256	C				C	C	C	
16257	C				C	C	C	
16258	A				A	A	A	
16259	C				C	C	C	
16260	C				C	C	C	
16261	C				C	C	C	
16262	C				C	C	C	
16263	T				T	T	T	
16264	C				C	C	C	
16265	A				A	A	A	
16266	C				C	C	C	
16267	C				C	C	C	
16268	C				C	C	C	
16269	A				A	A	A	
16270	C				C	C	C	
16271	T				T	T	T	
16272	A				A	A	A	
16273	G				G	G	G	
16274	G				G	G	G	
16275	A				A	A	A	
16276	T				T	T	T	
16277	A				A	A	A	
16278	C				C	C	C	
16279	C				C	C	C	
16280	A				A	A	A	
16281	A				A	A	A	
16282	C				C	C	C	
16283	A				A	A	A	
16284	A				A	A	A	
16285	A				A	A	A	
16286	C				C	C	C	
16287	C				C	C	C	
16288	T				T	T	T	
16289	A				A	A	A	
16290	C				C	C	C	
16291	C				TN	T	T	
16292	C				C	C	C	
16293	A				A	A	A	
16294	C				C	C	C	
16295	C				C	C	C	
16296	C				C	C	C	
16297	T				T	T	T	

16298	T				T	T	T	
16299	A				A	A	A	
16300	A				A	A	A	
16301	C				C	C	C	
16302	A				A	A	A	
16303	G				G	G	G	
16304	T				T	T	T	
16305	A				A	A	A	
16306	C				C	C	C	
16307	A				A	A	A	
16308	T				T	T	T	
16309	A				A	A	A	
16310	G				G	G		
16311	T				T	T		
16312	A				A	A		
16313	C				C	C		
16314	A				A	A		
16315	T				T	T		
16316	A				A	A		
16317	A				A	A		
16318	A				A	A		
16319	G				G	G		
16320	C					C		
16321	C				C	C		
16322	A				A	A		
16323	T				T	T		
16324	T				T	T		
16325	T				T	T		
16326	A				A	A		
16327	C				C	C		
16328	C				C	C		
16329	G				G	G		
16330	T				T	T		
16331	A				A	A		
16332	C				C	C		
16333	A				A	A		
16334	T				T	T		
16335	A				A	A		
16336	G				G	T		
16337	C				C	C		
16338	A				A	A		
16339	C				C	C		
16340	A				A	A		

16341	T				T	T		
16342	T				T	T		
16343	A				A	A		
16344	C				C	C		
16345	A				A	A		
16346	G				G	G		
16347	T				KT180	G		
16348	C				C	A		
16349	A				A	A		
16350	A				A	A		
16351	A				A	A		
16352	T				T	T		
16353	C				C	C		
16354	C				C	C		
16355	C				C	C		
16356	T				T	T		
16357	T				T	T		
16358	C				C	C		
16359	T				T	T		
16360	C				C	C		
16361	G				G	G		
16362	T				T	A		
16363	C				C	C		
16364	C				C	C		
16365	C				C	C		
16366	C				C	C		
16367	A				A	?		
16368	T				T	T		
16369	G				G	G		
16370	G				G	G		
16371	A				A	A		
16372	T				T	T		
16373	G				G	G		
16374	A				A	A		
16375	C				C	C		
16376	C				C	C		
16377	C				C	C		
16378	C				C	C		
16379	C				C	C		
16380	C				C	C		
16381	T				T	T		
16382	C				C	C		
16383	A				A	A		

16384	G				G	G		
16385	A				A	A		
16386	T				T	T		
16387	A				A	A		
16388	G				G	G		
16389	G				G	G		
16390	G				G	G		
16391	G				G	G		
16392	T				T	T		
16393	C				C	C		
16394	C				C	C		
16395	C				C	C		
16396	T				T	T		
16397	T				T	T		
16398	G				G	G		
16399	A				A	A		
16400	C				C	C		
16401	C				C	C		
16402	A				A	A		
16403	C				C	C		
16404	C				C	C		
16405	A				A	T		
16406	T				T	T		
16407	C				C	C		
16408	C				C	C		
16409	T				T	T		
16410	C				C	C		
16411	C				C	C		
16412	G				G	G		
16413	T				T	T		
16414	G				G	G		
					A	A		
					A	?		
					T	T		
					G	G		
					A	A		